

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II**



**PAPEL DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF-B, HGF Y EGF EN LA  
REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN,  
DIFERENCIACIÓN Y MUERTE DE LAS CÉLULAS  
PROGENITORAS ADULTAS HEPÁTICAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Adoración Martínez Palacián**

Bajo la dirección de los doctores

Aránzazu Sánchez Muñoz  
Blanca María Herrera González

**Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR II**



**PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN DEL TGF- $\beta$ , HGF Y  
EGF EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN,  
DIFERENCIACIÓN Y MUERTE DE LAS CÉLULAS  
PROGENITORAS ADULTAS HEPÁTICAS**

**Memoria presentada por la Licenciada  
Adoración Martínez Palacián  
para aspirar al Grado de Doctor**

**Dirigida por las Doctoras:**

**Aránzazu Sánchez Muñoz  
Blanca María Herrera González**

**MADRID, 2012**



Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

La autora de este trabajo ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia (BES-2007-16187).

La financiación para la realización de este trabajo se ha obtenido de los siguientes proyectos:

- Ministerio de Educación y Ciencia: SAF2006-12025
- Ministerio de Ciencia e Innovación: SAF2009-12477



---

## Índice



## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1. Hígado y regeneración hepática	1
2. Las células ovals	5
2.1. Caracterización fenotípica de las células ovals	5
2.2. Nicho de células ovals	6
2.3. Activación de las células progenitoras hepáticas	7
2.4. Relevancia del estudio de las células ovals	9
Terapia celular	9
Procesos tumorales hepáticos	10
3. La vía de HGF/Met y su relevancia en el contexto hepático	12
3.1. Señalización mediada por el eje HGF/Met	12
3.1.1. El HGF	12
3.1.2. El receptor Met	13
3.1.3. Señalización intracelular y actividades biológicas inducidas por la vía de señalización de HGF/Met	15
3.2. La vía de HGF/Met y las células hepáticas	17
4. La vía de señalización del EGFR y su relevancia en el contexto hepático	20
4.1. Familia ErbB. Ligandos y receptores	20
4.1.1. Ligandos de los receptores ErbB	20
4.1.2. Receptores de la familia ErbB	21
4.1.3. Activación de la vía modulada por los receptores ErbB	22
Dimerización del receptor y unión a ligando	22
Unión a proteínas adaptadoras	22
4.1.4. Regulación de la señalización ErbB	23
4.1.4.1. Endocitosis del receptor inducida por ligando	23
4.1.4.2. Regulación por retroalimentación positiva: producción autocrina de ligandos	24
4.1.4.3. Regulación por moduladores negativos	24
4.1.4.4. Regulación por microRNAs	24
4.1.4.5. Interacción cruzada (crosstalk) de los receptores ErbB con otras vías de señalización	24
4.2. Relevancia de ErbB1 (EGFR) y sus ligandos en células hepáticas	26

5. La vía de señalización del TGF- $\beta$	27
5.1. El TGF- $\beta$ y sus receptores	29
5.2. La vía de señalización canónica o dependiente de Smads	29
5.2.1. Miembros de la familia Smad	29
5.2.2. Regulación transcripcional mediada por Smads	30
5.2.3. Regulación de la actividad de Smads	30
5.3. Vías no canónicas	
5.3.1. MAPKs	32
ERK1/2	32
p38-MAPKs y JNK	32
5.3.2. La vía PI3K/Akt	32
5.4. Respuestas celulares al TGF- $\beta$	33
5.4.1. Inhibición del crecimiento mediada por TGF- $\beta$	33
6. Apoptosis inducida por TGF- $\beta$	34
6.1. Características de la apoptosis	34
6.2. Caspasas	35
6.3. La familia de proteínas Bcl-2	35
6.4. Vías apoptóticas	36
6.4.1. Vía extrínseca o de receptores de muerte	37
6.4.2. Vía intrínseca o vía mitocondrial regulada por la familia Bcl-2	37
6.5. Apoptosis inducida por TGF- $\beta$ en el hígado	38
7. Transición epitelio- mesénquima	40
7.1. Tipos de EMT	40
7.2. Cambios fenotípicos tras un proceso de EMT	41
7.3. Factores de transcripción implicados en EMT	44
7.4- EMT inducida por TGF- $\beta$	46
7.5. EMT inducida por TGF- $\beta$ en células hepáticas	47
<b>II. ANTECEDENTES</b>	49
<b>III. OBJETIVOS</b>	53

<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
1. Modelo celular: células ovas Met <sup>flx/flx</sup> y Met <sup>-/-</sup>	55
2. Factores de crecimiento e inhibidores	55
3. Silenciamiento génico del EGFR mediante siRNA	56
4. Análisis de la expresión génica	56
4.1. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)	56
4.2. RT-PCR cuantitativa (Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction o qRT-PCR)	57
5. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western Blot	59
5.1. Obtención de proteínas	59
5.2. Cuantificación de proteínas	60
5.3. Inmunoprecipitación de proteínas	61
5.4. Electroforesis de proteínas	62
5.5. Transferencia de proteínas	62
5.6. Inmunodetección de las proteínas mediante Western Blot	62
6. Análisis de la expresión de proteínas mediante citometría de flujo	64
7. Detección de proteínas mediante microscopía confocal	64
7.1. Inmunocitoquímica	64
7.2. Inmunohistoquímica	65
8. Ensayos de actividad transcripcional	66
9. Análisis de proliferación celular mediante incorporación de timidina tritiada	67
10. Análisis de la muerte por apoptosis	67
10.1. Cuantificación de la actividad caspasa-3	67
10.2. Contaje de núcleos apoptóticos tras tinción con yoduro de propidio	68
10.3. Determinación del porcentaje de células apoptóticas mediante citometría de flujo	68
11. Cuantificación de la producción de radicales libres de oxígeno	69
12. Determinación del potencial de membrana mitocondrial	69
13. Determinación del contenido intracelular de glutatión	69
14. Estudio estadístico	70

<b>V. RESULTADOS</b>	<b>71</b>
1. Relevancia de la vía de señalización de EGF-EGFR en la biología de las células ovasales	71
1.1. El EGF como mitógeno para las células ovasales	71
1.2. Existencia de una regulación autocrina del EGFR y su importancia para la proliferación y supervivencia de células ovasales	72
1.3. Análisis de la posible interacción cruzada entre Met y EGFR en células ovasales	75
1.4. La actividad antiapoptótica y pro-supervivencia inducidas por HGF en células ovasales son independientes de la actividad quinasa del EGFR	77
2. Protección por HGF autocrino frente a la apoptosis inducida por TGF-β en células ovasales	82
2.1. Vías de señalización disparadas por el TGF-β en células ovasales Met <sup>fix/fix</sup> y Met <sup>-/-</sup> .	82
2.2. En células ovasales murinas, el TGF-β induce apoptosis por la vía mitocondrial.	84
2.3. En células ovasales Met <sup>fix/fix</sup> y Met <sup>-/-</sup> , el TGF-β induce la expresión de Bim y Bmf, proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2	86
2.4. La ausencia de actividad tirosina quinasa de Met amplifica el estrés oxidativo inducido por TGF-β en células ovasales	87
2.5. Importancia de la PI3K en la protección frente a apoptosis inducida por TGF-β en células ovasales	90
3. EMT inducida por TGF-β en células ovasales. Efecto de la ausencia o presencia de un receptor Met funcional.	93
3.1. Caracterización fenotípica de la transición epitelio-mesénquima inducida por TGF-β en células ovasales Met <sup>fix/fix</sup> y Met <sup>-/-</sup>	93
3.2. Efecto del TGF-β sobre la expresión de factores de transcripción implicados en la transición epitelio-mesénquima	96
3.3. Efecto del TGF-β en la expresión de proteínas de matriz extracelular y de integrinas	97
3.4. Efecto del TGF-β en el estado de diferenciación de las células ovasales Met <sup>fix/fix</sup> y Met <sup>-/-</sup>	98
3.5. Efecto del TGF-β en la integración de células ovasales murinas en hígado tras trasplantes in vivo	100

<b>VI. DISCUSIÓN</b>	103
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	121
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	123



I.

---

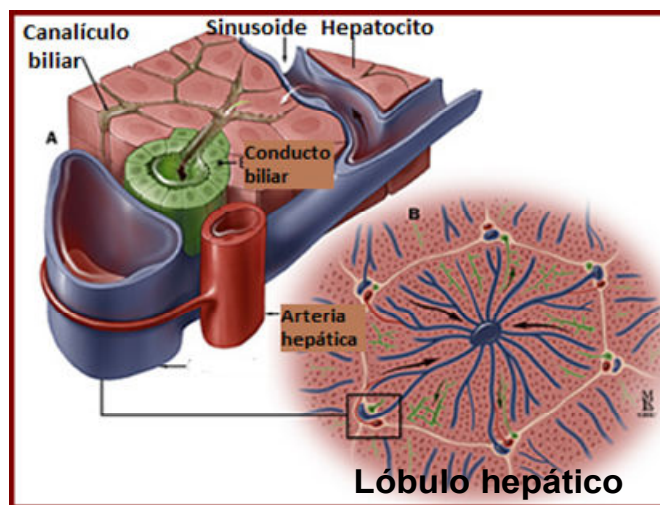
## Introducción



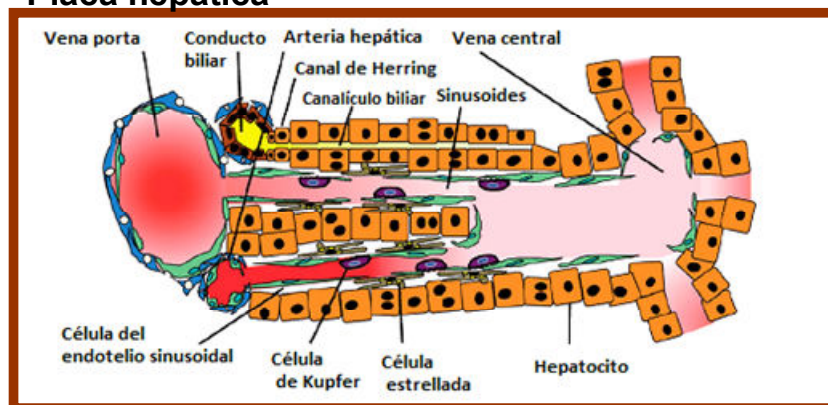
## 1. Hígado y regeneración hepática.

El hígado es un órgano central en la fisiología debido a sus numerosas funciones, que incluyen el metabolismo de carbohidratos, compuestos nitrogenados y lípidos, siendo fundamental para el almacenamiento de glucógeno, la biosíntesis de aminoácidos, urea y nucleótidos y la secreción de bilis, además de la detoxificación de drogas, producción de proteínas plasmáticas y hormonas y destrucción de eritrocitos.

Los daños hepáticos producidos por infecciones por virus hepatotrópicos (como el virus de la hepatitis B o C), por enfermedades (genéticas, metabólicas o inmunes) y por drogas o alcohol pueden producir enfermedades crónicas en el hígado como esteatosis, hepatitis, fibrosis, cirrosis y distintas formas de cáncer hepático. Dado que el hígado es un órgano tan esencial, las enfermedades hepáticas tienen frecuentemente un desenlace fatal y son una importante causa de muerte.



### Placa hepática



**Figura 1.** Organización del hígado en lóbulos y placas hepáticas y tipos celulares presentes en el hígado.

La unidad funcional del hígado es el lóbulo hepático [Mall, 1906]. Los lóbulos hepáticos son estructuras hexagonales formadas por placas hepáticas (hileras de hepatocitos de una o dos células de grosor), en cuyo centro se encuentra la vena central, que desemboca en las venas hepáticas y éstas a su vez en la vena cava inferior. Los vértices del hexágono lo componen seis tríadas portales formadas por una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conducto biliar que

conduce la bilis hacia los conductos biliares mayores. El hígado tiene un doble aporte circulatorio, mediante la vena porta y la arteria hepática. 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 del lóbulo.

Los hepatocitos son uno de los dos tipos celulares de naturaleza epitelial del hígado (el otro son los colangiocitos o células que forman el conducto biliar) y llevan a cabo casi la totalidad de las funciones del hígado, ya que son las células parenquimáticas más abundantes: constituyen aproximadamente el 60% de la población celular total y el 80% del volumen del órgano. Los hepatocitos tienen distintas funciones dependiendo de su localización en el interior del lóbulo hepático. El perfil de expresión génica y las actividades bioquímicas no son exactamente iguales en todos los hepatocitos sino que existe una “zonalización metabólica”, término que hace referencia a las diferentes propiedades de los hepatocitos periportales (adyacentes a la tríada portal) y pericentrales (adyacentes a la vena central [revisado por Duncan et al. 2009]). Los hepatocitos periportales expresan enzimas del ciclo de la urea y convierten amoníaco en urea. En cambio, los hepatocitos pericentrales expresan glutamina sintetasa y utilizan amoníaco para generar glutamina [revisado por: Fausto y Campell, 2003; Duncan et al., 2009]

Los hepatocitos son células con una marcada polaridad de membrana plasmática, distinguiéndose con claridad una membrana basolateral y una membrana apical. Las membranas basolaterales están en contacto con las células endoteliales sinusoidales fenestradas, lo que facilita la transferencia de metabolitos entre los hepatocitos y la sangre. Los sinusoides son capilares específicos del hígado formados por células endoteliales fenestradas, a las que acompañan células estrelladas hepáticas (o células de Ito), macrófagos residentes del hígado (células de Kupffer) y linfocitos grandes granulares (células pit) [revisado por: Duncan et al., 2009; Tanaka et al., 2011)]. Las uniones estrechas entre hepatocitos adyacentes crean un canalículo que rodea cada hepatocito y al que están orientadas las membranas apicales de los hepatocitos. La bilis es secretada por los hepatocitos hacia el canalículo biliar y luego drena hacia el conducto biliar de la tríada portal. El canalículo biliar conecta con el conducto biliar mediante el Canal de Hering, el cual es el más probable y aceptado nicho de células progenitoras hepáticas, que constituyen el objeto de estudio de esta tesis y de las que hablaremos en el apartado 2.

La posición anatómica del hígado y su función fisiológica de detoxificación hacen que las células hepáticas estén en continuo contacto con toxinas. Esto, junto con daños persistentes como infecciones víricas, enfermedades inmunológicas o fallos genéticos pueden ser un desafío continuo para el hígado. Evolutivamente, el hígado se ha adaptado para sobreponerse a estos daños y la capacidad regenerativa del hígado de mamíferos adultos es inmensa. De hecho, uno de los aspectos más fascinantes de la biología del hígado, que lo diferencia de otros órganos, es su capacidad de regenerarse tras una pérdida parcial de la masa hepática causada por hepatectomía parcial (PH) o por necrosis de los hepatocitos. El proceso de regeneración hepática es un proceso de crecimiento compensatorio acompañado de hipertrofia celular que está encaminado a restaurar la masa hepática inicial y es gobernado por necesidades funcionales y no tanto por requerimientos anatómicos. Aunque se restaura la función hepática, las estructuras anatómicas no se reconstituyen.

Generalmente el hígado es regenerado por los hepatocitos maduros. Pero cuando se produce un daño que impide la proliferación de los hepatocitos, la regeneración hepática es llevada a cabo por las células progenitoras hepáticas [revisado por: Duncan et al., 2009; Alison et al., 2009; Tanaka et al., 2011].

## Regeneración mediada por hepatocitos

En condiciones normales, en el hígado (como en la mayoría de los órganos) se mantiene un equilibrio entre la pérdida y la ganancia celular. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, el mantenimiento de la densidad celular en un hígado sano no es llevado a cabo por células madre sino por la división de las propias células maduras: los hepatocitos y las células del ducto biliar [revisado por: Knight et al., 2005; Grompe, 2005]. El recambio de hepatocitos en un hígado sano es lento, teniendo estos una vida media de aproximadamente un año. Esto contrasta con otros órganos de renovación rápida como la piel o el epitelio del tracto intestinal que se renuevan en menos de dos semanas. Se conoce poco de la renovación de otros tipos celulares en el hígado como los colangiocitos y otras células hepáticas.

Tras un daño, la regeneración hepática es también llevada a cabo principalmente por los hepatocitos maduros. El modelo más utilizado para inducir y estudiar la regeneración hepática es la PH, es decir, la resección quirúrgica de parte del hígado. Este modelo ha proporcionado mucha información sobre los mecanismos que controlan la regeneración hepática. En respuesta al estímulo de resección quirúrgica, los hepatocitos normalmente quiescentes abandonan la fase G0 y entran de nuevo en ciclo celular bajo la influencia de factores de crecimiento [Stöcker & Heine, 1971]. Este modelo es también la demostración más espectacular de la capacidad regenerativa del hígado: en ratas, cuando se resecciona el 70% del hígado el remanente hepático alcanza de nuevo la masa original en aproximadamente 10 días [Higgins et al., 1931]. En humanos, tras el trasplante del lóbulo derecho, los hígados del receptor y del donante alcanzan su peso original a los 60 días de la intervención [Marcos et al., 2000].

## Regeneración mediada por células progenitoras hepáticas

Cuando la regeneración hepática mediada por hepatocitos está impedida por un daño hepático que sobrepasa la capacidad regenerativa de los hepatocitos, por una enfermedad hepática crónica o por senescencia replicativa de la mayoría de hepatocitos, las células progenitoras toman el relevo en la regeneración, activándose un compartimento de células madre en las ramas más pequeñas del árbol biliar intrahepático.

Existen diversos **modelos animales** experimentales de regeneración hepática mediada por la expansión de células progenitoras. Generalmente se recurre a distintas hepatotoxinas que bloquean la mitosis en hepatocitos o que provocan daño hepático con la consiguiente muerte de hepatocitos. Esto produce estrés oxidativo crónico y/o inflamación que dispara una potente respuesta regenerativa en el hígado encaminada a la restauración del parénquima hepático perdido. Un resumen de estos modelos animales queda expuesto en la [Tabla 1](#). Los 3 modelos más utilizados son la dieta deficiente en colina y suplementada con etionina (CDE), la dieta suplementada con 3-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) y la PH combinada con tratamiento con acetilaminofluoreno (AAF).

Esta proliferación de células progenitoras no se ha descrito sólo en modelos murinos sino que también se ha observado en humanos [Lowe et al., 1999], donde recibe el nombre de reacción ductular. Esta reacción es morfológicamente e inmunohistoquímicamente análoga a la reacción observada en roedores. La reacción ductular tiene una gran relevancia clínica en enfermedades hepáticas crónicas como la hepatitis vírica crónica, hepatitis de etiología alcohólica, hígado graso de etiología no alcohólica, colangiopatías inmunes y enfermedades hepáticas hereditarias [Roskams et al., 1991, 2003a, 2003b; Falkowski et al., 2003]. El daño hepático que se extiende a lo largo de años o décadas lleva al agotamiento de la capacidad proliferativa de los hepatocitos y por consiguiente favorece la participación de las células progenitoras en los procesos de regeneración hepática [Wiemann et al., 2002; Marshall et al., 2005].

Tanto en humanos como en roedores, la intensidad de esta reacción, y por tanto la proporción de células progenitoras hepáticas es mayor cuanto mayor es el daño hepático y más severa es la fibrosis y la inflamación hepática [Lowe et al., 1999; Libbrecht et al., 2000a; Roskams et al., 2003a]. Esto implica que una escalada en el déficit de hepatocitos promueve un mayor grado de diferenciación a lo largo del eje célula progenitora/hepatocito [Roskams et al., 2003b].

**Tabla 1.** Modelos experimentales animales de regeneración hepática mediada por células progenitoras

Tratamiento	Modelo animal	Referencia
Dieta CDE (Deficiente en colina y suplementada con etionina)	Rata y ratón	Shinozuka et al., 1978a y b
Dieta DDC (3-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina)	Rata y ratón	Preisegger et al., 1999; Wang et al., 2003
AAF (acetilaminofluoreno) + PH (Hepatectomía Parcial)	Rata y ratón	Factor et al., 1994; Fujio et al., 1994; Preisegger et al., 1999; Shinozuka et al., 1978
AAF/CCl <sub>4</sub> (tetracloruro de carbono)	Rata	Chiu et al., 2007; Petersen et al., 1998; Yin et al., 2002
AAF/AA (alcohol alílico)	Rata	Petersen et al., 1998.
CD (dieta sin colina)/AAF	Rata	Sell, 1983; Sells et al., 1981
Fenobarbital	Ratón	Rosenberg et al., 2000
DIPIN (1,4-bis[N,N'-di(etilen)fosfamida]piperazina)+PH	Rata y ratón	Engelhardt et al., 1990; Factor et al., 1994
D-Galactosamina + PH	Rata y ratón	Lemire et al., 1991; Dabeva et al., 1993 ; Lee et al., 1996
Lasiocarpina + PH	Rata	Laconi et al., 1995
Retrorsina + PH	Rata	Gordon et al., 2000; Laconi et al., 1998
Retrorsina + CCl <sub>4</sub>	Rata	Dahlke et al., 2003; Zhou et al., 2006
APAP (N-acetil-p-aminofeno)	Ratón	Kofman et al., 2005
AA (alcohol alílico)	Rata y ratón	Lee et al., 1996; Yavorkovsky et al., 1995
CCl <sub>4</sub>	Ratón	Engelhardt et al., 1984
DEN (Dietilnitrosamina)	Rata y ratón	He et al., 1994; Schwarz et al., 1983
Etanol (larga duración)	Rata y ratón	Roskams et al., 2003; Smith et al., 1996

Las células progenitoras son apenas detectables en un hígado adulto sano y constituyen la progenie de células madre. Aunque tanto las células madre (*stem*) como las células progenitoras tienen capacidad de reconstituir funcionalmente un tejido de manera duradera en el tiempo, presentan entre ellas ciertas diferencias. Las células madre se autorrenuevan (es decir, sufren una división asimétrica que da lugar a dos células hijas, una de las cuales mantiene el carácter de célula madre), son

multipotentes (pueden diferenciarse a muchos linajes celulares distintos) y se pueden transplantar de forma seriada. En cambio, las células progenitoras se dividen rápidamente pero no poseen la capacidad de autorrenovarse, su potencial de linaje es limitado y no pueden ser transplantadas de forma seriada [Potten et al. 1997; Shafritz y Oertel 2010].

Para referirse a las células progenitoras hepáticas se han utilizado diversos nombres. Los dos términos más utilizados son “célula oval” y “célula intermedia hepatobiliar”. El término “célula oval” se reserva para las células progenitoras hepáticas que surgen de la zona periportal en roedores, y deben su nombre a que poseen un núcleo ovalado. En cambio, se suele utilizar el término “célula intermedia hepatobiliar” para referirse a las células progenitoras hepáticas humanas [Roskams et al., 2004]. Otros términos también usados para referirse a estas células son: células progenitoras ductulares, células ductulares atípicas y células progenitoras hepáticas peri-ductulares.

## 2. Las células ovals

Morfológicamente, las células ovals son células de pequeño tamaño (aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ), con un citoplasma muy escaso y un núcleo grande ovalado que constituye la mayor parte de la célula.

Las células ovals tienen una elevada capacidad proliferativa, son inmaduras y bipotenciales, es decir, que poseen la capacidad para diferenciarse tanto a hepatocitos como a colangiocitos [Everts et al., 1989; Lázaro et al., 1998; Holic et al., 2000, revisado por Kamiya et al., 2006]. Las propias células progenitoras hepáticas expresan marcadores de hepatocitos y de células del conducto biliar como veremos más adelante. Además, observaciones mediante microscopía electrónica para estudiar la ultraestructura celular han mostrado un gradiente de diferenciación que va desde progenitores primitivos hasta hepatocitos y colangiocitos diferenciados [De Vos y Desmet 1992; Mandache et al., 2002].

### 2.1. Caracterización fenotípica de las células ovals

El fenotipo de las células ovals posee varias características singulares. Es un fenotipo intermedio entre el de hepatocitos y el de colangiocitos, ya que expresan simultáneamente marcadores de ambos tipos celulares como citoqueratina (CK) 8 y 18, albúmina (ALB), y c-Met propios de hepatocitos y CK 7 y CK 19 típicos marcadores de colangiocitos. Está asociado con el fenotipo de hepatoblastos fetales inmaduros, como lo muestra el hecho de que expresen AFP (Alfafetoproteína), expresada en la embriogénesis hepática y Dlk (Delta-like protein), marcador de hepatoblastos [Tanimizu et al., 2004]. Además, expresan N-CAM y cromogranina que son marcadores de células neuroepiteliales, implicadas en adhesión y en procesos de secreción, respectivamente; así como algunos marcadores hematopoyéticos como Thy-1 (CD90), Sca-1 (*stem cell antigen 1*), CD34 y CD133 [Knittel et al., 1996; Dezso et al., 2007; Dudas et al., 2007; Dudas et al., 2009; Van Hul et al., 2009].

También hay que destacar que entre los distintos modelos murinos (rata y ratón) de inducción de células progenitoras hepáticas existen diferencias en cuanto a la expresión de algunos marcadores. Las células ovals de rata son más positivas para AFP que las de ratón [Factor et al., 1990; Jelnes et al., 2007]. Por tanto, las células ovals de rata recuerdan más a los hepatoblastos fetales que sus equivalentes en ratón. Además, las células ovals de rata son positivas para OV6 y las de ratón no, aunque estas últimas sí que expresan otros marcadores de células biliares como CK19 y A6 [Factor et al., 1990].

**Tabla 2.** Marcadores fenotípicos de células ovals comunes con otros tipos celulares hepáticos y no hepáticos

	Hepatocitos adultos	Hepatoblastos	Colangiocitos	Células hematopoyéticas adultas	Células neuroepiteliales	Células progenitoras
<b>INTRA-CELULARES</b>	AAT Alb CK18 HNF4	AFP Aldolasa A Aldolasa C Dik GGT GST MPK	A6 CK7 CK14 CK19 GGT GST MPK OC (2,3,4,5) OV-6 (CK14 y19)		Chrom-a S-100 PTHrP	Nestina
<b>MEMBRANA CELULAR</b>	ABCG2 E-cadh c-Met	ABCG2 CD13 CD24 Dipeptidil peptidasa IV FN-14 Integrina $\alpha$ 6 Integrina $\beta$ 1	Cadh 32 CD24 CD44 CX43 EpCAM Integrina $\alpha$ 6 c-Met Prominina 1 OV-1	CD34 CXCR4 Flt3 c-Kit Sca-1 Thy-1=CD90	N-CAM Receptores de neurotrofinas	c-kit TROP-2

## 2.2. Nicho de células ovals

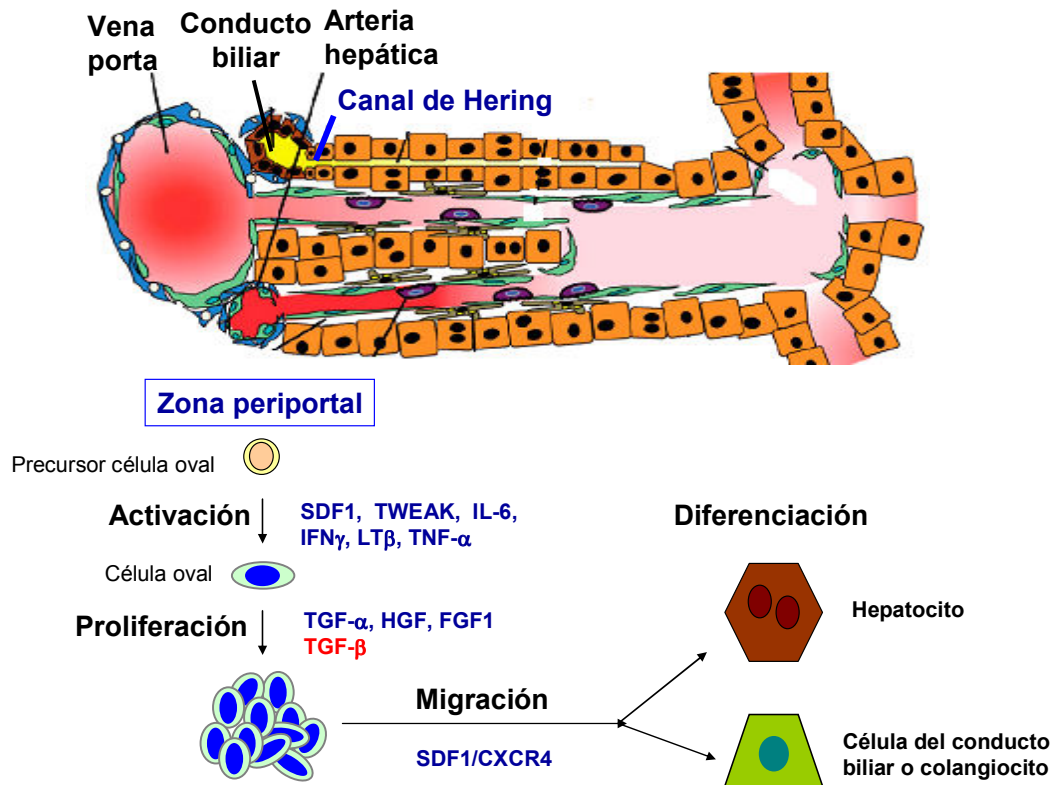
La mayoría de los datos disponibles apuntan a que el nicho de células progenitoras hepáticas se localiza en las regiones periportales, concretamente los canales de Hering [Saxena et al., 1999, Theisse et al., 1999; Paku et al., 2001; revisado por Dolle 2010], existiendo también dicho nicho en hígados adultos humanos. No obstante, algunos autores han propuesto la existencia en el hígado de un sistema de regeneración multi-escalonado y flexible en contraposición a una única localización de células progenitoras [Kuwahara et al., 2008], postulándose cuatro posibles precursores de células progenitoras: células positivas para citoqueratinas del canal de Hering, los colangiocitos intraductales, las células peri-ductales que carecen de marcadores hepato biliares y los hepatocitos peri-biliares [Kuwahara et al., 2008].

Se cree que los nichos actúan como microambientes -compuestos por distintas células, membrana basal y matriz extracelular- que puede tener un efecto en la activación y proliferación de las células progenitoras. Los nichos de células progenitoras hepáticas están muy probablemente rodeados por células estrelladas [Paku et al., 2001; Roskams et al., 2003; Roskams et al., 2004] y células de Kupffer [Holt et al., 2008], que tienen una función primordial en la fibrogénesis, e influirán de manera diferente en el compartimento de células progenitoras hepáticas dependiendo de su localización en el lóbulo hepático, su estado de activación y la naturaleza y severidad del daño. Esto puede conducir a diferencias en el inmunofenotipo de las células progenitoras hepáticas aisladas a partir de distintos modelos de daño hepático [revisado por Santoni-Rugiu 2005; Erker y Grompe 2007]. Se ha demostrado también que en el proceso regenerativo están además implicadas la inervación del hígado, la membrana basal y la matriz extracelular, lo que subraya la influencia del microambiente en la activación de las células progenitoras hepáticas [revisado por Dolle et al., 2010].

### 2.3. Activación de las células progenitoras hepáticas

En el contexto de células madre/progenitoras, activación se refiere a la expansión de un número de células mediante proliferación, que normalmente va seguida de diferenciación hacia distintos linajes.

Los mecanismos que median la respuesta de las células progenitoras hepáticas son objeto de intensa investigación, ya que el conocimiento de los factores que gobiernan su proliferación y diferenciación es de gran utilidad de cara a su aplicación con fines terapéuticos y regenerativos (ver apartado 2.4).



**Figura 2.** Activación de las células ovals, dividida arbitrariamente en 4 fases: activación del precursor de células ovals, proliferación, migración y diferenciación.

La activación de las células ovals se divide arbitrariamente en 4 fases [revisado por Erker y Grompe 2008; Duncan et al. 2009; Alison et al., 2009]:

-Activación del precursor de células ovals. Tras el daño hepático, se observa inmediatamente una intensa respuesta inflamatoria que se inicia con infiltración de células del sistema inmune y la liberación de citoquinas y quimioquinas por parte de las células inflamatorias [Strick-Marchand et al., 2008], hechos que preceden a la proliferación de las células ovals. Entre los factores que pueden estimular a las células ovals se encuentran SDF-1, TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis), IL-6 (Interleukin 6), linfotoxina-β, IFN $\gamma$  (interferón  $\gamma$ ), TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) e histamina.

-Proliferación de las células ovals. A continuación, diversos factores del crecimiento provocan en las células ovals emergentes una intensa proliferación y expansión hacia el exterior de la zona periportal. En esta fase jugarían un papel

importante el TGF $\alpha$ , HGF, FGF-1 (reguladores positivos de la proliferación de células ovas) y el TGF- $\beta$  (regulador negativo).

El amplio abanico de señales que controlan la activación y proliferación de las células progenitoras hepáticas sugiere una significativa redundancia funcional entre las señales que controlan ambos procesos.

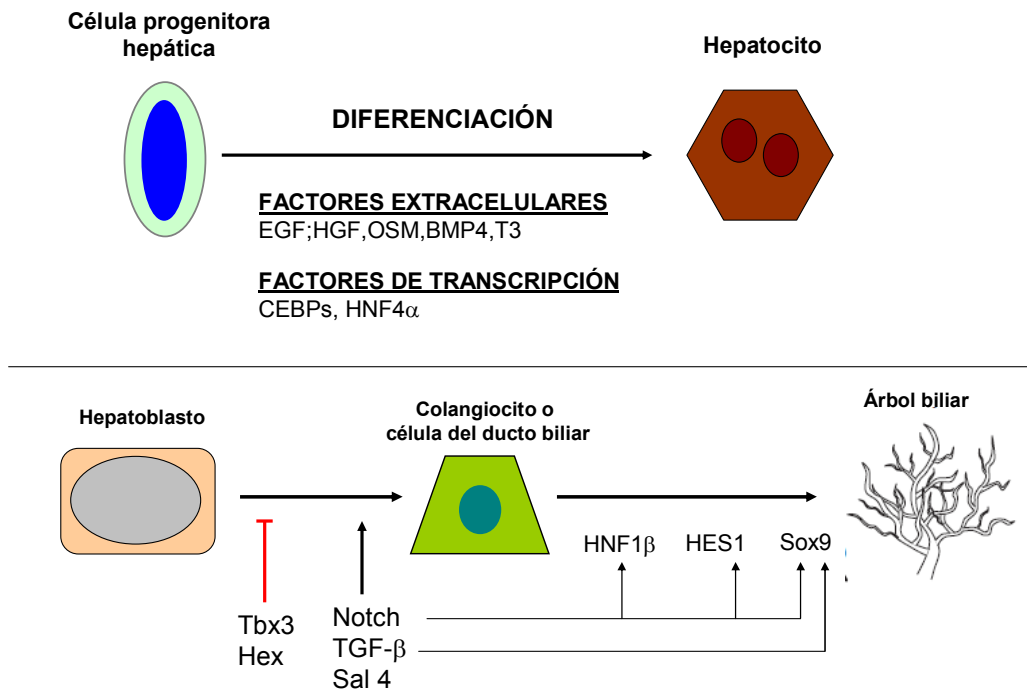
Aunque actualmente se sabe que es necesario un daño en los hepatocitos para que se produzca la respuesta oval, se desconoce cómo este daño se comunica a los precursores de las células ovas. Durante la activación de las células ovas están presentes numerosos tipos celulares epiteliales, hematopoyéticos y mesenquimales y en muchos casos no está claro qué células transmiten y cuales reciben señales moleculares importantes. Lo más probable es que sea necesaria la colaboración de todos los tipos celulares. La secuencia temporal de los eventos de señalización y la contribución exacta de cada tipo celular está todavía por definir.

-Migración de las células ovas por el parénquima hepático en el que juega un importante papel el eje de señalización SDF1/CXCR4 [Hatch et al., 2002; Swenson et al., 2008]

-Diferenciación de las células progenitoras hacia hepatocitos o células del ducto biliar. Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sobre la diferenciación de células ovas a hepatocitos ha proporcionado evidencias de la importancia de distintos factores en este proceso, incluyendo EGF, HGF, BMP4, OSM, Triyodotironina (T3) [He et al., 2003, Okaya et al., 2005; Laszlo et al. 2008; Fan et al., 2009] La inducción de la diferenciación a hepatocitos coincide con un aumento de la expresión de los factores de transcripción de la familia de C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) y HNF4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ), habiendo sido propuestos ambos como factores importantes en la diferenciación a hepatocitos de las células progenitoras hepáticas [Dabeva et al., 1995; Nagy et al., 1994; Suetsugu et al., 2008].

En cuanto a la diferenciación a colangiocitos, la mayor parte de los estudios se han realizado en hepatoblastos, aunque dadas las similitudes entre hepatoblastos y células progenitoras hepáticas se pueden tomar como indicativo de lo que sucede en células progenitoras. El desarrollo de los conductos biliares se produce en dos pasos. Primero los hepatoblastos que se encuentran en la zona que está alrededor de la vena porta se diferencian a colangiocitos. Este paso está promovido por la señalización mediada por TGF- $\beta$  y Notch y por el factor de transcripción Sal4, mientras que es inhibido por los factores de transcripción Tbx3 y Hex. Posteriormente los colangiocitos sufren morfogénesis tubular y forman el árbol biliar. En este paso están implicados los factores de transcripción HNF1 $\beta$ , HES-1 y Sox9 [revisado por Tanaka et al., 2011].

Muchas de las señales que controlan la regeneración hepática mediada por hepatocitos están también implicadas en la regeneración mediada por células progenitoras, entre ellas, el TNF- $\alpha$ , IL-6, HGF, EGF y TGF- $\beta$ , indicando la importancia crucial que tienen estos factores en la biología hepática. Nuestros estudios se han centrado en las vías del HGF y del EGF, así como la vía del TGF- $\beta$  y sus efectos en la biología de las células ovas.



**Figura 3.** Factores intracelulares y extracelulares implicados en la diferenciación de células progenitoras hepáticas a hepatocitos y en la formación del árbol biliar a partir de hepatoblastos.

## 2.4. Relevancia del estudio de las células ovas.

### Terapia celular

Las enfermedades hepáticas crónicas tienen una alta incidencia y acarrear consecuencias clínicas severas debidas a la pérdida de hepatocitos funcionales y a la fibrosis que se produce.

En la actualidad el trasplante de hígado es el tratamiento estándar cuando se ha producido fallo hepático debido a enfermedades agudas como por ejemplo, intoxicación, hepatitis vírica fulminante y enfermedades crónicas congénitas (alteraciones en el ciclo de la urea, glucogenosis tipo I, síndrome de Crigler Najjar) o adquiridas (hígado graso de etiología no alcohólica, hepatitis crónica de origen vírico). Sin embargo, este tratamiento tiene obvias limitaciones, entre ellas el bajo número de donantes y la dificultad de la técnica quirúrgica, que hace necesario personal e instalaciones especializadas y además no está exenta de riesgos entre otros, el rechazo al trasplante [revisado por Dolle et al., 2010].

El trasplante de hepatocitos aislados representa otra opción terapéutica para el tratamiento de enfermedades metabólicas congénitas hepáticas, utilizada generalmente para mantener con vida a pacientes inestables hasta que encuentren un donante o para permitir que un paciente se recupere de un fallo hepático fulminante. [Sokal et al., 2003]. Sin embargo, también esta alternativa terapéutica plantea problemas [revisado por Hughes et al., 2012], como: i) los hepatocitos trasplantados tienen una tasa de integración y supervivencia muy baja ii) los hepatocitos aislados son en general escasos en número y de baja calidad, iii) los hepatocitos son difíciles de manipular y de cultivar *in vitro* y su desdiferenciación en cultivo es muy rápida.

Queda por tanto patente que las terapias actuales presentan una serie de dificultades y limitaciones que hacen necesario buscar alternativas. En este contexto, las células ovas/progenitoras hepáticas adquieren gran relevancia como alternativa

terapéutica ya que en modelos de daño hepático en los que se ha realizado trasplante de células con características de células progenitoras, estas pueden integrarse en el parénquima hepático, diferenciarse a células de fenotipo hepatocítico y repoblar el hígado, sin bien la eficiencia de repoblación varía mucho entre los modelos utilizados [Oertel y Shafritz, 2008]. Los avances recientes en el aislamiento y caracterización de estas células progenitoras han creado expectativas en su uso en terapia celular. El trasplante de células progenitoras se considera una herramienta terapéutica prometedora para numerosas enfermedades hepáticas agudas o crónicas [Sandhu et al., 2001]. Además, las células progenitoras hepáticas presentan ciertas ventajas sobre los hepatocitos como candidatas para terapia celular [Sandhu et al., 2001]:

-Accesibilidad. En la actualidad se ha conseguido aislar células progenitoras a partir de hígado de individuos adultos y, además se ha conseguido diferenciar hacia el linaje hepático a células progenitoras extraídas de otros tejidos, como médula ósea, sangre de cordón umbilical, piel y tejido adiposo. Esto abre la posibilidad de obtener las células madre/progenitoras a partir de tejidos del propio paciente, lo que eliminaría la posibilidad de rechazo y evitaría la inmunosupresión durante toda la vida del paciente

-Elevada tasa de proliferación y facilidad de manipulación *in vitro*, lo que reduciría el número de células a extraer del donante.

-Pequeño tamaño, lo que haría que disminuyera el número de células necesarias para el trasplante y podría aumentar la eficiencia de integración. Cuando se realizan trasplantes de hepatocitos, hasta el 70% de los hepatocitos trasplantados se quedan atrapados en los sinusoides hepáticos, debido a su elevado diámetro (20 a 40  $\mu\text{m}$ ), lo que lleva a bajas tasas de integración y a la necesidad de trasplantar un número elevado de células (hasta  $20 \times 10^6$  hepatocitos en modelos de roedores) [revisado por Allen y Soriano, 2001].

Sin embargo debe tenerse en cuenta que estas células, tras el trasplante, deben diferenciarse a células hepáticas funcionales siendo éste un proceso lento y que podría verse afectado en diferentes aspectos por el entorno de un hígado dañado, lo que podría influir en el resultado final.

### **Procesos tumorales hepáticos**

Finalmente, no puede dejar de mencionarse la relación entre las células ovales y procesos tumorales hepáticos [revisado por Alison 2005; Alison et al., 2009].

Las dos formas principales de tumores primarios hepáticos son el carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma.

El carcinoma hepatocelular (HCC) es el quinto cáncer más común en el mundo y la tercera causa de muerte por cáncer. Los factores de riesgo para el HCC son la infección por los virus de la hepatitis B (HBV) y C (HCV), el abuso de alcohol, las enfermedades metabólicas hepáticas y la exposición frecuente a mutágenos como aflatoxinas (metabolitos tóxicos del hongo alimentario *Aspergillus spp.*) situaciones todas ellas que desembocan en cirrosis hepática. De hecho, la mayoría de los HCCs (80%) surgen en un hígado cirrótico, es decir, de una situación donde ha habido daño a los hepatocitos prolongado en el tiempo.

El colangiocarcinoma (CC) es mucho menos común que el HCC, pero su incidencia y mortalidad asociada ha ido en paulatino aumento en las últimas 2 o 3 décadas. Factores de riesgo para el CC son daños en el epitelio biliar que produzcan inflamación crónica y/o obstrucción del flujo biliar, como colangitis primaria esclerosante, hepatolitiasis e infestaciones hepáticas por los parásitos *Opisthorchis viverrini* y *Clonorchis sinensis*.

El cáncer y la biología de las células madre/progenitoras están inexorablemente unidos. En tejidos que se renuevan continuamente, como la mucosa intestinal y la epidermis, en los que existe un flujo continuo de células desde la zona de células madre hacia la zona de células terminalmente diferenciadas que están a punto de perderse, se acepta comúnmente que el cáncer es una enfermedad de células madre, ya que estas son las únicas células que persisten en el tejido el tiempo suficiente para acumular el número necesario de cambios genéticos que produzcan una transformación neoplásica. En el hígado, numerosos estudios apuntan al hecho de que los tumores hepáticos derivan de una sola célula (son monoclonales), pero la identificación de las células fundadoras del HCC y el CC es controvertida. Las razones son que en el hígado no hay un flujo unidireccional de células que sea evidente, aunque se cree que los hepatocitos centrilobulares son más diferenciados (poliploides) y más cercanos a la senescencia celular que los hepatocitos periportales. Además, la existencia de al menos dos tipos celulares con capacidad regenerativa (las células progenitoras y los hepatocitos) sugiere que puede haber más de un tipo de célula diana para los carcinógenos. Independientemente de cual sea la célula diana implicada la proliferación en el momento de la exposición a carcinógenos es crucial para “fijar” el daño genotóxico en una forma transmisible a la progenie. Desde este punto de vista, cualquier célula proliferativa en el hígado es susceptible de transformación neoplásica. Según Sell, en modelos experimentales de hepatocarcinogénesis puede haber al menos cuatro linajes celulares distintos susceptibles de transformación neoplásica [Sell, 2003]: los hepatocitos en el caso del HCC, los colangiocitos en el caso del CC, las células ovals/progenitoras hepáticas y un cuarto tipo llamado “célula periductular no definida que responde a daño peri-portal y de la que se ha sugerido que podría tener su origen en la médula ósea.

Las evidencias indirectas que hacen pensar que las células ovals/progenitoras hepáticas están implicadas en el proceso de carcinogénesis son:

-Existe una correlación temporal entre la aparición de células progenitoras hepáticas y los estadios tempranos del HCC [revisado por Hacker et al., 1992; Alison y Lovell, 2005] y el CC [Roskams 2006]. Además, la activación de células ovals precede al desarrollo de HCC en casi todos los modelos de hepatocarcinogénesis y la reacción ductular acompaña invariablemente al daño hepático crónico, que produce fibrosis y posteriormente cirrosis. Como hemos dicho anteriormente, la mayor parte de los HCCs surgen en un hígado cirrótico

-La inhibición de la respuesta oval en ratones KO para  $TNF\alpha R1$  durante la dieta carcinogénica CDE de larga duración (dieta utilizada también como modelo de inducción de reacción oval en roedores, ver tabla 1) está asociada con una reducción de la incidencia de lesiones cancerosas [Knight et al., 2000]. Así mismo, si la expansión de las células ovals se bloquea en el modelo murino de dieta CDE inhibiendo c-kit con imatinib mesilato se reduce la formación de tumores [Knight et al., 2008].

-*In vitro*, las células ovals tienen capacidad de transformación [Pack et al., 1993].

-Muchos tumores contienen una mezcla de células maduras y células fenotípicamente similares a células progenitoras hepáticas. También se han detectado células con un fenotipo de célula progenitora en un subconjunto relativamente raro de enfermedades hepáticas donde hay claramente dos componentes principales, un componente HCC y un componente CC, de nuevo sugestivo de un origen a partir de un progenitor bipotencial [Theise et al., 2003]. También han sido detectadas células que recuerdan a células progenitoras (OV-1+ o OV-6+) en hepatoblastoma [Ruck et al., 1996; Ruck et al 1997; Xiao et al., 2003; Fiegel et al., 2004], el tumor hepático más común en la infancia, probablemente originado a partir de células madre.

-La evidencia más directa hasta el momento del papel de las células ovales en la patogénesis de HCC ha sido obtenida experimentalmente por Dumble et al. [Dumble et al., 2002]. En este trabajo se describe que células ovales aisladas a partir de hígados de ratones deficientes en p53 eran capaces de generar tumores cuando eran transplantadas en ratones atímicos.

A la luz de la relevancia de las células ovales en terapia celular regenerativa y de las evidencias de una posible relación con tumores hepáticos, es patente la necesidad de conocer mejor los requerimientos de factores de crecimiento para la proliferación, diferenciación y supervivencia de estas células, y sus mecanismos de acción dentro de la célula.

### **3. La vía de HGF/Met y su relevancia en el contexto hepático.**

#### **3.1. Señalización mediada por el eje HGF/Met**

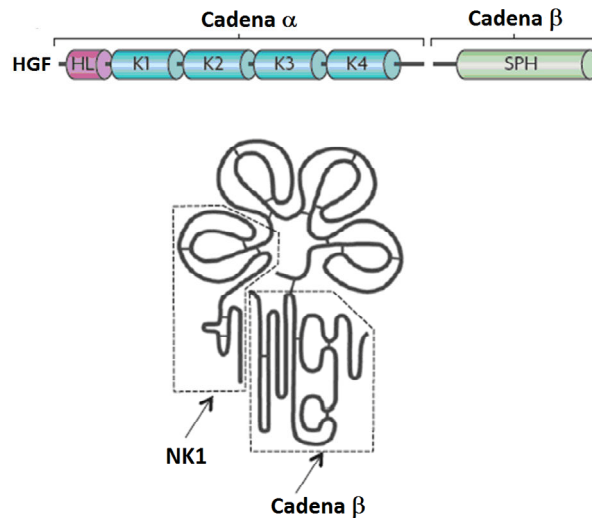
##### **3.1.1. El HGF.**

A principios de los años 80 se purificó a partir de suero de ratas hepatectomizadas, un factor que inducía de forma muy acusada la proliferación de los hepatocitos *in vitro*, por lo que se denominó a este factor HGF (de Hepatocyte Growth Factor) [Nakamura et al., 1984; Russell et al., 1984]. De forma independiente se descubrió un factor secretado por fibroblastos y células de músculo liso que promovía la motilidad de las células epiteliales y al que se denominó SF (de *Scatter Factor*) [Stoker et al., 1987]. Posteriormente se demostró que ambas moléculas eran idénticas [Naldini et al., 1991b; Weidner et al., 1991].

El HGF es el prototipo de una familia de factores de crecimiento que reciben colectivamente el nombre de factores de crecimiento relacionados con el plasminógeno (PRGFs), ya que todos ellos son proteínas de gran tamaño (aproximadamente 100 kDa) que tienen un dominio estructural similar al del plasminógeno [Gherardi et al., 1997].

El HGF se sintetiza como un precursor inactivo formado por una única cadena polipeptídica (pro-HGF), que tras sufrir un corte proteolítico entre Arg494 y Val495 da como resultado la formación de HGF maduro. Este corte proteolítico es llevado a cabo por serín-proteasas específicas, tales como el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), el activador de plasminógeno tisular (tPA), el factor de coagulación sanguíneo XIIa, y el activador de HGF (HGF-A), este último a su vez producido en forma de zimógeno inactivo por las células epiteliales en respuesta a daño tisular y posteriormente activado por trombina [Naldini et al., 1992; Mars et al., 1993; Miyazawa et al., 1993; Mizuno y Nakamura 1993; Shimomura et al., 1993; Bardelli et al., 1994].

La forma activa madura del HGF es una proteína heterodimérica compuesta de una cadena pesada o cadena  $\alpha$ , de 69 kDa y una cadena ligera o cadena  $\beta$  de 34 kDa, ambas unidas entre sí por puentes disulfuro. La cadena pesada contiene un péptido señal típico seguido de una estructura de lazo u horquilla N-terminal y cuatro dominios *Kringle* (estructuras de doble lazo, de 80 aminoácidos, estabilizados por puentes disulfuro intramoleculares). La cadena ligera contiene un motivo de tipo serín proteasa, pero carece de la tríada catalítica, que se encuentra en todas las serín proteasas, Asp-His-Ser. La sustitución de dos de esas posiciones hace que carezca de actividad catalítica.



**Figura 4.** Estructura de la forma activa madura del HGF, compuesta de una cadena pesada o cadena  $\alpha$ , de 69 kDa y una cadena ligera o cadena  $\beta$  de 34 kDa unidas entre sí por puentes disulfuro.

El HGF se une con gran afinidad a heparina y al proteoglicano heparán sulfato, limitando de esta manera su difusión *in vivo* y asegurando al mismo tiempo la acumulación del factor en las proximidades de las células productoras y por tanto un mecanismo de acción local. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con otros factores de crecimiento de unión a heparina, el heparán sulfato no es necesario para la unión a su receptor y para la señalización [Matsumoto et al., 1993; Zioncheck et al., 1995; Hartmann et al. 1998].

El HGF está presente en la matriz extracelular del hígado y otros órganos (pulmón, riñón, placenta, cerebro) en cantidades considerables, donde es producido por fibroblastos y otras células mesenquimáticas, tanto durante el desarrollo como en la etapa adulta. En el hígado, el HGF es producido por las células estrelladas y por las células endoteliales [revisado por Michalopoulos, 2007], pero son las células epiteliales las que expresan el receptor y responden a este factor [Sonnenberg et al., 1993; Yang y Park 1995]. Existen algunas excepciones, es decir, hay células que expresan tanto el ligando como el receptor, y que presentan por tanto un mecanismo de acción autocrino. La existencia de una actuación autocrina se ha descrito durante el desarrollo del sistema nervioso y en procesos de carcinogénesis hepática, cerebral, osteosarcoma, glioblastoma y melanoma [Maina et al., 1998; Horiguchi et al., 2002; Peruzzi y Bottaro 2006]. Resultados de nuestro grupo indican que las células progenitoras hepáticas también poseen este mecanismo *in vitro* [del Castillo et al., 2008a].

Numerosos factores de crecimiento y citoquinas (noradrenalina, IL-1, IL-6, prostaglandinas, PDGF, FGF y TGF- $\alpha$ ) modulan los niveles de expresión de HGF, lo que constituye uno de los puntos de regulación de la vía [Matsumoto et al., 1992; Boccaccio et al., 1994; Gohda et al., 1994; Matsumoto et al., 1995; Zarnegar 1995; Blanquaert et al., 1999)].

### 3.1.2. El receptor Met.

El HGF se une con gran afinidad a su receptor Met, codificado por un proto-oncogén cuyo nombre oficial es *Met* (aunque también se le conoce como c-Met o HGFR). Met es un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa que pertenece a una familia de tirosina quinasa heterodiméricas, a la que también están

adsritos los receptores Ron, Ryk y Sea [Huff et al., 1993; Ronsin et al., 1993; Gaudino et al., 1994].

Met se expresa en células epiteliales de prácticamente todos los tejidos, aunque también se ha descrito su expresión en células endoteliales y neuronas [Sonnenberg et al., 1993]. La expresión de Met es inducida por múltiples factores, entre ellos el propio HGF, EGF, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , estrógenos, progesterona, y fármacos como el tamoxifeno y la dexametasona [Boccaccio et al., 1994; Moghul et al., 1994; Zarnegar 1995].

El receptor Met se sintetiza como una cadena polipeptídica única de 150 kDa, que sufre glicosilación parcial para dar una proteína precursora de aproximadamente 170 kDa. La ruptura proteolítica de esta forma precursora da lugar a una proteína heterodimérica madura de dos cadenas unidas por puentes disulfuro, una cadena  $\alpha$  N-terminal de 50 kDa localizada en el exterior de la membrana celular y una cadena  $\beta$  C-terminal de 140 kDa que contiene una región extracelular, implicada en la unión al ligando, una región transmembrana y una región intracelular, que contiene un dominio catalítico tirosina quinasa y un dominio de anclaje C-terminal [Weidner et al., 1991; Comoglio 1993].

El receptor Met se localiza sobre todo en las uniones intercelulares junto a moléculas de adhesión celular como la E-cadherina [revisado por Birchmeier et al., 2003]. Parece que Met puede interactuar con proteínas de la membrana plasmática como la propia E-cadherina, CD44, integrina  $\alpha 6 \beta 4$ , ezrina, plexina B1, el receptor Fas y receptores de semaforinas, con el fin de ejercer sus diversas funciones [revisado por Birchmeier et al. 2003; revisado por Trusolino et al., 2010]. Se cree que esta asociación participa en la especificidad de la respuesta biológica [Bertotti y Comoglio, 2003].

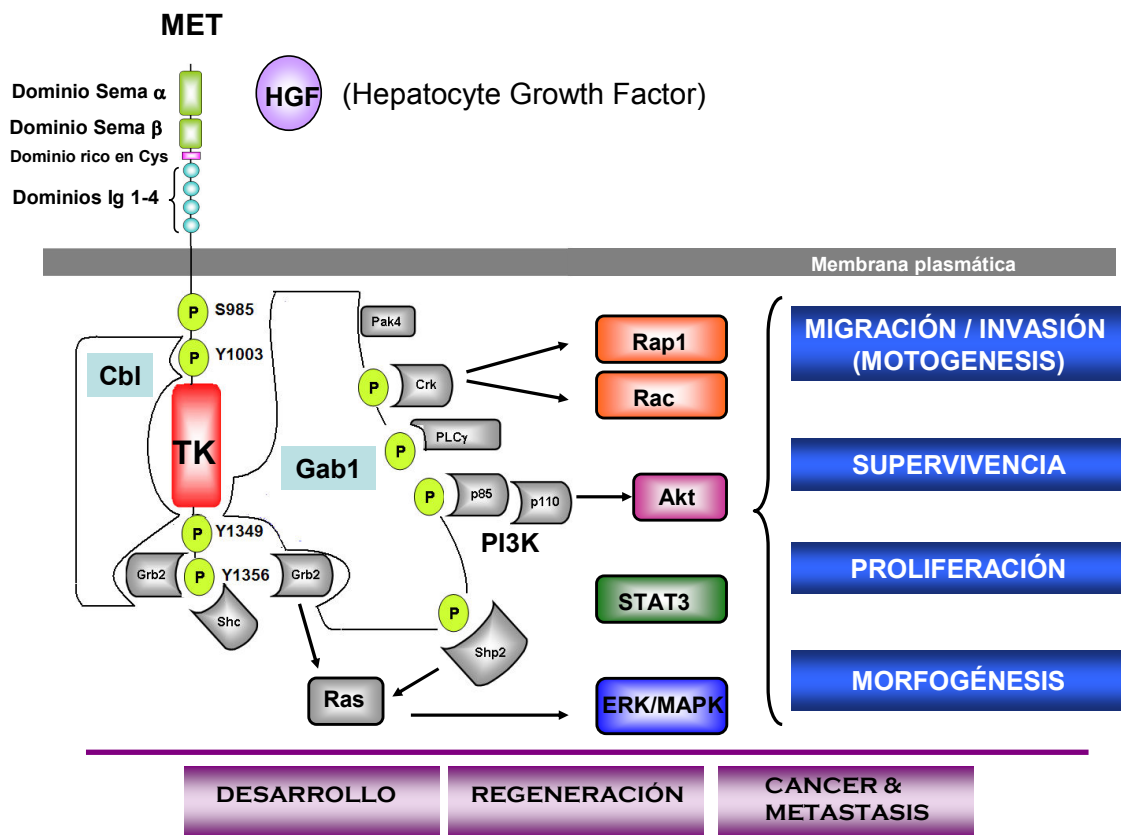
Cuando el HGF se une a su receptor induce su homodimerización y con ello la fosforilación cruzada entre los monómeros de Met en dos residuos de tirosina localizados en el dominio tirosina quinasa (Y1234 e Y1235). La eliminación de estas dos tirosinas impide la autofosforilación y por tanto la activación del receptor. A continuación, se fosforilan las tirosinas Y1349 y Y1356 en el dominio de anclaje C-terminal, que actuarán como puntos de anclaje para el reclutamiento y activación de proteínas adaptadoras y transductoras de la señal [Ferracini et al., 1991; Naldini et al., 1991a; Longati et al., 1994].

Además de esta regulación positiva por fosforilación, Met también está sujeto a una regulación negativa. Así, la fosforilación de un residuo de serina (Ser 985) localizado en la región yuxtamembrana, por la proteína quinasa C (PKC) y proteínas quinasas dependientes de calcio, inhibe la fosforilación en tirosina de la subunidad  $\beta$  del receptor y por tanto la actividad tirosina quinasa de Met [Comoglio, 1993; Bardelli et al., 1994].

El dominio de anclaje C terminal de la subunidad  $\beta$  de Met una vez fosforilado se asocia a numerosas proteínas adaptadoras y proteínas transductoras de señales intracelulares, a través de tres tipos de dominios: de homología con Src de tipo 2 (SH2), de unión a fosfotirosina (PBD) y de unión a Met (MBD). A su vez, estas proteínas se unen a otras proteínas adaptadoras y factores de transcripción a través de dominios de homología con Src de tipo 3 (SH3), modulando su actividad. Así, se ha descrito que Met puede interactuar con **Grb-2** (Growth factor receptor-bound protein 2), **Gab-1** (Grb-2-associated binding protein 1), **SHC** (Src homology 2 domain containing transforming protein), **Crk/CRKL** (v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like), **PI3K** (phosphatidylinositol 3-kinase), **rasGAP** (ras guanosine triphosphatase activating protein), **PLC- $\gamma$**  (phospholipase C-gamma), **p59FYN**, **pp60c-src**, el factor intercambiador de nucleótidos de guanina **SOS** (son of sevenless), las fosfatasas **Shp2** (Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase) y

**Ship1** (SH2 inositol 5-phosphatase 1) y el factor de transcripción **STAT-3** (signal transducer and activator of transcription 3) [revisado por Furge et al., 2000; Stuart et al., 2000; Nakamura et al., 2011].

Tras su activación, Met es ubiquitinado e internalizado, proceso que contribuye a la terminación de la señal y que es mediado por el complejo cbl-CIN85-endofilina [Jeffers et al., 1997; Peschard et al., 2001; Petrelli et al., 2002]. La E3-ubiquitin ligasa Cbl reconoce la Tyr 1003 fosforilada (localizada en el dominio yuxtamembrana) y marca al receptor para su degradación por el proteasoma. Se ha demostrado que HGF estimula de forma rápida la endocitosis de Met a través de vesículas recubiertas de clatrina [Hammond et al., 2001]. Una vez internalizado, Met viaja a través de un compartimento endosómico temprano hacia un compartimento perinuclear y también al aparato de Golgi, y es finalmente degradado de forma progresiva por el proteasoma [Jeffers et al., 1997].



**Figura 5.** Esquema de la señalización y las respuestas biológicas desencadenadas por la unión del HGF a su receptor Met.

### 3.1.3. Señalización intracelular y actividades biológicas inducidas por la vía de señalización de HGF/MET.

Como hemos mencionado, la capacidad de inducir proliferación celular y migración dispersiva (*scatter*) fueron las primeras funciones conocidas del HGF, por las que fue descubierto y que le dan nombre, pero que distan mucho de ser las únicas. De hecho el HGF es una molécula multifuncional que ejerce una gran variedad de efectos no solo en células epiteliales. Así, el eje HGF-Met contribuye al desarrollo del músculo esquelético controlando la migración de los precursores musculares [Bladt et

al., 1995] y juega un papel en el desarrollo del sistema nervioso, la remodelación ósea y la angiogénesis [Maina et al., 2001; revisado por: Birchmeier y Gherardi, 1998; Nakamura et al., 2011]. También hay que mencionar que el HGF estimula la diferenciación y proliferación de células precursoras hematopoyéticas humanas que expresan CD34 así como de células madre embrionarias humanas y células madre neuronales [Schuldiner et al., 2000; Kokuzawa et al., 2003; Kato et al., 2004]. En consecuencia, parece que la regulación mediada por HGF es un mecanismo común, crítico en la diferenciación y expansión de las células madre de los diversos órganos.

En condiciones fisiológicas, la ruta HGF/Met es esencial ya que induce y coordina distintos procesos, entre los que destacan la proliferación celular (mitogénesis), protección frente a apoptosis (supervivencia), diferenciación, motogénesis y morfogénesis. Esta última es una respuesta única inducida por el HGF y que consiste en la formación, a partir de células epiteliales, de estructuras tridimensionales complejas y ordenadas, entre las que destacan la formación de túbulos ramificados similares a los que se encuentran en órganos epiteliales, tales como el riñón o la glándula mamaria. La respuesta morfogénica es un fenómeno complejo que implica a su vez múltiples procesos que incluyen cambios en la polaridad y adhesión celular, migración, proliferación, diferenciación y apoptosis [Montesano et al., 1991; revisado por: Comoglio y Trusolino, 2002; Rosario y Birchmeier 2004; Karihaloo et al. 2005].

En conjunto, todos estos procesos son necesarios para establecer la arquitectura tisular y confieren al HGF un papel fundamental durante el desarrollo y regeneración de órganos epiteliales [revisado por Comoglio y Trusolino 2002; Birchmeier et al., 2003; Zhang y Vande Woude 2003; Tulasne y Foveau 2008; Trusolino et al., 2010; Nakamura et al., 2011]. En concreto, la vía del HGF/Met tiene un papel esencial en el desarrollo del hígado y la placenta [revisado por Matsumoto y Nakamura, 2006; Nakamura et al., 2011]. Ratones deficientes en HGF o Met mueren durante el desarrollo embrionario y presentan graves alteraciones en la placenta y el hígado, dos órganos que presentan la mayor expresión de HGF durante el desarrollo de ratón [Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995].

Por otra parte, se ha descrito la sobreexpresión tanto de HGF como de Met en distintos tipos de tumores, incluyendo los carcinomas hepatocelulares; así como la sobreactivación de Met, bien mediante un mecanismo autocrino de producción de HGF o bien mediante mutaciones de ganancia de función de Met. En definitiva, la activación inapropiada de la ruta HGF/Met parece estar implicada en la formación y progresión tumoral, contribuyendo al crecimiento, la supervivencia, angiogénesis, invasión y metástasis de una gran variedad de tumores sólidos. El HGF tiene un papel muy relevante en los procesos invasivos desarrollados por las células tumorales que comprenden varios procesos biológicos, como son la capacidad de la célula neoplásica para migrar e invadir tejidos adyacentes, sobrevivir en los nuevos compartimentos y proliferar y finalmente establecerse en sitios distantes del tumor original. Estos efectos se deben en gran medida a que el HGF es un importante mediador en las interacciones célula tumoral-estroma, un escenario que recuerda o emula las interacciones entre el epitelio y el mesénquima implicadas en la morfogénesis y regeneración/repación tisular y que influyen en la malignidad de un tumor [revisado por Vande Woude et al., 1997; Comoglio y Trusolino 2002; Birchmeier et al. 2003; Matsumoto y Nakamura 2006; Benvenuti y Comoglio 2007].

Las evidencias disponibles hasta el momento dejan claro que el HGF activa múltiples vías de transducción de señales y que moléculas transductoras específicas juegan un papel importante en algunas de las respuestas celulares a este factor. Además, sugieren que la especificidad de las respuestas al HGF propias de cada tipo celular tienen relación con el conjunto específico de proteínas adaptadoras y

transductoras que se expresa en ese tipo celular [Comoglio, 2001; Maina et al., 2001; Rosario y Birchmeier, 2003].

Como hemos visto, el dominio de anclaje C terminal de Met se asocia con proteínas que contienen el dominio SH2, como PI3K, Src, Grb2, SHC, SHP2, crk, PLC $\gamma$ 1 y el factor de transcripción STAT3. Met interacciona también con Gab1, una proteína multi-adaptadora muy importante en la señalización de Met que tras ser fosforilada por Met da lugar a sitios de unión adicionales para las proteínas anteriormente mencionadas. La asociación entre Met y GAB1 ocurre directamente a través de un sitio de unión a Met (MBD), pero también indirectamente a través de Grb2.

En conclusión, numerosas moléculas adaptadoras y transductoras participan en la señalización mediada por MET a través de las múltiples interacciones que establece el receptor, directamente, a través de Gab1 o con ambas. Así, finalmente se logra una activación eficiente de diferentes vías de transducción de señales como la ruta de las MAPK, incluyendo la vía de ERK, de p38 y de JNK, PI3K-AKT, STAT3 y NF $\kappa$ B.

En los últimos años se han logrado avances en la identificación de los componentes de la maquinaria de transducción de señales implicados en respuestas concretas, aunque el panorama es bastante complejo. Así, se ha demostrado que **Gab1-PLC $\gamma$**  media la tubulogénesis inducida por HGF; **c-Crk/CRKL** median la extensión celular (*spreading*) y migración; **PI3K/AKT** se requiere para diferentes procesos como la dispersión celular (*scatter*), la morfogénesis, la proliferación y la supervivencia; la ruta de **ERKs-MAPKs** se ha relacionado fundamentalmente con fenómenos de proliferación y migración; las vías **p38 y JNK** controlan diversos procesos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, transformación y apoptosis; la vía de **STAT3** se ha asociado con fenómenos de proliferación, transformación, tubulogénesis y diferenciación; y finalmente NF $\kappa$ B se ha relacionado con proliferación y supervivencia, **SHIP-1** con morfogénesis y **Src** con transformación celular [Maina et al., 2001; revisado por: Birchmeier y Gherardi, 1998; Birchmeier et al., 2003; Gao y Vande Woude, 2005; Trusolino et al., 2010].

### 3.2. La vía de HGF/Met y las células hepáticas

El HGF ha sido reconocido durante décadas como un factor de crecimiento implicado en la **respuesta proliferativa** de los hepatocitos durante la regeneración hepática [revisado por Michalopoulos, 2007]. Sin embargo, no ha sido hasta fechas muy recientes cuando se ha demostrado de manera inequívoca el papel fundamental de la vía HGF/met en la regeneración hepática. Así, los ratones knock out condicionales para Met o HGF específicos de hígado ven afectada de manera negativa la respuesta regenerativa [Borowiak et al., 2004; Huh et al., 2004; Phaneuf et al., 2004]. Estas observaciones indican que la ruta HGF/Met es esencial en procesos de regeneración hepática existiendo cascadas de señales asociadas a Met que no pueden ser compensadas por otras vías.

Así, se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo* que los hepatocitos que carecen de *Met* funcional muestran una supervivencia basal reducida y una mayor sensibilidad al daño hepático inducido por el sistema Fas-Fas ligando [Huh et al., 2004; Gomez-Quiroz et al., 2008]. En la misma línea, también se ha demostrado que los hígados de animales *Met*<sup>-/-</sup> tienen retrasada la reparación tisular tras necrosis inducida por CCl<sub>4</sub> [Huh et al., 2004]. Adicionalmente, se ha demostrado una supresión significativa de la progresión a través del ciclo celular cuando se impide la expresión de *Met* tras una hepatectomía parcial usando RNA de interferencia [Paranjpe et al., 2007].

En estos trabajos también se describe que durante la regeneración hepática la carencia de un receptor Met funcional, además de afectar a la proliferación, provoca una alteración en la expresión de genes implicados en **apoptosis**, observándose un aumento de genes pro-apoptóticos y disminución de la expresión de genes anti-apoptóticos. La generación de modelos de ratón deficientes en HGF o Met también ha permitido demostrar el importante papel antiapoptótico de esta ruta de señalización durante el desarrollo fetal del hígado [Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995]. Los embriones deficientes tanto en HGF como en *Met* tienen hígados anormalmente pequeños y una relación masa hepática/masa corporal disminuida, debido a una apoptosis masiva de los hepatocitos [Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995]. Más recientemente, se ha demostrado que en hepatocitos embrionarios primarios el HGF contrarresta la apoptosis dependiente de Fas actuando mediante PI3K y AKT para impedir la degradación de la proteína inhibitoria FLICE [Moumen et al., 2007]. Adicionalmente, en el hígado adulto numerosos trabajos han documentado una importante contribución de la actividad antiapoptótica del HGF en la protección del hígado durante fibrosis y otras alteraciones hepáticas [Owasagara et al., 1993; Kosai et al., 1998; Kosai et al., 1999; Ueki et al., 1999; Phaneuf et al., 2000; Xue et al., 2003; revisado por Sánchez y Fabregat 2010], ampliando así los escenarios en los que es importante la actividad anti-apoptótica del HGF.

En conjunto, estos trabajos proporcionan claras evidencias de un papel de este sistema ligando/receptor en promover la proliferación y supervivencia de hepatocitos y por tanto en la remodelación tisular durante la regeneración hepática, el desarrollo fetal y la resolución de fibrosis y otras alteraciones hepáticas.

Además de sus efectos en hepatocitos, en los últimos años se ha puesto de manifiesto el relevante papel de la señalización HGF/Met en la funcionalidad y actividades biológicas de las células madre/progenitoras hepáticas. En cuanto a la **proliferación** celular, durante la activación *in vivo* del compartimento de células ovals en respuesta a un daño hepático (tratamiento con 2-AAF/PH) se observa un incremento significativo de la expresión de HGF, principalmente en las regiones periportales, coincidiendo con la proliferación de las células ovals [Nagy et al. 1996; Hu et al., 1993; Alison et al. 1993; revisado por Sánchez y Fabregat 2010]. En esta línea, se ha observado que la infusión *in vivo* de HGF durante la regeneración hepática inducida por AAF/PH acelera la proliferación de las células ovals [Nagy et al., 1996; Shiota et al., 2000]. Asimismo, se ha demostrado la actividad mitogénica del HGF en líneas de células ovals de rata y ratón, bien mediante la sobreexpresión de HGF o bien por adición de HGF exógeno [Okano et al., 2003; Yao et al., 2004; Kato et al., 2007; del Castillo et al., 2008a; revisado por Sánchez y Fabregat, 2010].

Sin embargo, el HGF es mucho más que un mitógeno para las células madre/progenitoras hepáticas y existen evidencias de su papel como promotor de **supervivencia**. El HGF protege frente a la apoptosis inducida por  $TNF\alpha$  a una línea de células epiteliales de hígado con propiedades análogas a las células ovals, WB-F344 [Yao et al., 2004]. Más recientemente, nuestro grupo ha demostrado, mediante el uso de un modelo *in vitro* de células ovals modificadas genéticamente que portan un receptor Met sin actividad tirosina quinasa, que la pérdida de Met aumenta la sensibilidad a la apoptosis inducida por falta de suero o por tratamiento con  $TGF-\beta$  [del Castillo et al., 2008a]. Atendiendo a estos resultados, es factible que la actividad anti-apoptótica dependiente de Met desempeñe una función importante como apoyo a la expansión de las células progenitoras hepáticas tras un daño hepático, al ayudarlas a sobreponerse a las señales inhibitorias y citotóxicas del hígado dañado.

En líneas derivadas de células epiteliales no parenquimáticas de hígado de ratón el HGF induce una **respuesta morfogénica** que incluye dispersión celular y formación de ductos ramificados en geles de colágeno, respuestas que no producen otros factores de crecimiento como EGF,  $TGF\alpha$ , aFGF (acidic Fibroblast Growth

Factor) o insulina [Johnson et al., 1993]. Se ha descrito una respuesta similar en células ovas pancreáticas, una población celular íntimamente relacionada con la población de células ovas hepáticas [Jeffers et al., 1996].

Recientemente, también se ha demostrado una implicación directa de HGF en la promoción de la **motilidad e invasividad** de células progenitoras hepáticas fetales humanas, efecto que es mediado parcialmente por la degradación de la matriz extracelular mediante metaloproteasas de matriz (MMPs) y la activación de la vía ERK1/2 MAPKs [Delgado et al., 2009].

Otra importante actividad biológica del HGF que no puede dejar de mencionarse es su efecto modulador en la **diferenciación** de estas células. Así, numerosos trabajos han descrito que la diferenciación de células madre hepáticas embrionarias hacia hepatocitos requiere de HGF [Suzuki et al., 2000; Minguet et al., 2003; Suzuki et al., 2002; Suzuki et al., 2003; revisado por Sánchez y Fabregat, 2010]. Además, el HGF está presente en prácticamente todas las estrategias para la diferenciación *in vitro* de células madre/progenitoras embrionarias y adultas de distintos orígenes hacia hepatocitos [revisado por Snykers et al., 2009]. Tras el nacimiento, la expresión tanto de HGF como de Met aumentan significativamente en el hígado, ayudando a la maduración completa del hepatocito [Hu et al., 1993; Kamiya et al., 2001]. Nuestro grupo también ha descrito que el HGF ayuda a mantener la expresión de marcadores de diferenciación en hepatocitos fetales de rata en cultivo tratados con TGF- $\beta$ , cuyo efecto es inducir una pérdida de marcadores hepatocíticos [Sánchez et al., 1995; Fabregat et al., 1996]. En hepatocitos neonatales primarios de rata, el HGF aumenta la expresión de marcadores de diferenciación de hepatocitos [Pagan et al., 1997; Pagan et al., 1999].

En conjunto, todos estos datos sugieren que el sistema HGF/Met regula algunos aspectos esenciales de la biología de las células madre/progenitoras hepáticas.

Respecto al modo de acción del HGF, ya se ha comentado previamente que se considera de manera general una acción paracrina [Sonnenberg et al., 1993]. En el hígado, el HGF es producido principalmente por las células mesenquimales: células estrelladas y células del endotelio sinusoidal [Schirmacher et al., 1992; Ramadori et al., 1992; LeCouter et al., 2003], mientras que el receptor Met se expresa en las células epiteliales: hepatocitos, colangiocitos y células progenitoras hepáticas [Hu et al., 1993; Suzuki et al., 2000; Prat et al., 1991; Matsumoto et al., 1994; revisado por Sánchez y Fabregat 2010]. Sin embargo, estudios *in vitro* de nuestro laboratorio utilizando líneas de células ovas han demostrado un mecanismo autocrino para HGF/Met implicado en la protección frente a apoptosis [del Castillo et al., 2008a] quedando por explorar la relevancia de este fenómeno *in vivo*.

Como se ha comentado anteriormente, la desregulación de la vía HGF/Met, está relacionada con el desarrollo de múltiples tumores y procesos de invasión [revisado por Matsumoto y Nakamura, 2006; Nakamura et al., 2011]. En el contexto hepático se han descrito múltiples alteraciones de la vía de señalización de HGF/Met asociadas al hepatocarcinoma celular, que incluyen mutaciones activadoras, amplificación y sobreexpresión del ligando y del receptor. Sin embargo, el papel que juega dicha señalización no está completamente esclarecido, existiendo evidencias controvertidas que apuntan tanto a un papel supresor como promotor tumoral [revisado por Sánchez y Fabregat, 2009].

## 4. La vía de señalización del EGFR y su relevancia en el contexto hepático.

### 4.1. Familia ErbB. Ligandos y receptores

El receptor del EGF (EGFR, de Epidermal Growth Factor Receptor), también conocido como ErbB-1 o HER1, es uno de los miembros de la familia de proteínas ErbB, la cual comprende cuatro receptores (ErbB 1-4, también llamados HER1-4) y 11 ligandos extracelulares polipeptídicos que contienen un dominio conservado EGF (Epidermal Growth Factor). Esta familia ErbB se considera un prototipo de la familia de receptores tirosina quinasa (RTKs).

ErbB1 se descubrió originalmente como un oncogén a principios de los 80. Desde entonces el intenso estudio de esta familia de receptores ha llevado a conocer su papel primordial en la mediación de las interacciones célula-célula y célula-mesénquima durante la organogénesis fetal y también en la fisiología de los tejidos adultos y en diversas patologías como el cáncer. Regula una gran variedad de procesos celulares que incluyen diferenciación, proliferación, supervivencia, diferenciación y motilidad celular [revisado por Citri y Yarden, 2006].

#### 4.1.1. Ligandos de los receptores ErbB

Los ligandos conocidos que se unen a receptores de la familia ErbB son: EGF, TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor alfa), AFR (anfiregulina), EREG (epiregulina), BTC ( $\beta$ -celulina), epigeno, HB-EGF (Heparin-Binding EGF), NRG1 (Neuregulin 1), NRG2 (Neuregulin 2), NRG3 (Neuregulin 3) y NRG4 (Neuregulin 4) [revisado por Yarden y Sliwkowski, 2001].

Los precursores de todos los ligandos de la familia ErbB tienen una estructura común consistente en un motivo EGF (que consta de seis residuos de cisteína y tres lazos intracelulares mantenidos por puentes disulfuro) flanqueados por un dominio N-terminal y otro C-terminal de anclaje a la membrana. Estos precursores transmembrana generalmente contienen, además del dominio EGF, otros dominios estructurales como dominios inmunoglobulina, sitios de unión a heparina y regiones de unión glicosiladas. Las formas solubles de estos ligandos se producen por corte proteolítico del dominio extracelular [revisado por Gschwind et al., 2004] mediado por una actividad metaloproteasa. Se ha implicado a varios miembros de la familia ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) [Ohtsu et al., 2006], pero parece que son ADAM17, también conocida con el nombre de TACE (TNF- $\alpha$ -converting enzyme), junto con ADAM10 las que tienen un papel central en el procesamiento de estos ligandos [Kenny, 2007]. ADAM17 puede cortar los precursores de AR, EREG, TGF- $\alpha$ , y HB-EGF, mientras que ADAM 10 es la proteasa clave para el corte de EGF y BTC, y puede también cortar el precursor de HB-HGF [revisado por Berasain et al., 2009]. Por tanto, la actividad proteolítica de ADAMs es crucial para la generación de ligandos solubles de EGFR y la activación de receptores de la familia ErbB.

La expresión y procesamiento de los precursores está muy regulada. La **expresión** de varios ligandos de ErbBs aumenta en respuesta a la transformación por Ras activo, a hormonas esteroideas [Dickson y Lippman, 1987] y al estrés oxidativo [Chen et al., 2001]. En este sentido, resultados de diferentes grupos incluido el nuestro, indican que el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que es modulado por estrés oxidativo [Gloire et al., 2006] regula la expresión de ligandos del EGFR [Sato et al., 2006; Murillo et al., 2007]. Además, la propia vía de señalización del EGFR induce la expresión de los ligandos: TGF- $\alpha$  y HB-EGF [revisado por Citri y Yarden, 2006]. El **procesamiento de los precursores** mediante corte por metaloproteasas puede ser estimulado mediante la activación de otros receptores, como GPCRs (G-Protein Coupled Receptors), cuya activación conduce a la activación de las ADAMs con la

participación de la quinasa Src, la PKC (Protein Kinase C), radicales de oxígeno o iones de calcio [revisado por Berasain et al., 2007].

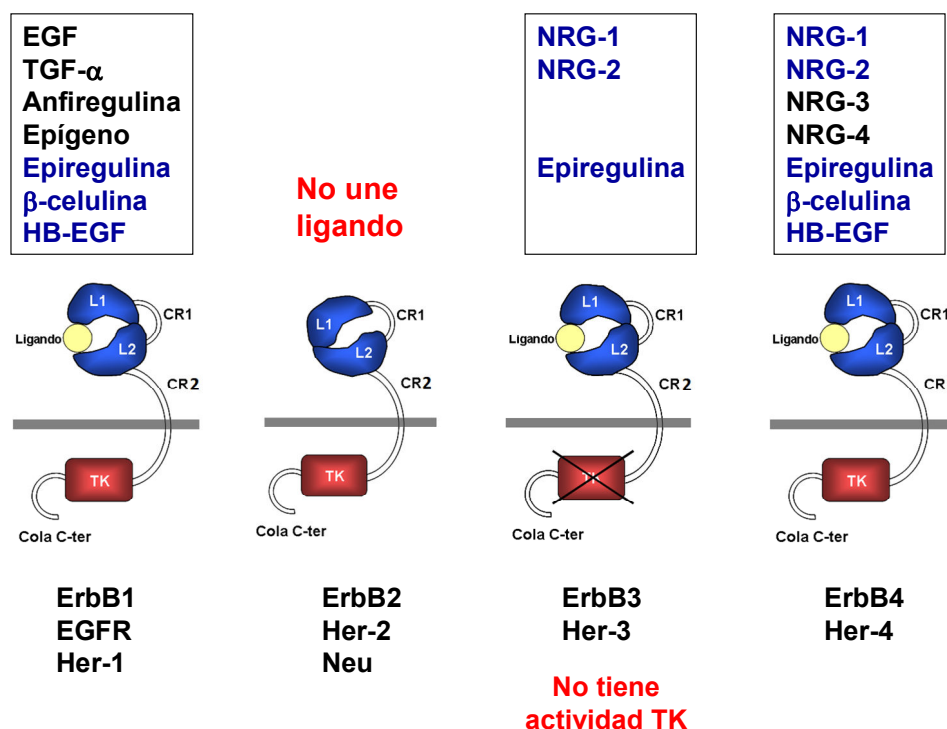
Los ligandos del EGFR ejercen sus funciones de forma autocrina, paracrina y yuxtacrina [revisado por Singh y Harris, 2005].

#### 4.1.2. Receptores de la familia ErbB

Se conocen cuatro receptores dentro de la familia de proteínas Erb: ErbB1, ErbB2 (HER-2 o neu), ErbB3 y ErbB4.

Los receptores de esta familia se producen en forma de proteínas precursoras transmembrana glicosiladas y necesitan procesamiento proteolítico para dar lugar a la forma madura. Por ejemplo, el EGFR se sintetiza como un precursor que tras la eliminación de un fragmento en el extremo N-terminal deja una proteína de 170 kDa, que se localiza en la membrana celular [revisado por Jorissen et al., 2003].

Los receptores se componen de un dominio extracelular N-terminal grande (que contiene un sitio de unión a ligando y un brazo de dimerización), con 4 subdominios. Los subdominios I y III (también llamados L1 y L2) son repeticiones ricas en leucinas que intervienen en la unión a ligando. Los dominios II y IV (también llamados CR1 y CR2) son ricos en cisteínas y tienen estructura similar a laminina. A continuación del dominio N-terminal se encuentra un dominio transmembrana, un dominio pequeño intracelular yuxtamembrana, el dominio tirosina quinasa y una cola C-terminal en la que se encuentran los sitios de anclaje para las proteínas adaptadoras y efectoras que unen fosfotirosinas [Normanno et al. 2005].



**Figura 6.** Familia de proteínas ErbB, que comprende cuatro receptores (ErbB 1-4, también llamados HER1-4) y 11 ligandos extracelulares polipeptídicos.

Distintos trabajos utilizando ratones transgénicos y knock out han servido para clarificar las funciones de los ErbBs individuales y sus ligandos durante el desarrollo de mamíferos y han puesto de manifiesto que la señalización por ErbB1 no puede ser sustituida por ningún otro receptor y que su ausencia es letal. De hecho, ErbB1 es esencial en el control de procesos de proliferación, migración y diferenciación en células epiteliales. Aunque ErbB1 no puede ser sustituido por ningún otro receptor [Miettinen et al., 1995; Threadgill et al., 1995; Sibillia y Wagner, 1995; Sibilia et al., 1998], sus ligandos son funcionalmente redundantes y su eliminación individual solo da lugar a alteraciones fenotípicas puntuales en algunos tejidos sugiriendo estos datos que cada ligando de la familia ErbB tiene una función diferente y específica de tejido [Mann et al., 1993; Luetkeke et al., 1999; Troyer et al., 2001].

#### 4.1.3. Activación de la vía modulada por los receptores ErbB

##### Dimerización del receptor y unión a ligando

La unidad funcional básica en la señalización ErbB es un dímero de receptores. Cada miembro de la familia ErbB puede dimerizar consigo mismo o con cualquiera de los otros 3 miembros de la familia [revisado por Citri y Yarden, 2006]. Las evidencias disponibles hasta el momento indican que los receptores ErbB existen en un estado pre-dimerizado [Gadella y Jovin, 1995] y la unión del ligando a este pre-dímero da lugar a un complejo formado por dos moléculas de ligando y dos receptores [Lemmon et al., 1997; Sako et al., 2000].

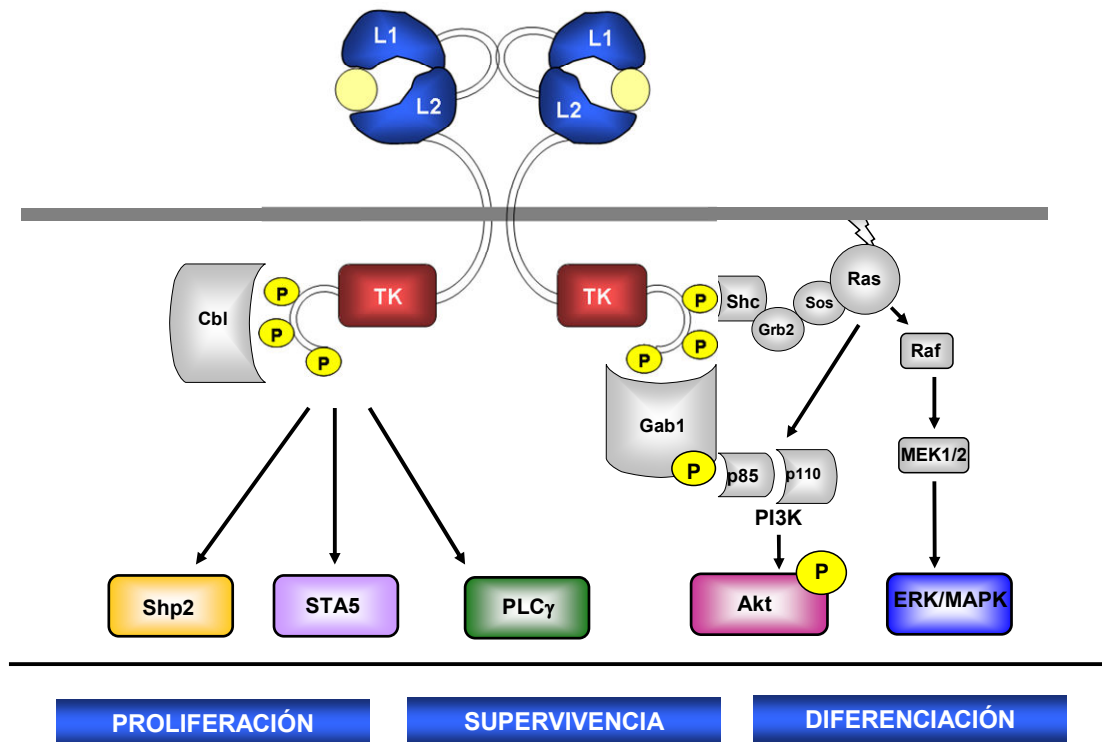
Los distintos receptores ErbB tienen diferentes especificidades de unión a ligando [revisado por Citri y Yarden, 2006]. ErbB1 une de manera específica EGFR, TGF- $\alpha$ , anfiregulina y epígeno, aunque también une otros ligandos más promiscuos como HB-EGF,  $\beta$ -celulina y epiregulina. ErbB2 no tiene capacidad de unir ningún ligando [Tzahar et al., 1996; Klapper et al., 1999]. ErbB3, que carece de actividad tirosina quinasa, une tres ligandos: epiregulina, NRG-1 y NRG-2. Por su parte, ErbB4 une, además de neuregulinas,  $\beta$ -celulina y HB-EGF así como dos ligandos de baja afinidad, epiregulina y epígeno.

##### Unión a proteínas adaptadoras

Tras la unión del ligando al receptor, se activa el dominio tirosina quinasa y cada subunidad transfosforila a su pareja. Como consecuencia se generan una serie de fosfotirosinas en el extremo C-terminal, que sirven para el reclutamiento posterior de diversas proteínas adaptadoras y efectoras, como las proteínas **Grb2**, **Grb7**, **Shc**, **Gab1**, fosfatasa como **SHP1** y **SHP2**, **PLC- $\gamma$** , **Src** y **PI3K**. Asimismo, el EGFR activa otras señales como la **PLD** (de Phospholipase D) y los factores de transcripción **STAT1**, **3** y **5** [revisado por Berasain et al., 2007].

El conjunto específico de proteínas de unión a fosfotirosinas que son reclutadas al receptor activo determinan la especificidad y la potencia de las señales intracelulares desencadenadas por la unión de los ligandos a sus receptores. A su vez, el conjunto de proteínas reclutadas está determinado por el ligando y por la composición del heterodímero [Olayioye et al., 1998], ya que, a pesar de compartir varias vías, cada receptor de la familia ErbB se fosforila en residuos distintos y por tanto está acoplado con un conjunto distinto de proteínas de señalización [revisado por Citri y Yarden, 2006]. En concreto, el ErbB1 fosforilado recluta varias proteínas adaptadoras, como Grb2 y Shc que son las responsables de reclutar Ras y por tanto activar las cascadas de Ras-MAPKs y Ras-PI3K-AKT. No se ha encontrado ningún sitio que sirva como punto de anclaje directo para PI3K. Otro sustrato directo de ErbB1 es STAT5 (Signal Transducer and activator of transcription-5) [Schulze et al., 2005].

Las dos vías más importantes por su relevancia en procesos de proliferación, supervivencia y cáncer, activadas por el EGFR son las vías de Ras/ERKs y PI3K/Akt. La vía Ras-MAPK y Shc-MAPKs son dianas invariables de todos los ligandos ErbB, y las vías PI3K-Akt y p70S6K/p85S6K son activadas por la mayoría de dímeros activos ErbB. Sin embargo, la cinética y la potencia de la activación de PI3K difieren, probablemente debido a que PI3K se acopla directamente con ErbB3 y ErbB4, pero indirectamente con ErbB1 y ErbB2 [Soltoff y Cantley, 1996].



**Figura 7.** Esquema de la señalización y las respuestas biológicas desencadenadas por la activación del EGFR.

#### 4.1.4. Regulación de la señalización ErbB

##### 4.1.4.1. Endocitosis del receptor inducida por ligando

Uno de los mecanismos de regulación temprana de los receptores ErbB es la internalización del receptor. El conocimiento actual de la regulación por endocitosis de los receptores ErbB se basa principalmente en los datos disponibles sobre el comportamiento de ErbB1 tras la unión de EGF [Dikic 2003; Bache et al. 2004; Gruenberg y Stenmark 2004]. En muchas células, ErbB1 se encuentra en caveolas. Tras la unión del ligando, las moléculas de ErbB1 se agrupan sobre regiones cubiertas de clatrina en la membrana plasmática, que se invaginan para formar vesículas endocíticas. Los receptores internalizados tienen dos posibles destinos: el reciclado y retorno a la membrana plasmática o la degradación en lisosomas. La disociación de los complejos lleva a reciclado, mientras que la activación continua de fosforilación en tirosinas en el endosoma lleva a reclutamiento de Cbl, una E3-ubiquitin ligasa que une los dímeros de ErbB1 [Muthuswamy et al., 1999] y los dirige a degradación lisosomal mediante su ubiquitinización [Levkowitz et al., 1998].

La internalización y degradación de RTKs determina la duración de la señal por lo que muchos efectores han desarrollado la capacidad de modular la endocitosis del receptor, bien interceptando la estabilidad y actividad de Cbl [Jozic et al., 2005] o bien revertiendo dos modificaciones covalentes esenciales: fosforilación y ubiquitinación [Clague & Urbe 2006].

#### **4.1.4.2. Regulación por retroalimentación positiva: producción autocrina de ligandos**

Un mecanismo de retroalimentación positiva de la señalización por EGF se basa en regular la producción autocrina de ligando. La señalización por ErbB1 activada por ligandos autocrinos está implicada en el desarrollo y morfogénesis de distintos tejidos, como glándula mamaria [Li et al., 1992; Panico et al., 1996; Wiesen et al., 1999] y próstata [Kim et al., 1999], y procesos de cicatrización de heridas por queratinocitos de la piel [Piepkorn et al., 1998]. Los bucles autocrinos también se producen en condiciones patológicas, por ejemplo en infecciones víricas y cáncer. En este último caso tienen profundas implicaciones clínicas, ya que el aumento en la expresión de factores de crecimiento está asociado con lesiones malignas más agresivas [Sheng et al., 2010]. De acuerdo con esto, se han aprobado para el tratamiento de cáncer colorrectal y otros tipos de cáncer algunos anticuerpos monoclonales que bloquean la unión del ligando al EGFR [Khambata-Ford et al., 2007].

#### **4.1.4.3. Regulación por moduladores negativos.**

La cascada del ErbB induce la expresión de distintos moduladores negativos, incluidos SOCS5 (Supressor of Cytokine Signalling-5), que conduce a una marcada reducción de los niveles de ErbB1 debido a un aumento de su degradación [Kario et al., 2005], la proteína adaptadora SPRY (Sprouty), que regula negativamente la vía Ras-MAPK mediante varios mecanismos [Reich et al., 1999; Hanafusa et al., 2002; Yusoff et al. 2002], o LRIG1 (Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains-1), que induce la ubiquitinación y degradación de ErbB1 mediante el reclutamiento de Cbl [Laederich et al., 2004; Gur et al., 2004]. Otro mecanismo de retroalimentación negativa que funciona por debajo del receptor consiste en la regulación de la expresión de fosfatasas de MAPK de especificidad dual, que por tanto definen el esquema temporal de activación de MAPK [Bluthgen et al., 2009].

#### **4.1.4.4. Regulación por microRNAS.**

La regulación de miRNAs ha emergido con fuerza como un nuevo componente regulador, esencial tanto para la regulación temprana como tardía de la señalización por EGF [Avraham et al., 2010]. La estimulación de células epiteliales de mama con EGF lleva a la inducción rápida de más de 20 miRNAs en paralelo con la desaparición inmediata de aproximadamente 25 mRNAs.

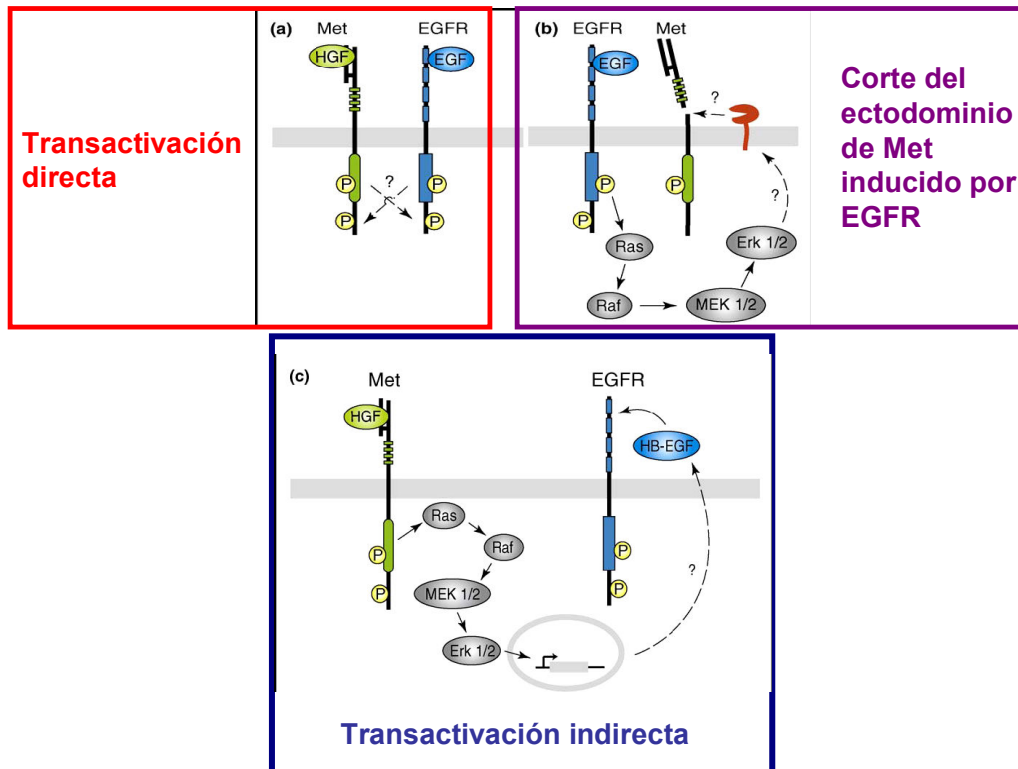
#### **4.1.5 Interacción cruzada (crosstalk) de los receptores ErbB con otras vías de señalización.**

La red ErbB integra no sólo sus propias señales, sino también señales procedentes de otros factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, linfocinas e inductores de estrés [revisado por Carpenter, 1999]. Algunos de los mecanismos que median esta interacción cruzada, son:

- activación de metaloproteasas que conduce a un aumento de la concentración de ligandos bioactivos. Por ejemplo, ciertos ligandos de GPCRS como el ácido lisofosfatídico (LPA) o ligandos peptídicos vasoactivos, transactivan EGFR estimulando metaloproteinasas que cortan el precursor de membrana de HBEGF para convertirlo en un ligando soluble [Prenzel et al., 1999].

-transfosforilación de ErbBs mediante protein quinasas activadas por otras vías. Esta transfosforilación se puede producir en tirosinas (regulación positiva) o en residuos de Ser o Thr (generalmente regulación negativa). Se ha descrito transactivación de ErbB1 por Src en respuesta a GPCRs [Biscardi et al., 1999; Chen et al., 2012] y receptores no GPCRs, como uPAR [Guerrero et al., 2004]; así como por la tirosina kinasa regulada por citoquinas, Jak2 [Wong et al., 1992; Yamauchi et al., 1997; Yamauchi et al., 2000]. Existe una regulación negativa mediante la fosforilación en serinas y treoninas de ErbB1 y ErbB2 mediada por PKC activada por ciertas hormonas y factores de crecimiento (por ejemplo PDGF y el propio EGF) [revisado por Yarden y Sliwkowski, 2001].

En los últimos años se han acumulado evidencias que apoyan la idea de que en células tumorales la transducción aberrante de señales puede ser mediada mediante una interacción cruzada entre RTKs. En el caso concreto del *crossstalk* entre Met y EGFR, este fenómeno tiene implicaciones clínicas, habiéndose identificado en los últimos años, un papel relevante de Met en la resistencia a tratamientos antitumorales mediante inhibidores de EGFR, lo que implica que Met y EGFR pueden desempeñar funciones redundantes, haciendo que la inhibición de uno de los receptores lleve a la célula a “encender” el otro RTK para mantener la activación de las vías de señalización diana [revisado por Lai et al., 2009]. Esta interacción cruzada entre Met y EGFR no sólo se ha descrito en células tumorales, sino también en células no transformadas [Scheving et al., 2002; Singh et al., 2004; Spix et al., 2007; Xu y Yu 2007; Accornero et al., 2009]. Todo esto ha llevado a un estudio en profundidad de los mecanismos de interconexión que se producen entre las vías mediadas por Met y EGFR, de tal modo que en la actualidad está aceptado que la interacción cruzada entre RTKs puede ocurrir directa o indirectamente y puede tener efectos aditivos o antagonicos.



**Figura 8.** Mecanismos descritos para la interacción cruzada entre los receptores Met y EGFR

Los mecanismos descritos hasta el momento para el crosstalk entre Met y EGFR son:

a) Transactivación directa. La estimulación con HGF o EGF dispara la fosforilación de Met y EGFR, respectivamente, y el receptor activo puede transactivar al otro receptor. Hasta el momento no está claro si los ligandos, HGF o ligandos del EGFR, pueden inducir heterodimerización de ambos receptores o si un receptor transfosforila al otro directamente.

b) Transactivación indirecta, que puede tener lugar mediante dos mecanismos. Tras la unión de HGF a Met (1) se activa Src, que a su vez fosforila EGFR y (2) se activa la vía Ras-MAPK, que induce la transcripción de HB-EGF y su exportación al exterior celular donde transactiva de manera indirecta el EGFR [Reznik et al., 2008].

c) Corte proteolítico del ectodominio de Met. La unión de ligando al EGFR lleva a la activación de la vía Ras-ERK1/2 MAPKs que promueve el corte del ectodominio de Met mediante una metaloproteasa, aunque se desconoce cómo se transduce la señal desde ERK1/2 hasta el corte proteolítico [Nath et al., 2001; Xu y Yu 2007]. El efecto del corte del ectodominio de Met no está claro, pues se han descrito efectos contradictorios de los fragmentos resultantes del corte de Met. Así, la proteína Met truncada puede ser oncogénica, ya que se ha documentado que un receptor Met sin dominio extracelular puede promover proliferación, invasión y transformación de fibroblastos NIH 3T3 [Merlin et al., 2009]. Por el contrario, el corte de Met inducido tanto por camptotecina o  $TNF\alpha$ /actinomicina D produce un fragmento citoplásmico pro-apoptótico de 40 KDa y un fragmento de 100 KDa que comprende las regiones extracelular y transmembrana, que puede actuar como un receptor señuelo (llamado decoy Met) que impide la señalización por HGF [Tulasne et al., 2004].

Además de estos mecanismos a nivel de membrana plasmática, la interacción entre RTKs puede influir en la capacidad de estos para entrar en la vía endocítica y de esta manera afectar a la estabilidad de RTKs y la localización y duración de la señal.

#### 4.2. Relevancia de ErbB1 (EGFR) y sus ligandos en células hepáticas

El EGFR fue por primera vez relacionado con procesos de regeneración hepática cuando en 1981, Earp y O'Keefe, describieron como tras una hepatectomía parcial el EGFR se fosforila y sus niveles disminuyen, debido posiblemente a la unión de su ligando y posterior endocitosis. De los ligandos del EGFR, tanto el TGF- $\alpha$  como el EGF son reconocidos reguladores de la proliferación de hepatocitos. Su infusión en el hígado de ratas adultas induce la síntesis de DNA [Liu et al., 1994]. Además, estimulan el crecimiento de hepatocitos en cultivo primario en cualquier estadio del desarrollo: fetal, neonatal y adulto [Draghi et al., 1980; McGowan et al., 1981; Sawada et al., 1988; de Juan et al., 1992a; revisado por Sánchez y Fabregat 2010]. Junto con el HGF, los ligandos del EGFR 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 [revisado por Michalopoulos 2007]. A pesar de que existe cierta redundancia entre los ligandos del EGFR, parece que en el contexto hepático la redundancia no es completa. Así, ratones deficientes en TGF- $\alpha$  muestran una regeneración hepática normal [Russell et al., 1996] mientras que ratones deficientes en anfirregulina o HB-EGF manifiestan una regeneración deficiente [Berasain et al., 2005; Mitchell et al., 2005] e inversamente, ratones que sobreexpresan HB-EGF muestran una mayor regeneración hepática [Kiso et al., 2003; Mitchell et al., 2005]. Recientemente se ha demostrado la función crucial del EGFR en la **proliferación** de hepatocitos durante las fases iniciales de la regeneración hepática mediante la generación de un modelo murino deficiente en EGFR de manera específica de hígado [Natarajan et al., 2007]. Aunque la delección de

EGFR en hígado adulto no afectó a la función hepática, tras hepatectomía parcial estos ratones mostraban una mayor mortalidad y daño hepático. La regeneración hepática estaba retrasada debido a una reducción en la proliferación de hepatocitos (y no debido a un aumento en la apoptosis) a causa de una progresión G1-S deficiente.

El EGFR es una importantísima vía de **supervivencia** en el hígado [revisado por Fabregat 2009]: el EGF es capaz de abolir completamente la respuesta apoptótica inducida por TGF- $\beta$  en hepatocitos fetales de rata [Fabregat et al., 1996], efecto dependiente de la vía PI-3K/Akt [Fabregat et al., 2000]. Además, la activación de la vía del EGFR bloquea la generación de radicales de oxígeno inducida por el TGF- $\beta$  [Carmona-Cuenca et al., 2006]. El EGF y el TGF- $\alpha$  también impiden la apoptosis inducida por Fas en diferentes modelos de hepatocitos [Musallam et al., 2001; Kanda et al., 2002].

Además, los ligandos del EGFR también parecen ser importantes moduladores de la **diferenciación** de hepatocitos. Análisis morfológicos y de expresión génica de nuestro grupo y colaboradores han demostrado que el EGF, en cooperación con otras citoquinas y hormonas, mantiene o induce el estado de diferenciación de hepatocitos primarios fetales y neonatales [Pagan et al., 1999; de Juan et al., 1992b; Sánchez et al., 1998; revisado por Sánchez y Fabregat, 2010].

En células progenitoras hepáticas, se ha observado que la vía de EGF está implicada en fenómenos de **proliferación**. Tanto la expresión de TGF- $\alpha$  como de EGFR aumentan durante el período de proliferación activa y diferenciación de las células progenitoras en hígados de ratas sometidas al protocolo 2-AAF/PH [Evarts et al., 1992], y parecen ser los responsables de la proliferación temprana del compartimento de células progenitoras [Evarts et al., 1993; Nagy et al. 1996]. Nuestro laboratorio y otros también han demostrado que el EGF y el TGF $\alpha$  son mitógenos para células ovas de rata y ratón *in vitro* [Isfort et al., 1998; Cheung et al., 2007; del Castillo et al., 2008a; revisado por Sánchez y Fabregat 2010]. La infusión *in vivo* con EGF tras un daño hepático disminuye la apoptosis, sugiriendo que esta vía también estaría implicada en fenómenos de **supervivencia** de las células progenitoras [Nagy et al., 1996]. También se han documentado efectos **motogénicos, morfogénicos y de diferenciación** inducidos por el EGF. De hecho, combinado con TGF- $\beta$ , induce una respuesta de *scattering* en líneas de células ovas *in vitro* [Isfort et al., 1998]. Además, el EGF está presente de manera habitual como factor hepatogénico en estrategias para inducir la diferenciación *in vitro* de células madre/progenitoras a células con marcadores hepatocíticos [revisado por Snykers et al., 2009]. Consistentemente, resultados de nuestro grupo indican que líneas celulares T $\beta$ T-FH, una población celular de hepatocitos fetales que han sufrido transición epitelio-mesénquima y desdiferenciación como consecuencia de tratamiento con TGF- $\beta$ , recuperan el fenotipo epitelial y ganan expresión de citoqueratina 19 al ser tratadas con EGF y DMSO, lo que sugiere una re-diferenciación de estas células [del Castillo et al., 2008 b].

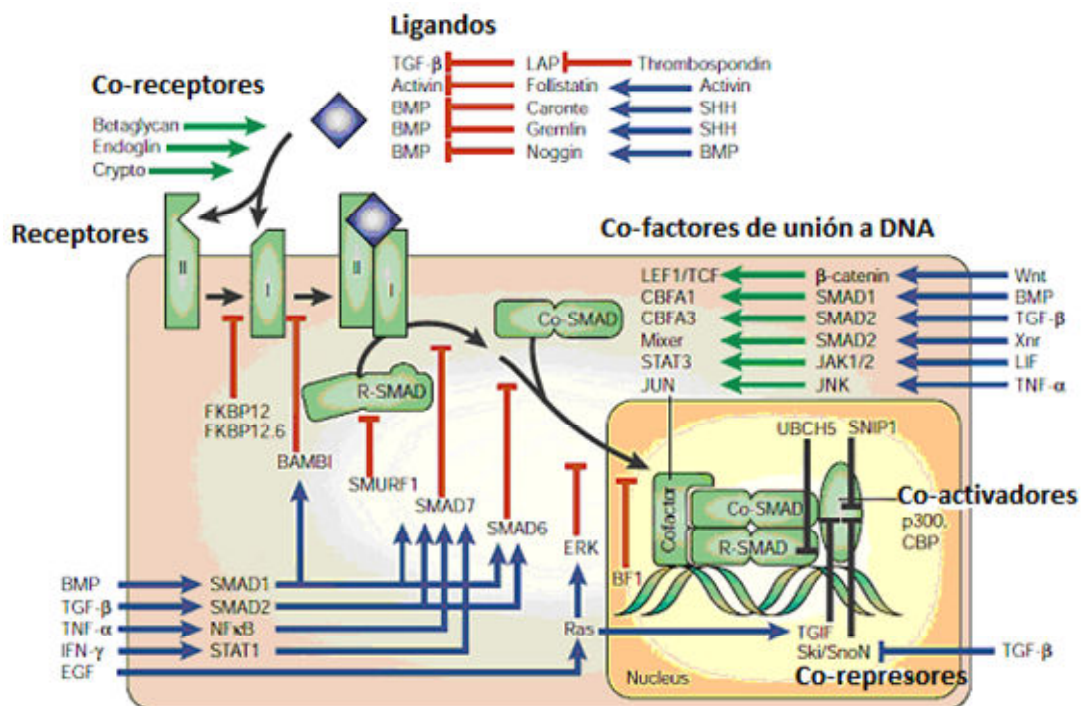
## 5. La vía de señalización del TGF- $\beta$

La superfamilia del TGF- $\beta$  comprende más de 30 **ligandos que** incluyen TGF- $\beta$ s 1–3 (Transforming Growth Factor beta), activinas (A, B), inhibinas (A, B), BMPs 1-20 (Bone Morphogenetic Proteins), MIS/AMH (Müllerian inhibiting substance, también llamada Anti-Müllerian hormone), GDFs (Growth and Differentiation Factors) y Nodal [revisado por Gordon y Blobel, 2008; revisado por Santibañez et al., 2011]. Prácticamente todas las células del cuerpo humano expresan y responden a, al menos, un miembro de esta superfamilia [Siegel y Massagué 2003].

Los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  regulan una gran variedad de procesos celulares durante el desarrollo embrionario y en tejidos adultos [revisado por Gordon y Blobbe, 2008]. No es sorprendente por tanto, que alteraciones en las vías de señalización de la superfamilia del TGF- $\beta$  provoquen enfermedades en humanos, incluyendo alteraciones del desarrollo, enfermedades vasculares y cáncer [revisado por Massagué et al., 2000a; revisado por Blobbe et al., 2000; Santibáñez et al., 2011].

Existen dos tipos de **receptores** para miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  denominados tipo I o ALK (Activin Like Kinase) de los que se conocen 7 miembros (ALK1-7) y receptores tipo II (T $\beta$ RII, ActRIIA, ActRIIB, AMHRII y BMPRII), ambos con actividad serina-treonina quinasa. La unión del ligando provoca un cambio conformacional que induce el reclutamiento del receptor tipo I apropiado, formándose complejos heterotetraméricos de dos receptores tipo I y dos receptores tipo II. A continuación, el **receptor tipo II**, que posee actividad serina-treonina quinasa constitutiva, fosforila y activa al **receptor tipo I**. Los receptores tipo I activados propagan la señal mediante las proteínas Smad (vía canónica), que una vez activados se acumulan en el núcleo dónde uniéndose a a co-activadores, co-represores y otros factores de transcripción regulan la expresión génica. También se ha descrito que el TGF- $\beta$  puede activar vías de señalización independientes de Smad o no canónicas [revisado por Massagué, 1998; Seoane, 2006; Gordon y Blobbe 2008].

Además de los receptores propiamente dichos, se han descrito **co-receptores** (T $\beta$ RIII, Endoglina, Cripto, RGMa, RGMb=DRAGON, Hemojuvelina=RGMc) para ligandos de la superfamilia del TGF- $\beta$ , que no intervienen en la señalización y cuya función principal es regular la unión del ligando al receptor, aunque pueden tener otras funciones adicionales [revisado por Bernard et al., 2001; ten Dijke y Arthur, 2007; Gordon y Blobbe, 2008].



**Figura 9.** Componentes de la señalización mediada por la superfamilia del TGF- $\beta$  y principales puntos de regulación.

## 5.1. El TGF- $\beta$ y sus receptores

En humanos, el TGF- $\beta$  presenta tres isoformas (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3), codificadas por genes distintos. Cada isoforma se sintetiza como un precursor que contiene un prodominio llamado LAP (Latency Associated Peptide) y un dominio maduro. Los precursores monoméricos son cortados al poco tiempo de ser secretados, formándose homo o heterodímeros en los que dos monómeros se ensamblan de manera antiparalela. La mayoría del TGF- $\beta$  secretado se almacena en la matriz extracelular como un complejo latente inactivo asociado a la proteína LTBP (Latent TGF- $\beta$  Binding Protein) [revisado por Heldin et al., 2009]. La liberación del TGF- $\beta$  activo requiere el corte proteolítico de LTBP, corte inducido por condiciones ácidas o ejecutado por proteasas extracelulares, como trombospondina1 [Schultz-Cherry y Murphy-Ullrich 1993], plasmina, cathepsinaD [Lyons et al., 1988], MMPs 2 y 9 (matrix-metalloproteinases 2 y 9) [Yu y Stamenkovic, 2000], y furina convertasa [Dubois et al., 1995]. También existen evidencias de que las integrinas están implicadas en la activación del TGF- $\beta$  induciendo un cambio conformacional y sin necesidad de corte proteolítico [Munger et al., 1999; Mu et al., 2002].

Las isoformas del TGF- $\beta$  se unen a un único receptor tipo II (T $\beta$ RII), y sólo después de que se haya establecido esta unión el receptor tipo I se une al complejo, mostrando el TGF- $\beta$  una preferencia casi exclusiva por el receptor tipo I ALK5, aunque se ha descrito que también se une a otros receptores tipo I, como ALK1 en células endoteliales [Goumans et al., 2003], y ALK2 y ALK3 en algunas células epiteliales [Daly et al., 2008].

La señalización mediada por la superfamilia TGF- $\beta$  está regulada prácticamente en todos los puntos de la cascada de señalización, incluyendo a nivel de los receptores. Así, la actividad de estos puede ser modulada por la proteína FKBP12 (FK506-binding protein 12), un regulador negativo de la vía [Chen et al., 1997], por ubiquitinación, mediada por miembros de la familia Smurf, [Kavsak et al., 2000; Ebisawa et al., 2001], por sumoilación [Kang et al., 2008], por regulación de la localización y el tráfico intracelular de los receptores [Kang et al., 2008] y por la presencia de co-receptores [Andres et al., 1991; Blobbe et al., 2001; Lee y Blobbe, 2007; Santibañez et al., 2007].

## 5.2. La vía de señalización canónica o dependiente de Smads.

### 5.2.1 Miembros de la familia Smad

La familia Smad consta de ocho miembros, que forman tres subfamilias [revisado por Shi y Massagué, 2003; Massagué 2008]:

a) **R-Smads** (Receptor phosphorylated SMADs) o Smad reguladas por receptor, son aquellas que son fosforiladas por el receptor de tipo I. Diferentes receptores de tipo I fosforilan diferentes R-smads: así, ALK1, 2, 3 y 6 fosforilan específicamente Smad1, Smad 5 y Smad8, mientras que ALK4, 5 y 7 fosforilan Smad2 y Smad3.

b) Un único mediador común o **co-Smad**, que recibe el nombre de Smad4. La proteína Smad4 funciona como una pareja común para todas las R-Smads, es necesaria para el ensamblaje de complejos transcripcionales activos y para la mayoría de los efectos de las R-Smads.

c) Dos Smads inhibitoras o **I-Smads**, llamadas Smad 6 y 7.

Las R-Smads y Smad4 contienen regiones altamente conservadas llamadas dominios MH1 y MH2 (*Mad Homology 1 y 2*). Los dominios MH1 y MH2 forman estructuras globulares [Shi et al., 1997; Shi et al., 1998] y están unidas por una región de unión menos conservada.

En el estado basal, las Smads2 y 3 son retenidas en el citoplasma, mediante interacciones con la proteína SARA (SMAD Anchor for Receptor Activacion) que ocluye la región que media el importe nuclear [Tsukazaki et al., 1998; Xu et al., 2000]. Una vez que las Smad2 y 3 son fosforiladas en la secuencia C-terminal –SSXS por el receptor no sólo aumenta su afinidad por Smad4 sino que también disminuye su afinidad por SARA, liberando Smad2 y 3 y desenmascarando su región de importe nuclear, lo que lleva a su rápida acumulación en el núcleo [Xu et al., 2000]. Las proteínas SMADs se pueden considerar proteínas nucleares que son retenidas en el citoplasma de manera que puedan acceder a los receptores de membrana plasmática.

### 5.2.2. Regulación transcripcional mediada por Smads

Una vez en el núcleo, los complejos R-Smad-Smad4 interaccionan con el DNA para regular la transcripción de genes específicos. Las proteínas Smad reconocen la secuencia CAGAC, llamada SBE (Smad Binding Element), y ciertas secuencias ricas en G+C pero con una afinidad demasiado baja para unirse a ellas sin ayuda en condiciones fisiológicas [Shi et al., 1998].

Los complejos Smad2/3-Smad4 acumulados en el núcleo adquieren afinidad para su interacción con el DNA asociándose con diferentes cofactores, que incluyen FAST (Forkhead Activin Signal Transducer) [Chen et al., 1996] y Mixer [Germain et al., 2000]; factores de transcripción pertenecientes a las familias forkhead, homeobox, bHLH (basic Helix Loop Helix) y AP-1 [revisado por Feng y Derynck, 2005; Massagué et al., 2005]; co-activadores transcripcionales como p300 y CBP (CREB Binding Protein) [Masague & Wotton, 2000] y co-represores transcripcionales como TGIF (Transforming growth Interacting Factor), SKI (Sloan-Kettering Institute proto-oncogene) y SnoN (Ski-related Novel gene N) [Wotton et al., 1999; Luo et al., 1999; Sun et al., 1999]. El hecho de que estas proteínas se expresen en un tipo celular determinado pero no en otros proporciona especificidad en la respuesta celular al TGF- $\beta$  [Masague y Wotton, 2000]. Además, al necesitar la presencia de una secuencia de DNA específica a una distancia exacta de la secuencia CAGAC, estos cofactores contribuyen a la selectividad de genes diana [revisado por Masague, 2000b].

### 5.2.3. Regulación de la actividad de Smads

Una vez que la vía se ha activado, existen varios puntos en los que se regula la actividad de las Smads. A continuación se enumeran algunos de los más importantes [revisado por Xu, 2006]:

-La **interacción de las Smads con los receptores** está regulada por las Smads inhibitoras Smad-6 y Smad-7, cuya expresión es incrementada directamente tanto por TGF- $\beta$  como por BMPs. Smad7 inhibe la señalización por TGF- $\beta$  a distintos niveles, entre ellos, compitiendo con las R-Smads por la interacción con el receptor, o reclutando E3-ubiquitin ligasas o fosfatasas a los complejos de receptores, lo que marca a estos receptores para la degradación mediada por ubiquitina o para defosforilación y desactivación, respectivamente [Itoh S y ten Dijke, 2007].

- La **traslocación núcleo-citoplasma de las Smads**. La potencia de la señal de Smads es proporcional al tiempo que están en el núcleo, por lo que se cree que la regulación de la exportación de Smads fuera del núcleo es determinante a la hora de controlar su actividad [Schmierer et al., 2008].

- La **terminación de la señal de la Smads**, controlado por 1) la defosforilación de la región C-terminal de las R-Smads que es llevado a cabo por fosfatasas específicas, como PPM1A, PDP y SCP y que conlleva su exportación del núcleo al citoplasma para terminar la señalización [Inman et al., 2002], 2) la ubiquitinación de Smads en el núcleo, seguida de su degradación por el proteasoma [Lo y Masague, 1999]. También

se han descrito otras modificaciones post-traduccionales que regulan la actividad de las Smads, como la sumoilación de Smad4 y la acetilación de las Smad2 y 3.

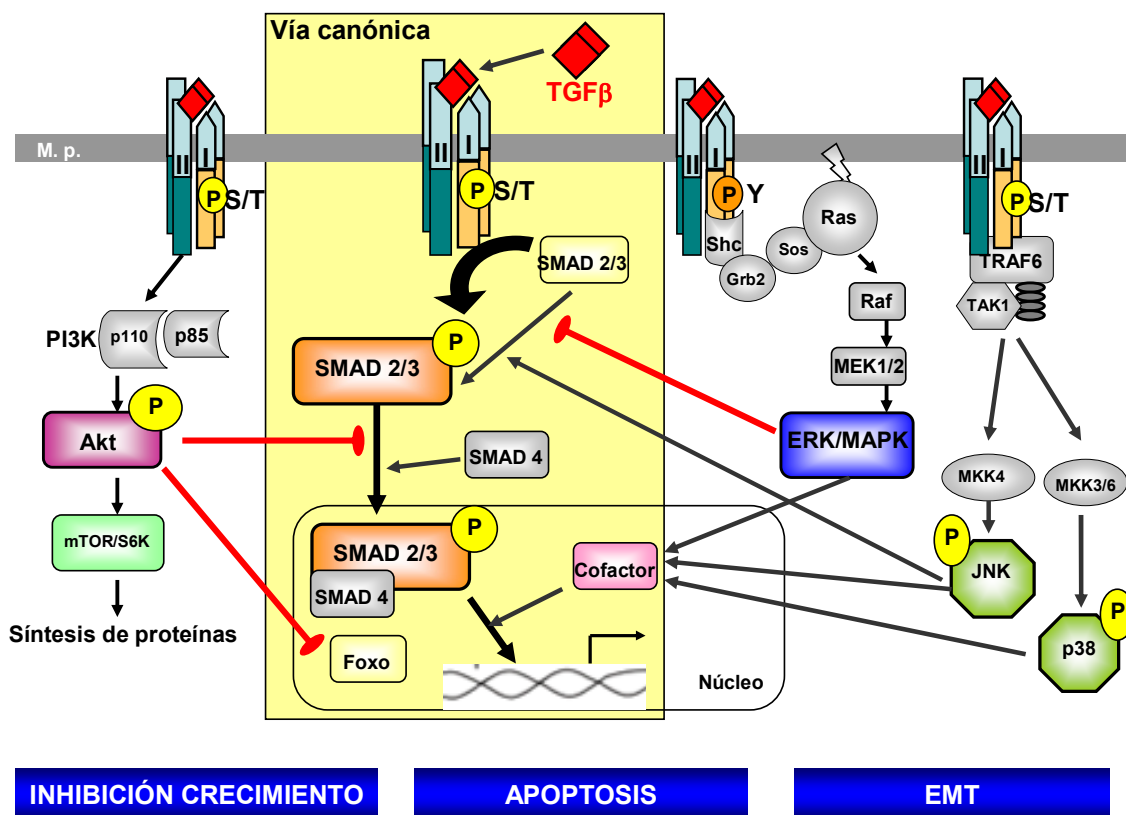
**- Regulación de la actividad de las Smads por otras vías de señalización.**

La vía Smad proporciona información que es leída en función de otras señales recibidas por la célula. Algunas de estas señales actúan directamente en el receptor de TGF-β y las Smads, controlando rápidamente su actividad. Este crosstalk puede llevar a la rápida atenuación o incluso la anulación de la actividad señalizadora de Smads [ten Dijke et al., 2000].

En algunos tipos celulares, la expresión de la Smad inhibitoria Smad7 aumenta en respuesta a las citoquinas pro-inflamatorias como interferón γ (IFN-γ) [Ulloa et al., 1999] y TNF-α [Bitzer et al., 2000], resultando en un antagonismo entre los efectos de estas citoquinas y el TGF-β en la regulación de las funciones de las células del sistema inmune.

La activación de la vía Ras-MEK-Erk1/2 por factores de crecimiento o por mutación oncogénica de Ras, lleva a la fosforilación de Smad1, Smad2 y Smad3 en sitios específicos de la región de unión entre los dominios MH1 y MH2, alterando su funcionalidad [Kretzschmar et al., 1997; Kretzschmar et al. 1999]. Otras quinasas, como Gsk3β, Cam Kinasa II (Ca<sup>2+</sup> and Calmodulin-dependent kinase II), CK1γ2 (Casein kinase 1gamma2), Cdk5 y GRK2 (G protein-coupled Receptor Kinase 2) también fosforilan a las Smad2 y 3 [Wicks et al., 2000; Matsuura et al., 2004; Ho et al., 2005; Guo et al., 2008a; Guo et al., 2008b]. Aunque existen excepciones, en general la fosforilación de Smads actúa reprimiendo su función.

**5.3. Vías no canónicas**



**Figura 10.** Vía canónica y principales vías no canónicas disparadas por el TGF-β

La señalización mediada por el TGF- $\beta$  no está limitada a la transcripción génica controlada por Smads. En concreto, se ha descrito que el TGF- $\beta$  puede activar otras vías de señalización, independientes de Smads, que se conocen como vías de señalización no canónicas y que incluyen las vías NF $\kappa$ B [Derynck et al., 2001; Derynck y Zhang, 2003; Miyazono et al., 2005], MAPKs (incluyendo ERK1/2, p38 y JNKs), la vía PI3K/Akt y Rho GTPasas incluyendo RhoA y Cdc42 [revisado por Zhang, 2009]. Dependiendo de las condiciones, los efectos de TGF- $\beta$  sobre estas vías varían enormemente en cinética, magnitud y subtipo de quinasa y están presentes sólo en algunos de los tipos celulares investigados. En algunos casos, estas quinasas son activadas con cinéticas lentas, indicando que estos efectos del TGF- $\beta$  pueden ser indirectos. En otros casos, la activación es rápida (del orden de minutos), indicando que no es un proceso secundario de otros eventos transcripcionales, si no que son vías activadas directamente por los receptores de TGF- $\beta$ . Los mecanismos para esta activación directa de otras vías de señalización no son del todo conocidos.

### 5.3.1. MAPKs (Mitogen activated Protein Kinases)

#### ERK1/2

El receptor de TGF- $\beta$  tipo I puede ser fosforilado en tirosinas tras la estimulación con TGF- $\beta$  lo que le permite reclutar y fosforilar directamente ShcA promoviendo la formación de complejos ShcA/Grb2/Sos [Lee et al., 2007]. Este complejo ShcA/Grb2/Sos es capaz de activar Ras en la membrana plasmática, llevando a la activación secuencial de c-Raf, MEK y ERK1/2. Dado que ERK1/2 median la estimulación del crecimiento celular en otros contextos, se especula sobre la posibilidad de que este mecanismo sea responsable del efecto estimulador del crecimiento celular por TGF- $\beta$  en algunos sistemas. La activación de Erk1/2 es necesaria para la inducción del proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) (ver apartado 7) inducida por TGF- $\beta$  en algunos modelos celulares, como los queratinocitos [Zavadil et al., 2001; Davies et al., 2005].

#### p38-MAPKs y JNK (Jun-N-terminal Kinase)

Son las vías no canónicas inducidas por TGF- $\beta$  mejor caracterizadas. La activación de las MAPKs requiere sucesivos pasos de fosforilación: las MAP3Ks fosforilan y activan a las MKKS y éstas a su vez a las MAPKs. JNK y p38, al igual que Erk1/2, son MAPKs y están en el tercer escalón, siendo activadas por MKK4 (JNKs) y MKK3/6 (p38). El TGF- $\beta$  puede activar rápidamente JNK mediante MKK4 [Frey y Mulder, 1997; Engel et al., 1999; Hocevar et al., 1999] y p38 MAPK mediante MKK3/6 en varias líneas celulares [Hanafusa et al., 1999; Sano et al., 1999; Bhowmick et al., 2001; Yu et al., 2002], de manera independiente de Smads [Yu et al., 2002; Itoh et al., 2003]. Por encima de ellas, la quinasa activada por TGF- $\beta$  TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase 1) ejerce el papel de MAP3Ks. Se ha demostrado que TAK1 es imprescindible para la activación de JNK y NF $\kappa$ B en respuesta a TGF- $\beta$  utilizando fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en TAK1 [Shim et al., 2005]. La cascada TRAF6-TAK1-JNK/p38 actúa en unión con la vía canónica para regular distintas respuestas al TGF- $\beta$ , por ejemplo, la inducción de apoptosis y la transición epitelio-mesénquima (EMT) en distintos tipos celulares [Liao et al., 2001; Bakin et al., 2002; Edlund, 2003; Yamashita et al., 2008].

### 5.3.2. La vía PI3K/Akt

El TGF $\beta$  puede activar rápidamente Akt en ciertos tipos celulares de manera independiente de Smad2/3 [Bakin et al., 2000; Shin et al., 2001; Vinals y Pouyssegur, 2001; Wilkes et al., 2005]. El mecanismo de activación se desconoce hasta el momento, pero se ha encontrado que la subunidad p85 de la PI3K está asociada con

los receptores de TGF- $\beta$  tipo I y tipo II [Bakin et al., 2000; Shin et al., 2001; Vinals y Pouyssegur, 2001; Wilkes et al., 2005]. Además, el TGF- $\beta$  también puede activar PI3K de manera indirecta activando la señalización mediada por EGFR [Vinals y Pouyssegur, 2001; Murillo et al., 2005]. Se ha descrito que la vía PI3K/AKT/mTOR (mammalian target of rapamycin) contribuye a la EMT inducida por TGF- $\beta$  [Lamouille y Derynck, 2007]. Sin embargo, en muchos otros efectos biológicos inducidos por TGF- $\beta$ , la vía PI3K/Akt tiene un efecto de inhibición. Por ejemplo, la activación de la ruta de PI3K protege a las células de la apoptosis y la inhibición de crecimiento inducidos por TGF- $\beta$  [Chen et al., 1998; Fabregat et al., 2000; Shin et al., 2001; Song et al., 2006]. Estos efectos podrían ser debidos a que PI3K puede interaccionar con Smads. Así, uno de los mecanismos propuestos implica una interacción directa de Akt con Smad3, que impide que ésta sea fosforilada por el receptor tipo I y por tanto que se trasloque al núcleo, con lo que se inhibe la transcripción mediada por Smad3 [Conery et al., 2004; Remy et al., 2004]. mTOR también podría estar implicado en la inhibición de los efectos transcripcionales de Smad3 [Song et al., 2006]. Otro mecanismo involucrado en el antagonismo PI3K-Smads implica a la familia de factores de transcripción Foxo. Estos factores de transcripción están implicados en la regulación de la expresión de p15<sup>Ink4b</sup> y p21<sup>Cip1</sup> (inhibidores de ciclo celular implicados en el efecto citostático del TGF- $\beta$ ). Cuando los miembros de la familia Foxo son fosforilados por Akt se impide su localización nuclear y su unión a los promotores de genes diana [Seoane et al., 2004; Gomis et al., 2006].

#### 5.4. Respuestas celulares al TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  es una citoquina multifuncional que gobierna los aspectos esenciales de la fisiología y homeostasis de células epiteliales, incluyendo procesos proliferativos, de diferenciación, migración, muerte y supervivencia [revisado por Gordon y Blobel 2008; revisado por Heldin et al., 2009]. El TGF- $\beta$  tiene funciones muy importantes durante el desarrollo embrionario y también en el organismo adulto donde además participa en el control del sistema inmune y de los procesos angiogénicos. La desregulación de la actividad de los miembros de la familia TGF- $\beta$  ha sido relacionada con varias enfermedades, como fibrosis, enfermedades auto-inmunes y cáncer. En cáncer, el TGF- $\beta$  tiene un papel complejo con efectos tanto anti-tumorogénicos como pro-tumorogénicos. En células normales y en los primeros estadios de la progresión tumoral tiene un papel de supresor de tumores, dado que inhibe el crecimiento de la célula e induce apoptosis. Sin embargo, en estadios posteriores de progresión tumoral, el TGF- $\beta$  actúa como promotor tumoral, dado que las células pierden su capacidad de responder al TGF- $\beta$  en términos de inhibición del crecimiento pero retienen la capacidad de sufrir transición epitelio-mesénquima (EMT), fenómeno que correlaciona con un aumento de la invasividad y la capacidad de formar metástasis [ver apartado 7 de esta introducción]. Además, la supresión del sistema inmune y la estimulación de la angiogénesis, junto con la puesta en marcha de mecanismos que aumentan la supervivencia celular, también contribuyen a sus efectos promotores de la progresión tumoral [revisado por Bierie 2006; Massagué 2008; Meulmeester y ten Dijke, 2011].

Las 3 respuestas celulares al TGF- $\beta$  más prominentes y estudiadas son inhibición de crecimiento, apoptosis y EMT.

##### 5.4.1. Inhibición del crecimiento mediada por TGF- $\beta$ .

El TGF- $\beta$  provoca inhibición del crecimiento en diferentes tipos celulares. El mecanismo implicado difiere ligeramente entre los distintos tipos celulares, implicando según los casos la inhibición de la expresión de los factores de transcripción Myc y miembros de la familia Id (Inhibitors of differentiation/DNA binding) y la inducción de los inhibidores de ciclo celular p15<sup>Ink4b</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, y p57<sup>Kip2</sup> [revisado por Heldin et al.,

2009]. PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), que es inducido por TGF- $\beta$ , también parece ser necesario para los efectos antiproliferativos del TGF- $\beta$  [revisado por Heldin et al., 2009].

Durante la progresión tumoral, las células tumorales se hacen cada vez más resistentes a los efectos citostáticos del TGF- $\beta$ , mediante mecanismos que no se conocen todavía. Un descubrimiento interesante en este sentido es que la regulación de un conjunto de miRNAs en ciertos tumores gástricos correlaciona con la pérdida de la actividad supresora de tumores del TGF- $\beta$  interfiriendo con la expresión de p21<sup>Cip1</sup> y la proteína apoptótica Bim [Petrocca et al., 2008].

Los mecanismos de señalización utilizados por el TGF- $\beta$  para inducir apoptosis y EMT, así como la relevancia de estas respuestas en el hígado, se tratarán en el apartado 6 y el apartado 7 (respectivamente) de esta introducción.

## 6. Apoptosis inducida por TGF- $\beta$

### 6.1. Características de la apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada tiene un importante papel en el desarrollo y en la homeostasis de los tejidos. Durante la embriogénesis, es necesaria para esculpir tejidos o ajustar el número de células. En adultos, la muerte celular contrarresta la proliferación celular y mantiene la homeostasis en tejidos de renovación rápida (como el epitelio intestinal o tejidos hematopoyéticos). También elimina células dañadas de modo irreparable y células potencialmente peligrosas, como las que han sufrido transformación neoplásica o linfocitos reactivos contra componentes del propio organismo. Finalmente, tanto el sistema inmune innato como el adaptativo utilizan este mecanismo para eliminar células infectadas [revisado por Strasser et al., 2011]. Una disminución en la tasa de apoptosis en un determinado tejido puede provocar enfermedades autoinmunes o procesos tumorales, ya que la inhibición de los procesos apoptóticos facilita que las células escapen de terapias citotóxicas y de la vigilancia del sistema inmune, mientras que un exceso de muerte celular puede llevar a enfermedades degenerativas cardíacas o del sistema nervioso [revisado por Strasser et al., 2011].

Distintas señales pueden desencadenar la muerte celular programada, pero el efecto final, común en todos los casos, es la activación de proteasas llamadas caspasas, que cortan más de 400 sustratos celulares, desmantelando completamente la estructura celular desde el interior, de una manera controlada que minimiza el daño a las células vecinas. Como consecuencia de la acción de las caspasas, las células sufren cambios morfológicos y bioquímicos: inicialmente se redondean y se retraen de las células vecinas. Esto va acompañado, o seguido muy de cerca en el tiempo, por un período prolongado de formación de burbujas en la membrana plasmática (blebbing), que terminan liberándose en forma de vesículas llamadas cuerpos apoptóticos [revisado por Taylor et al., 2008]. Una característica altamente distintiva del proceso apoptótico es la condensación del núcleo y la fragmentación internucleosomal del DNA nuclear [Williams et al., 1974]. Aunque de manera más sutil, también el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y la red mitocondrial sufren una pronunciada fragmentación durante la apoptosis [revisado por Taylor et al., 2008]. El proceso de apoptosis culmina con la fagocitosis de los restos celulares resultantes evitando así una respuesta inflamatoria [revisado por Taylor et al., 2008].

## 6.2. Caspasas

Las caspasas son proteasas que cortan selectivamente proteínas tras residuos de aspartato. Todas las caspasas tienen una estructura similar que comprende un pro-péptido seguido de una subunidad grande y una subunidad pequeña. Se han identificado 2 pro-péptidos: CARD (caspase recruitment domain) y DED (death effector domain), encargados de facilitar la interacción con proteínas que contienen el mismo motivo [revisado por Taylor et al., 2008].

Las caspasas implicadas en apoptosis pueden ser subdivididas en 2 grupos: a) Caspasas iniciadoras o apicales (2, 8, 9, 10), que son capaces de auto-activarse e iniciar el procesamiento proteolítico de otras caspasas. b) Caspasas efectoras o ejecutoras (3, 6, 7) son activadas por la acción de las caspasas iniciadoras y llevan a cabo la mayor parte de la proteólisis observada durante la apoptosis.

Las caspasas normalmente están presentes en células sanas como enzimas precursoras inactivas (zimógenos) [Riedl y Salvesen, 2007]. La activación de las caspasas requiere un procesamiento proteolítico que genera un cambio conformacional en el centro activo. Las caspasas funcionan típicamente como heterotetrámeros, que se forman mediante la dimerización de 2 heterodímeros de caspasas. Las caspasas iniciadoras existen como monómeros en células sanas, mientras que las caspasas efectoras están presentes como dímeros pre-formados. Las caspasas iniciadoras tienen pro-dominios largos que, tras una señal apoptótica, las conducen a complejos proteicos (FADD/Mort1 para caspasa-8 y Apaf-1 para caspasa-9), donde cambios conformacionales provocan su activación [Riedl y Salvesen, 2007]. Una vez activadas, las caspasas iniciadoras cortan a las efectoras en fragmentos de aproximadamente 20 KDa (p20) y 10 KDa (p10) que se ensamblan en la forma tetramérica activa (p20<sub>2</sub>p10<sub>2</sub>).

La actividad de las caspasas está regulada por proteínas de la **familia IAP** (Inhibitor of apoptosis), cuyos miembros ejercen una función antiapoptótica al asociarse con las caspasas en respuesta a diferentes estímulos. Se han identificado en humanos 8 miembros de esta familia entre los que se incluyen XIAP (X-chromosome-linked IAP), survivin, c-IAP1 (cellular IAP1) y c-IAP2, [revisado por Dubrez-Daloz et al., 2008].

## 6.3. La familia de proteínas Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) tiene un papel crucial en la regulación de la apoptosis mediante su habilidad para regular la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Las proteínas de esta familia contienen uno o más dominios BH (Bcl-2 Homology), que comparten homología de secuencia y son importantes para las interacciones heterodiméricas entre ellas [Chittenden et al, 1995; Danial y Korsmeyer, 2004].

La familia Bcl-2 comprende 3 subfamilias [revisado por Ola et al., 2011], con miembros pro- y anti-apoptóticos:

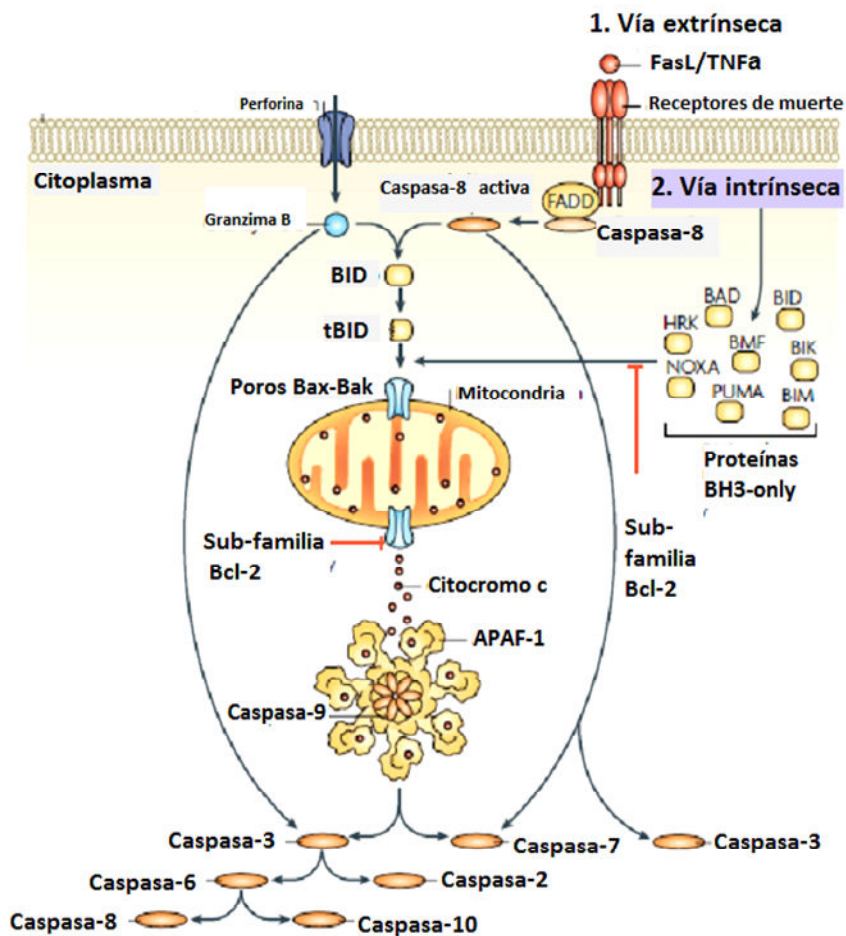
A) La subfamilia antiapoptótica o subfamilia Bcl-2 comprende las proteínas Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1 y en humanos, Bcl-B, que tienen cuatro dominios BH. La mayoría de los miembros de esta subfamilia también contienen dominios transmembrana y por tanto están asociados con membranas.

B) La subfamilia pro-apoptótica Bax/Bak. Bax (BCL-2-associated X protein) y Bak (BCL-2-antagonist/killer-1) son proteínas pro-apoptóticas que contienen los dominios BH1 al 3 pero carecen del dominio BH4 y se insertan en la membrana mitocondrial externa, permeabilizándola.

C) La subfamilia pro-apoptótica BH3-only. Comprende 8 miembros, que contienen únicamente el dominio BH3: BAD (BCL-2 antagonist of cell death), BID (BH3-interacting domain death agonist), BIK (BCL-2-interacting killer), BIM (BCL-2-like-11), BMF (BCL-2 modifying factor), HRK (harakiri), PUMA (p53-Upregulated Modulator or Apoptosis) y NOXA (palabra en latín que significa daño). Se han descrito diferentes mecanismos que regulan la actividad de estas proteínas. La expresión de NOXA, PUMA y en menor medida Bid aumenta en respuesta a estímulos apoptóticos, como p53 [Oda et al., 2000; Nakano y Vousden, 2001]. BID es proteolizado por la caspasa 8 para generar Bid truncado (tBID) que entonces adquiere carácter pro-apoptótico [Li et al., 1998]. BAD es inactivado mediante fosforilación [Zha et al., 1996]. BIM se encuentra secuestrado mediante la unión a microtúbulos y BMF está unido a filamentos de actina. Ambas son liberadas en respuesta a varios estímulos de muerte [Puthalakath et al., 1999]. BIM también es degradada por el proteasoma cuando es fosforilada por ERKs y por tanto, la falta de factores de crecimiento, al disminuir los niveles de ERKs, produce un aumento de los niveles de BIM.

### 6.4. Vías apoptóticas

Las caspasas se activan mediante dos vías de señalización diferentes: la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial.



**Figura 11.** Vía apoptótica extrínseca o de receptores de muerte y vía apoptótica intrínseca o mitocondrial regulada por la familia de proteínas Bcl-2

#### 6.4.1 Vía extrínseca o de receptores de muerte

La activación de las caspasas mediante la vía extrínseca implica la unión de ligandos de muerte extracelulares FasL, TNF $\alpha$  (Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ ) o TRAIL a sus respectivos receptores transmembrana (Fas, TNFR1 o TRAILR). Estos receptores inician el proceso apoptótico formando un complejo llamado DISC (death-inducing signalling complex) [Kischkel et al., 1995], en el que la proteína adaptadora FADD con la asistencia del adaptador TRADD en ciertos receptores de muerte (por ejemplo, TNF-R1), recluta y activa la caspasa iniciadora 8 promoviendo su autoproteólisis y activación y consecuentemente la activación de las caspasas ejecutoras.

#### 6.4.2. Vía intrínseca o vía mitocondrial regulada por la familia Bcl-2

En la vía intrínseca o mitocondrial ciertas señales como la falta de factores de crecimiento, daño en el DNA (inducidos por radiación ultravioleta o por agentes genotóxicos o quimioterapéuticos) o estrés del retículo endoplásmico, inician apoptosis mediante la activación de las proteínas Bax y Bak. Tras la activación, Bax y Bak forman homo-oligómeros [Wei et al., 2001] que se insertan en la membrana mitocondrial externa y la permeabilizan, provocando la liberación de la mitocondria al citosol de proteínas pro-apoptóticas [revisado por Ola, 2011].

La familia Bcl-2 se puede considerar un interruptor tripartito que establece el umbral para que la célula entre en apoptosis. Este interruptor funciona principalmente mediante interacciones entre miembros de la familia.

Existen dos modelos de activación de Bax y Bak, el modelo indirecto y el modelo directo. A) Modelo indirecto. Según este modelo, Bax y Bak se encuentran siempre unidas a proteínas anti-apoptóticas para impedir su activación. Las proteínas BH3-only desencadenan el proceso de apoptosis al desplazar a Bax y Bak por unión a las proteínas anti-apoptóticas. [Willis et al., 2007]. B) Modelo directo, según el cual las proteínas activadoras (Bid, Bim y posiblemente otras) estarían secuestradas en el citoplasma por las proteínas anti-apoptóticas. Las proteínas BH3 sensibilizadoras (Bad o Noxa) desplazan a las activadoras, que quedan libres para unir Bax/Bak y activarlas [Letai et al., 2002]. Las evidencias hasta el momento no validan completamente ninguno de los dos modelos. Ambos modelos no son mutuamente excluyentes y podrían representar vías alternativas o diferentes estadios de una vía única. Algunos autores [Strasser et al., 2011] proponen un modelo unificador en el que Bax y Bak adquirirían su estado activado bien mediante la interacción con proteínas activadoras, activándose espontáneamente, o mediante mecanismos todavía desconocidos. Las proteínas anti-apoptóticas inhibirían la muerte secuestrando proteínas activadoras o Bax/Bak activados. Algunas de las proteínas BH3-only provocarían la muerte activando Bax/Bak y desplazando los activadores y Bax/Bak de las proteínas anti-apoptóticas, permitiendo la progresión de la señal de muerte.

En cualquier caso, el resultado final es la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la salida al citosol de al menos cinco proteínas apoptogénicas desde el espacio intermembrana: el citocromo c, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF y endonucleasa G [revisado por Ola et al., 2011]. Estas proteínas promueven el proceso de apoptosis de modos distintos:

-La liberación del **citocromo c** provoca el ensamblaje del apoptosoma, formado por varias moléculas de APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1) unidas a citocromo c y el mismo número de homodímeros de caspasa 9. La formación de este apoptosoma conduce a la activación de la caspasa 9, que activa posteriormente las caspasas ejecutoras.

-**Smac/DIABLO** (second mitochondrial activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low pI) y **HtrA2/Omi** (high-temperature requirement A2) se unen a XIAP y suprimen su capacidad de inhibir caspasas.

-**Endonucleasa G** y **AIF** (apoptosis-inducing factor) se traslocan desde la mitocondria al núcleo, donde provocan condensación de la cromatina y fragmentación del DNA [Susin et al., 1999; van Loo et al., 2001; Widlak et al., 2001; Ohsato et al., 2002].

La vía extrínseca y la intrínseca no son mutuamente excluyentes. En algunas situaciones, la vía extrínseca puede interactuar con la intrínseca por medio de la proteólisis de la proteína Bid, que genera tBid que a su vez promueve la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de las proteínas apoptogénicas. Este mecanismo de amplificación activado por tBid es esencial para la apoptosis inducida por receptores de muerte en las células llamadas de tipo 2 (por ejemplo, hepatocitos) pero no es necesaria en células tipo 1 (por ejemplo timocitos) [Scaffidi et al., 1998; Yin et al., 1999; Kaufmann et al., 2007; revisado por Kantari y Walczak., 2011].

## 6.5. Apoptosis inducida por TGF- $\beta$ en el hígado

La capacidad del TGF- $\beta$  para inducir apoptosis en el hígado es crucial durante la embriogénesis para la eliminación de células innecesarias para la estructura o la función hepática. Además, en la etapa adulta, la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  contribuye a la eliminación de células dañadas y el mantenimiento de homeostasis y el tamaño del órgano. Durante la regeneración hepática, el TGF- $\beta$  contribuye a la terminación de la respuesta regenerativa inhibiendo la proliferación e induciendo apoptosis en hepatocitos [Fausto et al. 2006]. De hecho se le ha propuesto como el principal regulador negativo de la proliferación de hepatocitos durante la regeneración hepática.

La expresión génica del TGF- $\beta$  está controlada durante el desarrollo. En la etapa media de la gestación se detectan altos niveles del mRNA de TGF- $\beta$  en el hígado, que disminuyen al aumentar la madurez del feto y todavía más en el periodo postnatal [Carr et al., 1989]. El hígado quiescente tiene niveles muy bajos de mRNA para TGF- $\beta$ , pero hígados regenerantes normales, neoplásicos proliferantes y tratados con carcinógenos tienen niveles aumentados del transcrito de TGF- $\beta$  [Fausto et al., 1990].

Uno de los objetivos principales de nuestro grupo de investigación ha sido y sigue siendo la caracterización de la respuesta apoptótica al TGF- $\beta$  en el contexto hepático. Nuestro grupo y otros han descrito que el TGF- $\beta$  induce apoptosis en distintas células hepáticas como hepatocitos y células de hepatoma [Cain et al., 1996; Inayat-Hussain et al., 1997; Choi et al., 1998; Shima et al., 1999; Herrera et al., 2001a]. Los hepatocitos regenerantes son más resistentes a la apoptosis por TGF- $\beta$  que los hepatocitos fetales [Herrera et al., 2004b] aunque ambos muestran una sensibilidad similar a la inhibición de crecimiento por TGF- $\beta$  [de Juan de et al., 1992a].

En cambio, los efectos inhibidores del TGF- $\beta$  en células madre/progenitoras no están del todo claros. Algunos autores han descrito que, en comparación con los hepatocitos adultos, la mayoría de las células progenitoras hepáticas son resistentes a los efectos anti-proliferativos y apoptóticos del TGF- $\beta$  [Clark et al., 2005], y proponen por tanto que la sensibilidad apoptótica a esta citoquina es diferente entre células progenitoras y hepatocitos maduros. Sin embargo, la sobreexpresión de TGF- $\beta$  produce una disminución de la expansión de células ovas tras daño hepático inducido por la dieta DDC [Preisegger et al., 1999]. Además, nuestro grupo ha

demostrado que el tratamiento con TGF- $\beta$  inhibe el crecimiento e induce apoptosis en líneas de células ovales derivadas de animales tratados con DDC [del Castillo et al., 2008a].

Los mecanismos de apoptosis inducidos por TGF- $\beta$  varían enormemente dependiendo del tipo celular [Sánchez-Capelo, 2005]. En hepatocitos, se ha descrito que en respuesta al TGF- $\beta$ , la proteína adaptadora pro-apoptótica Daxx media la activación de JNK que conduce a la muerte [Perlman et al., 2001]. En la línea de hepatocitos inmortalizados AML12, pero no en hepatocitos fetales, la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  es dependiente de p38 [Liao et al., 2001; Herrera et al., 2001c]. Resultados de nuestro grupo han demostrado que en hepatocitos fetales de rata la mitocondria juega un papel crucial en el proceso apoptótico inducido por TGF- $\beta$ . Así, en respuesta al TGF- $\beta$  se produce estrés oxidativo, con producción de ROS que es responsable de la caída del potencial de membrana mitocondrial y liberación del citocromo c, coincidiendo con la activación de caspasas [Sánchez et al., 1996; Herrera et al., 2001b]. El TGF- $\beta$  también induce apoptosis vía mitocondrial en hepatocitos adultos [Rodrigues et al., 1999] y células FaO de hepatoma [Freathy et al., 2000].

Asimismo, en respuesta al TGF- $\beta$  se observa una alteración de las proteínas de la familia Bcl-2. En hepatocitos fetales de rata el TGF- $\beta$  induce una disminución en los niveles de **Bcl-XL**, que además sufre un corte proteolítico tras la activación de caspasas [Herrera et al., 2001a]. El TGF- $\beta$  también induce una disminución de la expresión de Bcl-XL en células de hepatoma [Yamamoto et al., 1998; Shima et al., 1999], en hepatocitos de ratón [Christensen et al., 1998] y en la línea de hepatocitos AML12, donde este efecto es dependiente de Smad4 [Ramjaun et al., 2007]. El TGF- $\beta$  induce fuertemente la expresión de las proteínas pro-apoptóticas **Bmf** y **Bim** en la línea celular AML12 de manera dependiente de Smad4 y p38. Para inhibir significativamente la inducción de apoptosis por TGF- $\beta$ , es necesario suprimir simultáneamente la inducción de ambas proteínas, sugiriendo este hecho que Bim y Bmf pueden cumplir funciones parcialmente redundantes o cooperar en la regulación de la muerte celular [Ramjaun et al., 2007]. La activación de caspasas por el TGF- $\beta$  media el corte de **Bid** en hepatocitos fetales de rata, que da lugar a un mecanismo de amplificación de los efectos mitocondriales [Herrera et al., 2001a]. Además, **Bad** sufre corte dependiente de caspasas en células Fao de hepatoma para generar formas apoptóticamente más potentes tras la estimulación con TGF- $\beta$  [Kim et al., 2002].

Además de la regulación de las proteínas de la familia Bcl-2, se ha demostrado un efecto del TGF- $\beta$  sobre proteínas cIAP-1. En hepatocitos fetales de rata, TGF- $\beta$  induce un corte proteolítico de cIAP-1 [Herrera et al., 2002], y en células de hepatoma HuH7, TGF- $\beta$  disminuye la expresión de XIAP [Shima et al., 1999].

La identidad de la/s molécula/s que conectan el TGF- $\beta$  con la inducción de la vía mitocondrial está lejos de ser conocida con exactitud. En un intento por esclarecer la identidad de este conector, nuestro grupo ha estudiado el papel de las especies reactivas de oxígeno, demostrando su función como mediadores de la respuesta apoptótica al TGF- $\beta$  en distintas células hepáticas. En hepatocitos fetales de rata, la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  está mediada por especies reactivas de oxígeno ya que ésta es impedida por agentes antioxidantes [Sánchez et al., 1996; Herrera et al., 2001b]. El TGF- $\beta$  induce la expresión de NOX4, una NADPH oxidasa inducible responsable de la producción extramitocondrial de ROS [Herrera et al., 2004a; Carmona-Cuenca et al., 2008]. Además, provoca un rápido descenso de la expresión de genes antioxidantes, en particular MnSOD [Herrera et al., 2004a]. Además, en líneas celulares de carcinoma hepatocelular humano, la capacidad del TGF- $\beta$  de inducir apoptosis parece depender de su capacidad para aumentar la expresión de NOX4 ya que 1) en las líneas de carcinoma hepatocelular sensibles a la apoptosis del TGF- $\beta$ , como las Hep3B, se observa un aumento en los niveles de NOX4, no

observado en células resistentes, como HepG2 y 2) el silenciamiento de NOX4 mediante siRNA en células Hep3B disminuye la respuesta apoptótica al TGF- $\beta$  [Carmona-Cuenca et al., 2008]. Los ROS también tienen una función importante para la respuesta apoptótica al TGF- $\beta$  en hepatocitos AML12 y son necesarios, aunque no suficientes, para el descenso en la expresión de Bcl-XL y para el aumento de la transcripción de Bmf y Bim [Ramjaun et al., 2007].

## 7. Transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso biológico por el cual una célula de fenotipo epitelial, tras múltiples cambios bioquímicos, genéticos y epigenéticos, asume un fenotipo mesenquimal o fibroblastoide que conlleva una mayor capacidad migratoria, invasiva, y de supervivencia. El trabajo pionero de Elizabeth Hay en 1995 describió por primera vez una “transformación epitelio-mesenquimal”, usando como modelo la formación de la estría o línea primitiva en embriones de pollo. En la actualidad, el término transformación ha sido sustituido por transición, reflejando la reversibilidad del proceso y el hecho de que es distinto de la transformación neoplásica [Kalluri y Neilson, 2003].

El proceso de EMT es reversible mediante un proceso conocido por transición mesénquima-epitelio (MET), de cuyo mecanismo se conoce relativamente poco siendo el ejemplo mejor conocido de MET la asociada con la formación del riñón [Rothenpieler y Dressler, 1993; Lipschutz, 1998; Hogan y Kolodziej, 2002].

### 7.1. Tipos de EMT

La EMT se puede clasificar en tres subtipos diferentes dependiendo del contexto celular donde tiene lugar y del fenotipo de la célula resultante. Entre los tres subtipos existen diferencias funcionales que generan distintas consecuencias [Kalluri y Weinberg, 2009, revisado por Zeisberg y Neilson, 2009].

#### EMT tipo 1

Este tipo de EMT es completamente fisiológico y es un proceso necesario durante distintas etapas del desarrollo embrionario, entre otras la implantación del embrión en el útero, la gastrulación y la migración de las células de la cresta neural [Hay, 1995; Vicovac y Aplin, 1996; Tucker, 2004]. A nivel bioquímico, la EMT asociada con gastrulación requiere de la señalización por Wnt y Nodal y Vg1, y por miembros de la familia del TGF- $\beta$  [Collignon et al., 1996; Varlet et al., 1997; Shah et al., 1997; Liu et al., 1999; Skromne y Stern, 2001; Skromne y Stern, 2002; Chea et al., 2005]. Las vías Wnt, FGFs, c-Myb, Msx-1 (Msh homeobox 1) y BMP intervienen en la EMT tipo 1 asociada a la migración de las células de la cresta neural [Liem et al., 2000; Villanueva et al., 2002; Karafiat et al., 2007]. Algunas de las células generadas mediante EMT tipo 1 son reinducidas a células epiteliales secundarias en órganos de origen mesodérmico y endodérmico mediante transición mesénquima-epitelio (MET).

#### EMT tipo 2

Mientras que la EMT tipo 1 que se produce durante la embriogénesis da lugar a células mesenquimales, la EMT tipo 2, que se da en tejidos adultos o en desarrollo da lugar a fibroblastos. La EMT de tipo 2 se produce durante la cicatrización de heridas, proceso en el que las células epiteliales deben moverse para cerrar la brecha creada y sintetizar una matriz extracelular provisional. La característica diferencial de este tipo de EMT es que es activada por un proceso inflamatorio y cesa cuando cesa la inflamación. Un proceso de EMT tipo 2 no resuelto puede producir fibrosis, de hecho se ha asociado con procesos fibróticos en riñón, hígado, pulmón, e intestino [Zeisberg

et al., 2007a; Zeisberg et al., 2007b; Kim et al., 2006; Potenta et al., 2008]. En el modelo más estudiado de EMT tipo 2, daño inflamatorio en el riñón murino, se ha establecido la participación de diferentes factores de crecimiento, como TGF- $\beta$ , FGF-2 (Fibroblast Growth Factor -2) y CTGF (Connective Tissue Growth Factor) [Yang y Liu, 2001; Strutz et al., 2002; Burns et al., 2006; revisado por Liu 2010].

### EMT tipo 3

La EMT tipo 3 es un proceso mediante el cual células epiteliales tumorales adquieren capacidad migratoria e invasiva que les permite introducirse en vasos sanguíneos o linfáticos, viajar por el torrente circulatorio y dar lugar a un tumor secundario o metástasis en sitios distantes del tumor primario. Este tipo de EMT se considera una activación aberrante o inadecuada de programas que deben estar confinados al desarrollo embrionario o la regeneración tisular, y se distingue del tipo 1 y 2 por producirse en células con anomalías genéticas o epigenéticas. En el caso de muchos carcinomas, las señales que inducen EMT, especialmente HGF, EGF, PDGF y TGF- $\beta$ , provienen del estroma del tumor y parecen ser responsables de la expresión de distintos factores de transcripción inductores de EMT en células transformadas [Thiery, 2002; Jechlinger et al., 2002; Kokudo et al., 2008; Medici et al., 2008; Niessen et al., 2008].

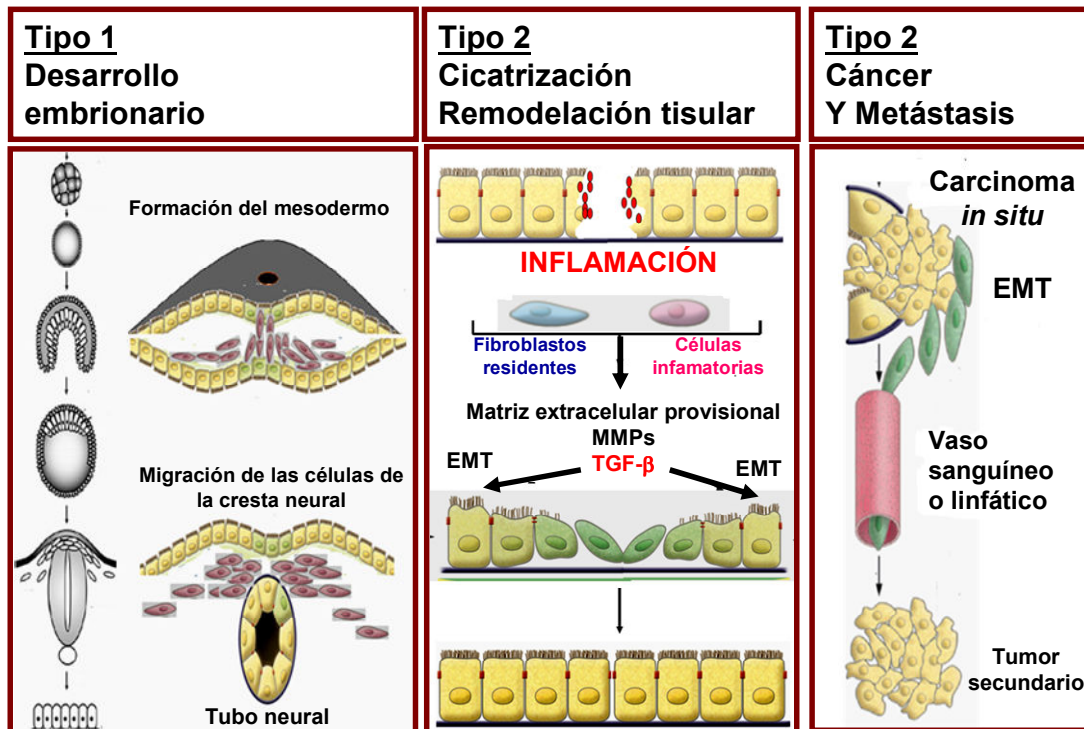


Figura 12. Clasificación de la EMT en tres tipos según el contexto y el fenotipo de la célula resultante.

### 7.2. Cambios fenotípicos tras un proceso de EMT

Las células epiteliales presentan una serie de características fenotípicas definitorias, entre las que se encuentran:

A) Presentan **numerosas uniones** célula-célula y célula-matriz extracelular (ECM) [revisado por Adams, 2002; Franke, 2009, Green et al 2010]

Las células epiteliales están firmemente unidas unas a otras mediante uniones intercelulares de distintos tipos, que incluyen:

- Uniones estrechas (tight junctions) o zonula ocludens, en cuya formación intervienen las proteínas ZO (zonula ocludens) 1, 2, 3, ocludinas y claudinas.
- Uniones adherentes (adherens junctions) o zonula adherens, formadas por moléculas de E-cadherina que interactúan entre sí mediante sus dominios extracelulares, mientras que la parte citoplasmática se ancla a filamentos de actina mediante  $\alpha$  y  $\beta$ -catenina.

La presencia de uniones adherentes y uniones estrechas forma una banda que rodea el perímetro de la célula e impide la libre difusión de los componentes de la membrana plasmática, haciendo de límite entre la membrana basolateral y la membrana apical, de composición y aspecto diferentes. Por tanto, este tipo de uniones contribuyen a la **polaridad de membrana** que se observa habitualmente en células epiteliales.

- Desmosomas o macula adherens, establecen conexiones puntuales en forma de disco entre células vecinas. Estas uniones entre células están mediadas por proteínas tipo cadherinas llamadas desmogleína y desmocolina, cuyo dominio intracelular contacta con los filamentos intermedios, mediante proteínas puente (desmoplaquina, placoglobina, placofilina). La función básica de los desmosomas en tejidos epiteliales es unir los filamentos intermedios de citoqueratina de células adyacentes.
- Uniones tipo gap, poros formados por el ensamblaje de moléculas de conexina, cuya función no es cohesionar el tejido, sino permitir la comunicación entre células mediante los poros que forman.

Las células epiteliales están también unidas a la lámina basal, mediante interacciones que se establecen con componentes de la ECM. En estas uniones intervienen estructuras como los hemidesmosomas y juegan un papel esencial las integrinas, que asocian la ECM con el citoesqueleto de la célula.

Este elevado número de uniones célula-célula y célula-matriz hace que las células que forman los epitelios estén fuertemente cohesionadas entre sí y con la membrana basal y permite a los epitelios ejercer su función principal: actuar como barreras físicas y barreras de permeabilidad.

B) Los filamentos intermedios son uno de los 3 componentes del citoesqueleto celular, junto con los microtúbulos y los filamentos de actina. La presencia de **citoqueratinas** como proteínas formadoras de filamentos intermedios es una característica definitoria del fenotipo epitelial [revisado por Karantza, 2011].

C) Las células epiteliales son **inmóviles** y la actina tiene una disposición cortical bajo la membrana plasmática.

Cuando el proceso de EMT se ha completado, hay un cambio completo del fenotipo celular [revisado por Kalluri y Weinberg, 2009; Zeisberg y Neilson 2009; Taylor et al 2010]:

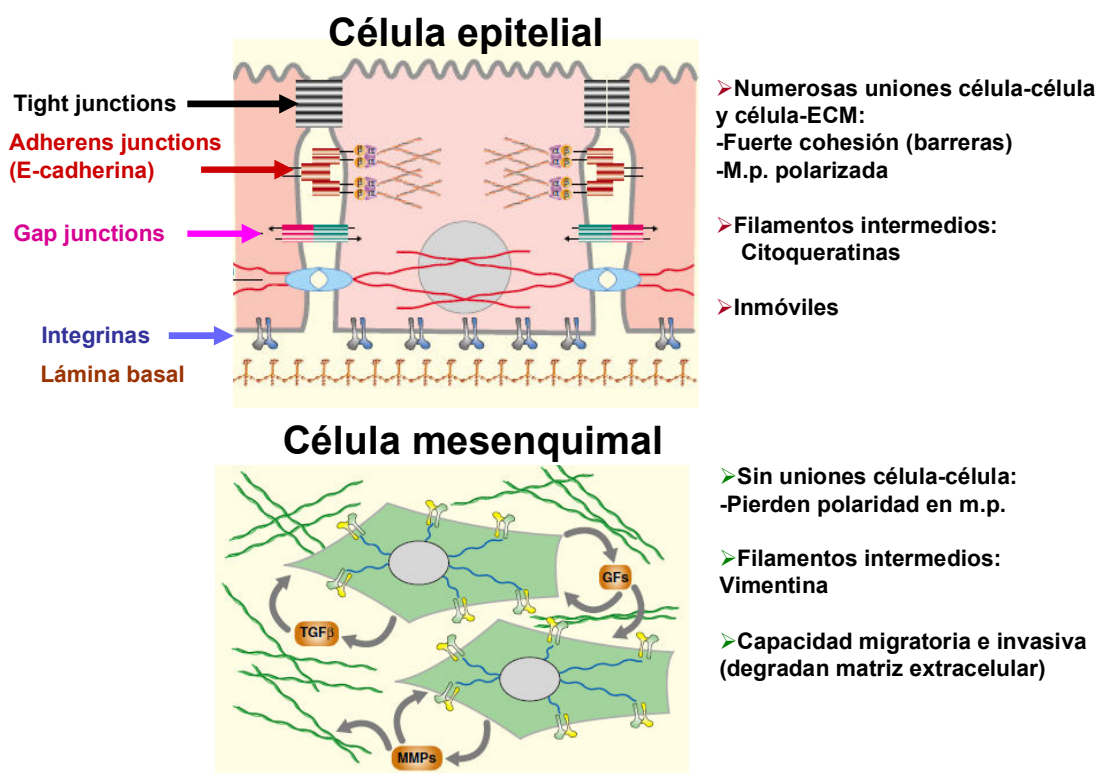
A) Las células **pierden la polaridad** basolateral-apical debido a la represión de proteínas de complejos de polaridad (como Par3 y Par6) y de uniones intercelulares, como E-cadherina, ZO-1, ocludina y claudina. El cambio prototípico de EMT es una disminución de la expresión de E-cadherina [Hay et al., 1995], que es sustituida por cadherinas de otro tipo, como N-cadherina (que se expresa en células mesenquimales, fibroblastos, células tumorales y tejido neural) o OB-cadherina (marcador de fibroblastos activados). Una consecuencia de la disminución de la expresión de la E-cadherina es que la  $\beta$ -catenina queda libre y puede trasladarse al

núcleo por lo que el cambio de localización de la  $\beta$ -catenina desde la membrana plasmática al citosol o núcleo se considera una evidencia de EMT.

B) Adquieren **capacidad migratoria** y se produce una remodelación del citoesqueleto. Así, la actina se reordena formando fibras de estrés, y la expresión de citoqueratinas disminuye, expresándose en su lugar otro tipo de proteínas formadoras de filamentos intermedios, como vimentina.

Además en células que sufren EMT tipo 2 y 3 se expresa en etapas tempranas de la transición el marcador de fibroblastos FSP-1 (Fibroblast Specific Protein-1), un marcador prototípico de fibroblastos y que se cree que regula la motilidad [Helfman et al., 2005]. Otra proteína de citoesqueleto que se expresa *de novo* es  $\alpha$ -SMA uno de los 6 miembros de la familia de actinas [Okada et al., 2000; Zeisberg et al., 2007a y b].

C) adquieren **capacidad invasiva** y por tanto la capacidad de remodelar la ECM. Así, sintetizan proteínas que degradan la ECM (MMPs y proteínas del sistema plasminógeno-plasmina como uPA y PAI-1) y regulan la síntesis de proteínas de la ECM, aumentando la expresión de proteínas formadoras de una ECM fibrilar (fibronectina, colágeno I, colágeno III y laminina5) y reprimiendo la expresión de componentes de membrana basal (colágeno IV y laminina 1). La EMT está por tanto asociada con un cambio en el microambiente de las células, que pasan de estar unidas a una membrana basal a estar rodeadas de una matriz extracelular fibrilar y como consecuencia se produce un cambio en el perfil de expresión de distintas integrinas, reflejo de una alteración de las interacciones célula-matriz extracelular.



**Figura 13.** Cambios fenotípicos tras un proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT).

En la [Tabla 4](#) se resumen los principales marcadores fenotípicos cuya expresión disminuye o aumenta durante la EMT, así como los factores de transcripción que regulan este proceso.

**Tabla 4.** Principales marcadores fenotípicos cuya expresión aumenta o disminuye durante la EMT y factores de transcripción que regulan este proceso

	<b>ATENUADOS</b>	Tipo EMT	<b>ADQUIRIDOS O AUMENTADOS</b>	Tipo EMT
Proteínas de membrana	<b>E-cadherina</b>	1,2,3	N-cadherina	1,2
	<b>ZO-1</b>	1,2,3	OB-cadherina	2
			Integrina $\alpha 5\beta 1$	1,3
			Integrina $\alpha v\beta 6$	1,3
			Syndecan-1	1,3
Proteínas de citoesqueleto	<b>Citoqueratinas</b>	1,2,3	FSP1	1,2,3
			$\alpha$ -SMA	2,3
			Vimentina	1,2
			$\beta$ -catenina	1,2,3
Proteínas de matriz extracelular	<b>Colágeno <math>\alpha 1(IV)</math></b>	1,2,3	Colágeno $\alpha 1(I)$	1,3
	<b>Laminina 1</b>	1,2,3	Colágeno $\alpha 1(III)$	1,3
			Fibronectina	1,2
			Laminina 5	1,2
Factores de transcripción			SNAI1 (Snail)	1,2,3
			SNAI2 (Slug)	1,2,3
			Zeb1	1,2,3
			Zeb2	1,2,3
			Twist	1,2,3
			Goosecoid	1,2
		FOXC2	3	

### 7.3. Factores de transcripción implicados en EMT.

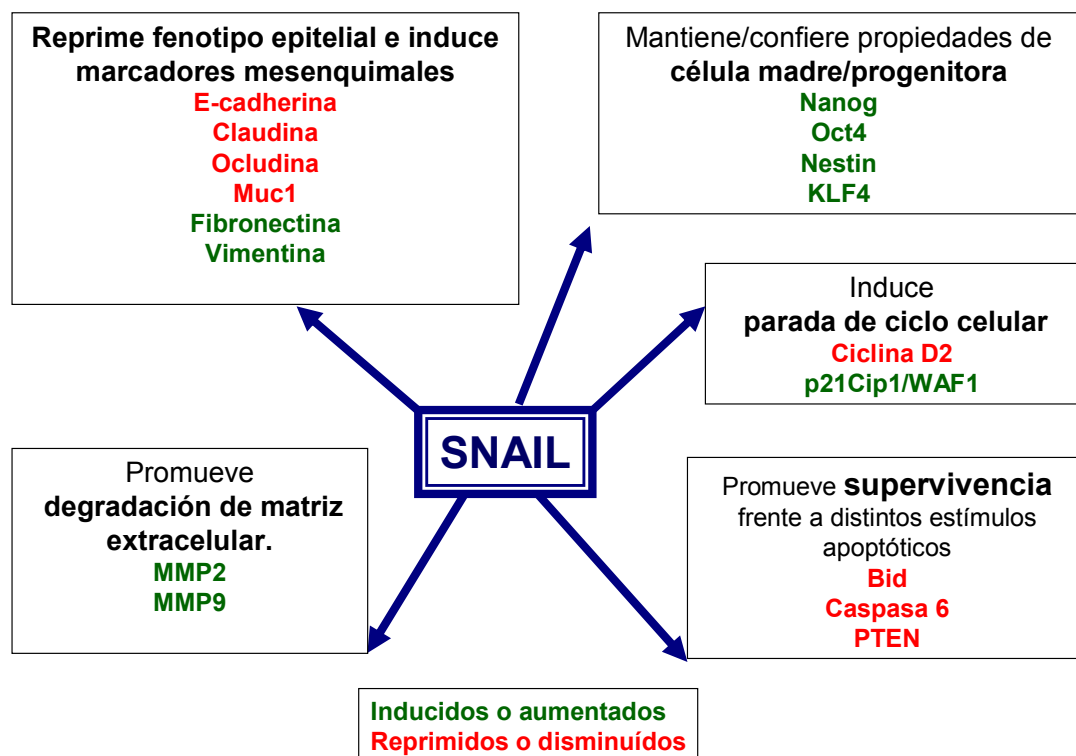
El número de inductores de EMT conocidos está en continuo aumento e incluye factores de crecimiento, hipoxia, constituyentes de la ECM y proteasas. A pesar de la distinta naturaleza de los inductores, la respuesta EMT da lugar a un resultado relativamente uniforme. Es por ello que existe gran interés en los factores de transcripción comunes a las distintas vías de señalización que controlan la respuesta EMT. Como hemos dicho anteriormente, la pérdida de la expresión de E-cadherina se considera un rasgo característico de la EMT, y los factores de transcripción implicados en este proceso fueron descubiertos en primera instancia como represores de la E-cadherina.

Los factores de la familia Snail, SNAI1 (o Snail) y SNAI2 (llamado anteriormente Slug) fueron los primeros factores de transcripción descritos como moduladores de la expresión de E-cadherina. SNAI1 se une directamente a las cajas E que se encuentran en el promotor de la E-cadherina, de ocludinas y claudinas para reprimir su expresión [Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000]. La sobreexpresión de Snail es suficiente para inducir una EMT completa [Batlle et al. 2000; Cano et al. 2000].

Posteriormente se han identificado factores de transcripción adicionales que reprimen directa o indirectamente la transcripción de E-cadherina y son capaces por sí mismos de inducir EMT. Estos factores incluyen (i) miembros de la familia bHLH como Twist, E47/TCF3 y TCF4/E2-2 [Perez-Moreno et al., 2001], (ii) los factores homeobox con 2 dedos de zinc Zeb1 (=  $\delta$ EF1 o Tef8) y Zeb2 (=SIP1) [Vandewalle et al., 2009],

que ejercen su función represora uniéndose a distintos co-represores como CtBPs, HDACs y BRG1 [Browne et al, 2010; Sanchez-Tillo et al., 2010], (iii) Goosecoid, un factor de transcripción homeobox que juega un papel fundamental en el organizador Spemann y que se ha relacionado con procesos metastáticos en tumores de mama [Hartwell et al., 2006], (iv) FOXC2 (Forkhead box C2), regulado por diversos inductores de EMT, como TGF- $\beta$ , Snail, Twist o Goosecoid y que contribuye a la consecución del proceso de EMT, sugiriendo un papel important para FOXC2 en la EMT tipo 3 [Mani et al., 2007b] y (v) KLF8 [Wang et al., 2007], aunque actualmente se desconoce como encaja este factor de transcripción en el esquema de inducción de EMT y como puede ser afectado por otros inductores de EMT durante la progresión tumoral.

Snail regula la expresión de Zeb1 y Zeb2, sugiriendo una regulación jerárquica de la expresión de los factores de transcripción implicados en EMT en la que SNAI1 y SNAI2 pueden actuar como un interruptores tempranos que conducen a la activación posterior de ZEB1/2, TCF3, TCF4, Twist, Goosecoid y FOXC2 [De Craene et al., 2005; Peinado et al., 2007; revisado por Hugo et al., 2011].



**Figura 14.** Snail controla un complejo programa transcripcional y regula múltiples funciones biológicas.

Actualmente se sabe que Snail regula un complejo programa de transcripción que incluye multitud de genes, controlando varios aspectos de la biología celular. Snail regula negativamente la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina, claudinas, ocludinas y mucina-1 [Martínez-Estrada et al., 2006; Ikenouchi et al., 2003; Guaita et al. 2002]; regula positivamente la expresión de proteínas características de células mesenquimales como la vimentina y fibronectina [Cano et al. 2000; Guaita et al., 2002] y controla la expresión de factores implicados en la degradación de la matriz extracelular como MMP2 y MMP9 [Qiao et al., 2010]. Todo ello contribuye a aumentar la invasividad y la capacidad metastásica. Además induce parada de ciclo celular,

promueve supervivencia celular y confiere o mantiene propiedades de células madre (*stem cells*) [revisado por Wu y Zhou, 2010]. La complejidad del programa de transcripción regulado por Snail adquiere sentido cuando se contempla el fenómeno de EMT a la luz del desarrollo embrionario. El fenómeno de transición epitelio-mesénquima es fundamental durante el desarrollo embrionario y requiere que (por ejemplo durante la delaminación de células de la cresta neural) ciertas células epiteliales se desdiferencien, se delaminen, migren a lugares lejanos y allí se diferencien de nuevo a muy distintos tipos celulares. Snail es fundamental para que estas acciones se completen con éxito, ya que su inducción favorece migración frente a proliferación, induce supervivencia celular, confiere a las células carácter de células madre/progenitoras y las mantiene desdiferenciadas hasta que llegan a su destino.

#### 7.4. EMT inducida por TGF- $\beta$

Como hemos visto en el apartado anterior, los miembros de la familia del TGF- $\beta$  y el propio TGF- $\beta$  son importante inductores de EMT durante el desarrollo (EMT tipo 1) e intervienen también en la EMT tipo 2 y 3. Mientras que el tratamiento con TGF- $\beta$  por sí sólo es suficiente para inducir EMT en algunas células epiteliales *in vitro*, otras células son resistentes o moderadamente sensibles a la EMT inducida por TGF- $\beta$  [Brown et al., 2004] y en otras ocasiones el TGF- $\beta$  necesita cooperar con otras vías de señalización como Wnt [Eger et al., 2004; Nelson y Nusse, 2004], Hedgehog [Karhadkar et al., 2004], Ras oncogénico/RTKs [Grunert et al., 2003; Siegel et al., 2003; Seton-Rogers et al., 2004; Xie et al., 2004] y Notch para inducir una EMT completa [Oft et al., 1998; Janda et al., 2002; Nawshad et al., 2005].

La señalización Smad es esencial para la EMT inducida por TGF- $\beta$  en diversos tipos de células tales como células del epitelio de los túbulos renales en cultivo primario, células epiteliales de glándula mamaria NmuMG y hepatocitos [Piek et al., 1999; Sato et al., 2003; Valcourt et al., 2005; Pardali y Moustakas, 2007; Dooley et al., 2008].

Las Smads tienen poca afinidad por el DNA y necesitan interactuar con cofactores para adquirir especificidad por el gen diana. Recientemente se ha descubierto que varios factores de transcripción que promueven EMT, incluyendo Snail, Twist, Zeb1, Zeb2, AP-1, LEF1/TCF y Sp1 pueden actuar como cofactores para las Smads. En 2010, Fuxe et al. propusieron el nombre de complejos Smad promotores de EMT o EPSCs (EMT Promoting Smad Complexes) para estas asociaciones de Smad con otros factores de transcripción, que actúan tanto en la represión de genes epiteliales como en la activación de genes mesenquimales. La accesibilidad y la estabilidad de los cofactores de las Smads podría ser el factor limitante que determine si se formarán los EPSCs y cuáles de ellos y que determine por tanto si se produce EMT en respuesta al TGF- $\beta$ . El aumento en la expresión y la estabilidad de estos cofactores mediante activación por la vía Wnt o Ras podría sensibilizar a las células a la EMT inducida por TGF- $\beta$ .

Las vías de señalización no-Smad activadas por TGF- $\beta$  también están implicadas en el proceso de EMT en diferentes tipos celulares [revisado por Moustakas y Heldin, 2005]. Así, se ha descrito la implicación de GTPasas de la familia Rho que incluyen RhoA, Rac y Cdc44, que juegan un importante papel en la organización del citoesqueleto, motilidad celular y controlan la expresión génica a través de una gran variedad de factores. La activación de las rutas de JNK y p38 durante la EMT inducida por TGF- $\beta$  [Yamashita et al., 2008] es necesaria en algunos modelos celulares, como células epiteliales de tráquea y diferentes líneas celulares transformadas y no transformadas [Alcorn et al., 2008]. También se ha visto que la vía PI3K-Akt puede mediar la inducción de EMT por el TGF- $\beta$  en determinados contextos,

por ejemplo en células epiteliales de glándula mamaria NMuMG [Bakin et al., 2000]. Además, la administración conjunta de TGF- $\beta$  y EGF dispara una EMT exagerada mediante la activación de ERK1/2 y PI3K-AKT [Uttamsingh et al., 2008]. Sorprendentemente, la inhibición farmacológica de PI3K-Akt no tiene efecto en las características morfológicas y fenotípicas de EMT pero disminuye la adquisición de fenotipo migratorio e invasivo [Uttamsingh et al., 2008], sugiriendo que los cambios morfológicos y las características móviles adquiridas durante la EMT pueden ser diferentes entidades fisiológicas. Dentro de esta vía, la quinasa mTOR induce un incremento del tamaño celular y de la síntesis de proteínas, que acompañan a la respuesta EMT [Lamouille y Derynck, 2007]. El TGF- $\beta$  también puede activar la señalización mediada por Src, FAK (Focal Adhesion Kinase), NF $\kappa$ B, integrinas e ILKs que también contribuyen a EMT [Cicchini et al., 2008; revisado por Taylor et al., 2010].

Evidencias recientes indican que los miembros de la familia miR-200 tienen un papel central en la regulación del proceso de EMT a través de ZEB1 y ZEB2 y que su expresión disminuye en células que sufren EMT [Cano y Nieto, 2008]. El TGF- $\beta$  modula de la expresión de esta familia de miRNAs, y así induce EMT en tumores de mama [Gregory et al., 2008]. Además, la EMT inducida por TGF- $\beta$  en queratinocitos está asociada con la inducción de miR-21 [Zavadil et al., 2007]. La función exacta de los microRNAs en la regulación de los distintos tipos de EMT se conocerá sin duda con trabajos futuros.

## 7.5. EMT inducida por TGF- $\beta$ en células hepáticas.

Nuestro grupo ha contribuido a caracterizar la respuesta de hepatocitos y células de hepatoma al TGF- $\beta$  en términos de EMT. En hepatocitos fetales y neonatales de rata en cultivo primario, el TGF- $\beta$  induce un proceso de EMT caracterizado por un aumento de la expresión de vimentina, disminución de la expresión de CK18 y adquisición de morfología fibroblástica [Pagan et al., 1999; Sánchez et al., 1999], concomitante con un aumento en la expresión de Snail y disminución en la expresión de E-cadherina [Valdés et al., 2002]. Además, estos hepatocitos fetales, una vez que han sufrido EMT, pierden la respuesta apoptótica al TGF- $\beta$  y aumentan su capacidad migratoria [Valdés et al., 2002]. En colaboración con el grupo del Dr. Nelson Fausto, se pudo probar que también los hepatocitos fetales humanos sufren EMT en respuesta al TGF- $\beta$  [Caja et al., 2010].

El proceso de EMT inducido por el TGF- $\beta$  parece estar acompañado de una desdiferenciación de los hepatocitos fetales de rata [Sánchez et al., 1999; Valdés et al., 2002] y hepatocitos fetales humanos [Caja et al., 2010], evidenciado por la aparición de marcadores de células ovas como OV-6 [Valdés et al., 2002], y la bipotencialidad de las células generadas, que se pueden diferenciar, según el protocolo utilizado, a colangiocitos o hepatocitos [del Castillo et al., 2008b]. También los hepatocitos fetales humanos adquieren carácter de célula progenitora cuando son tratados con TGF- $\beta$ , como se infiere del aumento de la expresión de Thy-1(=CD90) [Caja et al., 2010].

La capacidad de los hepatocitos adultos de sufrir EMT en respuesta al TGF- $\beta$  ha suscitado interés en relación con su posible capacidad de contribuir a la fibrosis hepática, pues existen varias evidencias que indican que el TGF- $\beta$  tiene un papel crucial en la iniciación y progresión de la fibrosis hepática [Dooley et al., 2001]. La EMT inducida por TGF- $\beta$  en células hepáticas también tiene interés en relación con la hepatocarcinogénesis. Nuestro grupo ha demostrado que las células hepáticas transformadas tienen capacidad de sufrir EMT en respuesta al TGF- $\beta$  *in vitro* [Bertrán et al., 2009; Caja et al., 2010].



**II.**

---

**Antecedentes**



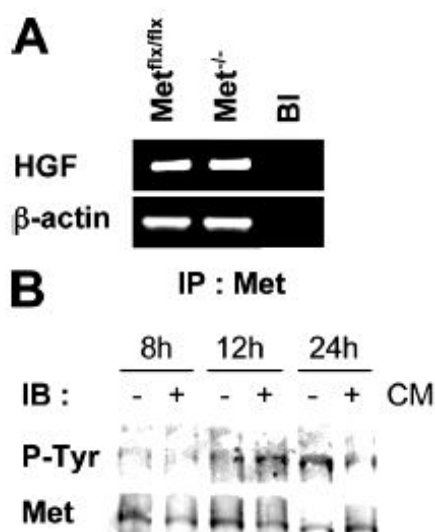
Nuestro grupo de investigación está centrado en el estudio de los mecanismos que regulan la proliferación, diferenciación y muerte de las células hepáticas. Así, los trabajos de nuestro grupo se han enfocado, fundamentalmente, en el análisis del papel del TGF- $\beta$  en la biología de las células hepáticas y en el mecanismo mediante el cual diferentes factores de crecimiento como el HGF y los ligandos del EGFR, promueven la supervivencia, diferenciación y proliferación. Estudios realizados en hepatocitos fetales primarios de rata pusieron de manifiesto que el TGF- $\beta$  a dosis bajas, ejerce un efecto inhibitor del crecimiento [Sánchez *et al.*, 1995] pero a dosis más altas es un potente inductor de apoptosis [Sánchez *et al.* 1996]. El EGF protege a los hepatocitos fetales de la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ , mientras que el HGF no es capaz de inhibir dicha muerte [Fabregat *et al.*, 1996; Fabregat *et al.*, 2000]. La caracterización del proceso apoptótico inducido por el TGF- $\beta$  demostró que ésta cursa con una alteración de la expresión de miembros de la familia Bcl-2, despolarización de la membrana mitocondrial, salida de Citocromo C al citosol y posterior activación de caspasas. Todos estos eventos son dependientes de un proceso de estrés oxidativo inducido por el TGF- $\beta$ , mediado a través de la inducción de NOX4 y la regulación negativa de la expresión y/o actividad de sistemas antioxidantes [Fabregat *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2001b; Sanchez *et al.*, 1996; Herrera B *et al.*, 2001c, Herrera *et al.*, 2004; Carmona-Cuenca *et al.*, 2008].

Sin embargo, cabe destacar que no todos los hepatocitos fetales culminan el proceso apoptótico inducido por TGF- $\beta$ , existiendo una proporción de alrededor del 40-60 % de hepatocitos que sobreviven a dichos efectos (Sánchez *et al.*, 1999). Esta subpoblación resistente al TGF- $\beta$  sufre una transformación fenotípica hacia células mesenquimáticas o EMT. Dicha EMT se correlaciona con un aumento en la expresión del factor de transcripción Snail, que reprime la expresión de la cadherina E y conduce a la pérdida de las adhesiones celulares y adquisición de propiedades migratorias [Valdés *et al.*, 2002, del Castillo *et al.*, 2006]. La resistencia a apoptosis tras EMT se debe a la expresión de factores de supervivencia de la familia de los ligandos del EGFR, que está mediada a través de un bucle autocrino de TGF- $\beta$  [del Castillo *et al.*, 2006]. Por último, la caracterización fenotípica detallada de las células que han sufrido EMT permitió demostrar que además del cambio de marcadores epiteliales por mesenquimáticos propios de dicho proceso, la EMT conlleva pérdida de la expresión de factores de transcripción importantes para la diferenciación hacia el linaje hepático (HNFs) y ganancia de expresión de marcadores de células madre/progenitoras (Thy-1, c-kit), es decir la generación de células que pueden funcionar como células madre/progenitoras facultativas [del Castillo *et al.*, 2008b].

En los últimos años se ha abierto una nueva línea de investigación en nuestro laboratorio, que tiene por objeto el estudio de la relevancia de la señalización de HGF/Met y sus interacciones con otras vías, como la del EGFR y el TGF- $\beta$ , en la biología de las células progenitoras hepáticas y sus implicaciones en la fisiología y patología del hígado. Para ello, establecimos varias líneas celulares clonales a partir de células ovas inducidas por tratamiento con DDC, que expresan una forma funcional (células Met<sup>flx/flx</sup>) o no funcional (células Met<sup>-/-</sup>) de Met, usando el sistema de modificación genética Cre-loxP y la consiguiente recombinación mediada por adenovirus. Las células Met<sup>flx/flx</sup> proceden de un modelo de ratón knockout condicional de Met desarrollado en el laboratorio del Dr. S.S. Thorgeirsson [Huh *et al.*, 2004].

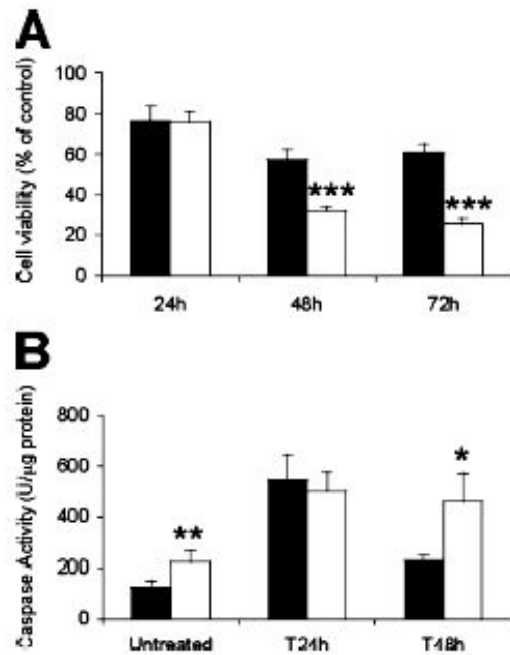
Las líneas de células ovas obtenidas fueron caracterizadas fenotípicamente, demostrando que presentan un fenotipo inmaduro bipotencial característico de células ovas. Además, las células Met<sup>-/-</sup> no presentan fosforilación de Met en respuesta al HGF, ni activación de vías de señalización dianas de Met como Akt o ERK1/2. Estos datos, unidos a la ausencia de proliferación de las células ovas Met<sup>-/-</sup> en respuesta al HGF servían como pruebas de validación funcional de nuestro modelo y demostraban

su utilidad como una herramienta para el estudio de la relevancia de la señalización HGF/Met en las células ovasales [del Castillo et al., 2008a]. En este trabajo se describe además que en las células  $Met^{flx/flx}$  opera un bucle autocrino de HGF, evidenciado por la expresión endógena de HGF, la activación basal de Met en ausencia de HGF exógeno (Fig.1) y la actividad antiapoptótica del medio condicionado libre de suero de las células ovasales sobre las células  $Met^{flx/flx}$ . Las células  $Met^{-/-}$  también tienen la capacidad de expresar HGF, pero no de responder a él, debido a la ausencia de actividad tirosina quinasa de Met. Es muy importante destacar que la ausencia de actividad tirosina quinasa de Met no afecta a la capacidad proliferativa celular, pero produce un incremento de la sensibilidad a la apoptosis inducida por privación de suero y tratamiento con TGF- $\beta$  (Fig.2), revelando un papel crítico de Met en la supervivencia de las células ovasales a través de un mecanismo autocrino.

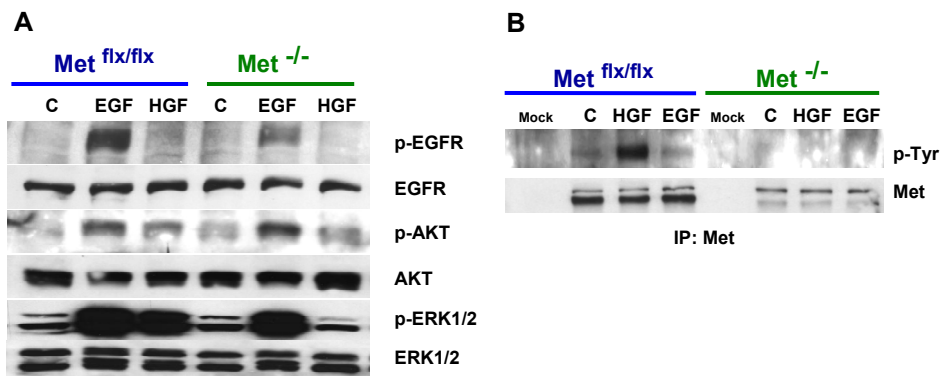


**Figura 1.** En las células ovasales  $Met^{flx/flx}$  opera un bucle autocrino HGF/Met. (A) Expresión basal del mRNA de HGF detectado mediante RT-PCR en células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$ . BI: blanco, no retro-transcripción. La expresión de  $\beta$ - actina se usó como normalizador. (B) Cinética de la activación de Met en células  $Met^{flx/flx}$  cultivadas en medio sin suero o medio condicionado (CM) libre de suero. Para la inmunoprecipitación de Met se usaron extractos totales. La fosforilación se detectó mediante hibridación con anticuerpo anti-fosfotirosina, utilizando Met como control de carga. (Figura tomada de: del Castillo et al., 2008a)

En este mismo trabajo se demostró que el EGF es un potente mitógeno en las células ovasales, sin que se observasen diferencias aparentes entre células que expresan un receptor Met funcional o no [del Castillo et al., 2008a]. Además resultados preliminares obtenidos en el laboratorio indicaban que en células ovasales el HGF no activa el EGFR ni el EGF activa Met, lo que sugería que no existe una activación cruzada entre los ligandos y los receptores de estas vías (Fig.3). Sin embargo la demostración de la existencia o no de una interacción cruzada entre ambas vías requería experimentos adicionales y sin duda, nuestro modelo celular carente de actividad tirosina quinasa de Met era una herramienta muy útil para este estudio.



**Figura 2.** Las células ovasales  $Met^{-/-}$  son más sensibles a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ . **(A)** Viabilidad celular tras tratamiento con TGF- $\beta$  determinada mediante tinción con cristal violeta. Los datos se expresan como porcentaje respecto a las células sin tratar y representan la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **(B)** Actividad caspasa-3 en células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  tras tratamiento con TGF- $\beta$  durante 24 y 48 horas. Barras negras:  $Met^{flx/flx}$ ; Barras blancas:  $Met^{-/-}$ . Los datos son la media $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes. <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  (Figura tomada de: *del Castillo et al., 2008a*)



**Figura 3.** Ausencia de interacción directa a nivel de receptor entre la vía HGF/Met y la ruta del EGFR en las células ovasales. **(A)** Detección de la activación del EGFR, AKT y ERK1/2 en respuesta a tratamientos con EGF 20 ng/ml durante 15 minutos, o con HGF 20 ng/ml durante 10 minutos, mediante Western blot. **(B)** Detección de la activación de Met tras tratar las células con HGF 20 ng/ml durante 5 minutos, o con EGF 20 ng/ml durante 10 minutos, mediante inmunoprecipitación de Met total y posterior inmunodetección de fosfo-tirosinas. Se muestra un experimento representativo de dos realizados



**III.**

---

**Objetivos**



Partiendo de los resultados descritos en el apartado de Antecedentes, que establecían un papel relevante para el HGF, EGF y TGF- $\beta$  como moduladores de las respuestas proliferativa y apoptótica en células ovas, en este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Profundizar en el estudio del papel del receptor EGFR y sus ligandos en la proliferación y supervivencia de células ovas y analizar en detalle una posible interacción cruzada entre los receptores Met y EGFR.
2. Caracterizar la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en células ovas e investigar los mecanismos que median el papel protector de la señalización autocrina de HGF/Met frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ .
3. Analizar la capacidad del TGF- $\beta$  para inducir un proceso de EMT en células ovas y las consecuencias funcionales de este cambio fenotípico, así como determinar si la ausencia de un receptor Met funcional tiene algún efecto sobre este proceso.

Para su desarrollo, se ha utilizado como herramienta un modelo *in vitro* de líneas de células ovas que expresan una forma funcional del receptor Met (células Met<sup>flx/flx</sup>) o una forma mutante sin actividad tirosina quinasa (células Met<sup>-/-</sup>).



**IV.**

---

**Material y Métodos**



## 1. Modelo celular: células ovas Met<sup>fix/fix</sup> y Met<sup>-/-</sup>

Las líneas de células ovas Met<sup>fix/fix</sup> y Met<sup>-/-</sup> usadas en este trabajo proceden de un modelo de ratón *knock-out* condicional para Met, generado mediante el sistema de modificación genética Cre-loxP, en el laboratorio del Dr. Thorgeirsson (NIH, Bethesda, EE.UU.). Para la activación y expansión *in vivo* de las células ovas Met<sup>fix/fix</sup> se utilizó el modelo *in vivo* de daño hepático crónico basado en el tratamiento con 0.1% de DDC [Preisegger et al., 1999]. Las líneas clonales de células Met<sup>-/-</sup> se generaron a partir de las células Met<sup>fix/fix</sup> por infección con un adenovirus que expresa la Cre recombinasa bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) (Ad-CMV-Cre) (Vector Biolabs). Estas células expresan un receptor Met que carece de actividad tirosina quinasa y, por lo tanto, no es funcional. La descripción detallada del aislamiento y subclonaje de las células, así como la caracterización fenotípica y validación funcional del modelo celular se encuentra en [del Castillo et al. 2008a].

Las células se mantuvieron en cultivo en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina 120 µg/ml, estreptomycin 100 µg/ml y anfotericina B 2,5 µg/ml, que llamaremos medio completo, en condiciones controladas de temperatura (37°C), humedad (80%) y atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%). El medio se renovó completamente cada 48-72 horas y las células se tripsinizaron y subcultivaron cuando alcanzaron el 80-90% de confluencia. Los experimentos se realizaron durante los primeros pases (pases 2-8).

## 2. Factores de crecimiento e inhibidores

Los factores de crecimiento e inhibidores utilizados en este trabajo aparecen resumidos en la [Tabla I](#). Antes de realizar los tratamientos se dejaban las células en ausencia de suero entre 2 y 12 horas. Los inhibidores se añadían 1 hora antes que los factores de crecimiento (en los casos en los que no haya sido así se especificará en el pie de figura) y en los tratamientos de larga duración los inhibidores y factores de crecimiento fueron renovados cada 48-72h.

**Tabla I.** Factores de crecimiento e inhibidores

Factores de crecimiento e inhibidores	Concentración	Casa comercial
EGF	40 ng/ml	Serono Laboratories
HGF	20 ng/ml	R&D systems
TGF-β	1 ng/ml	Calbiochem
AG1478 (Inh. EGFR)	5 µM	Calbiochem
Inhibidor IV de Akt	2,5 µM	Calbiochem
LY294002 (Inh. PI3K)	7,5 µM	Calbiochem
PD98059 (Inh. ERK1/2)	20 µM	Calbiochem
SB203580 (Inh. p38)	10 µM	Calbiochem
SP600125 (Inh. JNK)	30 µM	Alexis Biochemicals
SU11274 (Inh. Met)	2,5 µM	Calbiochem
U0126 (Inh. MEK)	5 µM	Promega

### 3. Silenciamiento génico del EGFR mediante siRNA

Para la transfección transitoria con oligonucleótidos pequeños de interferencia de RNA o siRNA (small interfering RNA), las células se sembraron en medio DMEM completo a una confluencia del 50-60%, que se determinó previamente como idónea para una transfección eficiente. Al día siguiente, las células se transfectaron con el siRNA comercial “mouse EGFR SMARTpool siRNA” (50nM) o con un control “non-targeting siRNA” (50nM) (ambos de Dharmacon), utilizando como reactivo de transfección TransIT-siQuest (Mirus) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las células transfectadas se mantuvieron durante 16 horas en medio DMEM completo y en presencia del siRNA y posteriormente se tripsinizaron, se diluyeron a la concentración celular adecuada y se sembraron de nuevo en placas de cultivo para los correspondientes ensayos.

### 4. Análisis de la expresión génica

#### 4.1. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

El RNA fue aislado mediante el sistema comercial RNeasy mini Kit (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la valoración de la concentración y pureza del RNA, se realizó una lectura espectrofotométrica por duplicado a 260, 280 y 310 nm. La lectura a 260 permitió calcular la concentración del ácido nucleico en la muestra; 280 nm es el pico de absorción de las proteínas, por lo que la relación entre las absorbancias A260/A280 daba idea del grado de contaminación de proteínas que tenían las muestras; en este sentido, se consideraba que una relación de 1,8-2 es indicativa de un buen grado de pureza del RNA. La lectura a 310 nm se corresponde a la absorbancia debida a otras impurezas. La valoración cuantitativa de los ácidos nucleicos aislados se realizó teniendo en cuenta que una unidad de D.O. a 260 nm se corresponde con 40 µg/ml de RNA [Sambrook et al., 1989]. Las muestras se guardaron a -80°C hasta el momento de llevar a cabo la retrotranscripción.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 2-3 µg de RNA, en dos reacciones consecutivas. En la primera reacción se eliminan las posibles estructuras secundarias formadas en el RNA, mediante calentamiento a 65°C durante 5 minutos, en presencia de 0,25 µg de cebador poli dT<sub>15</sub> (Roche) y dNTPs 0,5 mM (Invitrogen). Posteriormente, se incubaba a 50°C durante 1 hora en presencia de 200 unidades de retrotranscriptasa (Superscript III RNase H Reverse Transcriptase, Invitrogen), DTT 5 mM y 40 unidades de inhibidor de RNAsas (RNasin, Promega). La reacción se detenía inactivando la enzima a 70°C durante 15 minutos. El cDNA obtenido se guardaba a -20°C. Como control de la posible presencia de DNA genómico, para cada condición se realizó un control (-RT) con todos los componentes de la mezcla de retrotranscripción excepto la enzima.

A continuación se realizaba la PCR a partir de 2 µl de la mezcla de reacción que contenía el cDNA, en presencia de los cebadores (1 µM, Sigma), dNTPs (100 µM, Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM, Ecogen), y 1 unidad de la polimerasa Ecotaq (Ecogen). La reacción de PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

- 1) 5 minutos a 95°C, para asegurar la completa desnaturalización del DNA.
- 2) 25-40 ciclos (dependiendo del gen analizado, ver [Tabla II](#)) de tres etapas cada uno:
  - 0,5-1 minuto a 94 °C (desnaturalización del cDNA).
  - 30 segundos a la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) apropiada para cada par de cebadores (T<sub>m</sub> indicada en la [Tabla II](#)). Durante esta etapa se produce la

hibridación de los cebadores con su secuencia complementaria en el cDNA. En la [Tabla II](#) se muestran las secuencias de los cebadores utilizados.

- 0,5-1 min (dependiendo del tamaño del amplicón) a 72°C, temperatura óptima de actividad de la Ecotaq. Esta es la denominada fase de extensión donde se produce la síntesis del producto de PCR.

3) 72°C durante 10 minutos, con el fin de asegurar la elongación completa del amplicón.

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1-1,5%, en tampón TAE 1x (Tris 40 mM; 0,1% Ácido acético glacial; EDTA 1 mM). Como controles de carga se usaron los niveles de mRNA de *β-actina* y *GAPDH*. Para cada reacción de PCR se llevaba también un blanco, que lleva agua en lugar de cDNA con el fin de descartar posibles contaminaciones de ésta.

**Tabla II.** Cebadores utilizados para RT-PCR

	Cebador 5'	Cebador 3'	Tm	Nº ciclos
<b>HB-EGF</b>	GACCCATGCCTCAGGAAATA	TGAGAAGTCCCACGATGACA	60	30
<b>TGF-α</b>	TGGTGCAGGAAGAGAAGC	TGACAGCAGTGGATCAGC	57	30
<b>β-actina</b>	ATGCCATCCTGCGTCTGGACC TGGC	AGCATTGCGGTGCACGATGG AGGG	65	30
<b>Gapdh</b>	CCATGTTTGTGATGGGTGTGA ACC	TGTGAGGGAGATGCTCAGTGT TGG	60	30

#### 4.2. RT-PCR cuantitativa (Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction o qRT-PCR)

Para estos ensayos, se partió de 1 µg de RNA (obtenido según se explica en el método anterior), al que se trataba adicionalmente con DNAsa (Quiagen) para evitar la presencia de posibles trazas de DNA genómico. Se procedió a la síntesis de cDNA a partir de 1 µg de RNA según se detalla en el método anterior y se diluyó 1: 10 con agua libre de nucleasas (Promega). Las reacciones de PCR 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 III](#).

**Tabla III.** Composición de la mezcla de reacción para qRT-PCR

cDNA (diluido 1:10)	2,5 µl
SYBR GREEN Master Mix 2x (Roche)	5 µl
Cebador 3' (5 µM)	0,6 µl
Cebador 5' (5 µM)	0,6 µl
Agua libre de nucleasas	1,3 µl

Para desarrollar la reacción de PCR se utilizó un equipo ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time de Applied Biosystems, de los servicios de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid.

En la [Tabla IV](#) se indican las secuencias de los cebadores empleados. La expresión de *Gusb* se empleó como normalizador interno.

**Tabla IV.** Cebadores utilizados para qRT-PCR

	<b>Cebador 5'</b>	<b>Cebador 3'</b>
<i>Albúmina</i>	ATCTGCACACTTCCAGAGAAGG	TCCATGACAGTCTTCAGTTGC
<i>Alfafetoproteína</i>	TGTTGCCAAGGAACTCG	GCAGCACTCTGCTATTTTGC
<i>Bim</i>	TGCGCCCGGAGATACGGATT	TGGTCTTCAGCCTCGCGGTA
<i>Bmf</i>	TGTCATGCTGCCTTGTGG	TGAGCCTGCAGGGAAACTG
<i>E-cadherina</i>	CAGCCTTCTTTTCGGAAGACT	GGTAGACAGCTCCCTATGACTG
<i>Foxa1</i>	TAGGGACTGTGAAGATGGAAGG	TGGTCATGTAGGTGTTTCATGG
<i>Foxa2</i>	GCCAGCGAGTTAAAGTATGC	ATGTTGCTCACGGAAGAGTAGC
<i>Foxa3</i>	CTGGGCTCAGTGAAGATGG	AGAGCTGAGTGGGTTCAAGG
<i>Gusb</i>	AAAATGGAGTGCCTGTTGGGT	CCACAGTCCGTCCAGCGCCTT
<i>HNF1β</i>	TCTCAGAACCTCATCATGACC	GCTAGCCCACTGTTAATGACC
<i>HNF4α</i>	CTTCTGCGAACTCCTTCTGG	GGAGCAGCACGTCCTTAAAC
<i>Integrina α2</i>	CGGAGAAAGCAGAAGTACCG	CTGCAGTCATAGCCAACAGC
<i>Integrina α5</i>	CCAAGAGAGCCGTAGTCTGC	GAGGCAGGATCTGGTAGGG
<i>Integrina α6</i>	GTTTCGAGTGACGGTGTTC	TCTTGAAGAAGCCCACTTCC
<i>Integrina αv</i>	GTTTCACACTTTGGGCTGTGG	GCAGGGATTTACGTACAGG
<i>Integrina β1</i>	CTTATTGGCCTTGCCTTGCT	TAGGATTTTCACCCGTGTCC
<i>Integrina β4</i>	CGGCTCAACATCCCTAACC	CGTACCCGGAACACATAGG
<i>NOX2</i>	CTGTATGCTGATCCTGCTGC	TTCCTGTCCAGTTGTCTTCG
<i>NOX4</i>	CCTCAACTGCAGCCTCATCC	CAACAATCTTCTTGTCTCC
<i>Onecut1</i>	CCTGGAGCAAACCTCAAGTCG	GTCCTTCCCGTGTCTTGC
<i>SNAI1</i>	TCCAAACCCACTCGGATGTGAAGA	TTGGTGCTTGTGGAGCAAGGACAT
<i>SNAI2</i>	CACATTGGAACCCACACATTGCCT	TGTGCCCTCAGGTTTGATCTGTCT
<i>SOD2</i>	AGCTGCACCACAGCAAGCAC	AGGCTGAAGAGCGACCTGAGT
<i>Zeb1</i>	GTACAAACACCACCTGAAAGAGC	CCATTCACAGGCATCAAGC
<i>Zeb2</i>	AAAGCGTTCAAACACAAACACC	CCGCTTGCAGTAGGAGTACC

La determinación de los niveles relativos de mRNA de *tPA*, *uPA*, *PAI-1*, *Col1α1* y *Col1α2* se llevó a cabo utilizando un array de expresión génica de la casa comercial SABiosciences (ref. PAMM-035)

Para cada condición, los datos de Ct (*Cycle threshold*) de cada gen se corrigieron con los valores de Ct de un normalizador interno, obteniéndose un valor denominado  $\Delta$ Ct. Este a su vez se expresó en relación a los valores de  $\Delta$ Ct de un control no tratado, obteniéndose un valor denominado  $\Delta\Delta$ Ct, que 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 no tratado.

## 5. Análisis de la expresión de proteínas mediante western blot

### 5.1. Obtención de proteínas

#### Extractos de proteínas totales

Tras los diferentes tratamientos, las células se lavaron con PBS a 4°C y se despegaron de la placa de cultivo mediante rascado, manteniendo las placas en hielo. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 minutos a 5.000 rpm y 4°C. Para proceder a la lisis celular, el precipitado que contenía las células se resuspendió en 80  $\mu$ l de tampón RIPA modificado (cuya composición se detalla en la [Tabla V](#)) y se mantuvo en hielo durante 30 minutos, agitando mediante vórtex cada 5 minutos para facilitar la lisis. Los lisados se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos, para eliminar los restos de membrana y se guardaron a -80°C, separando previamente alícuotas para valorar la concentración de proteínas.

**Tabla V.** Tampón RIPA modificado

Deoxicolato sódico	1%
Tris-HCl pH=7.4	10 mM
SDS	0,1%
NP-40	1%
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM
PMSF*	1 mM
Leupeptina*	5 $\mu$ g/ml
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> *	0,1 mM
DTT*	0,5 mM
NaF*	0,5 mM
Aprotinina*	1%

\*Adición extemporánea

#### Extractos de proteínas citoplasmáticas y nucleares

Para la separación diferencial de proteínas citoplasmáticas y nucleares se utilizó el método de Andrews-Faller [Andrews y Faller, 1991]. Los platos de cultivo se lavaron con PBS frío y las células se despegaron por rascado en PBS y posteriormente se centrifugaron a 5.000 rpm durante 3 minutos a 4°C, tras lo cual se eliminaba bien el sobrenadante y se resuspendía el precipitado en 400  $\mu$ l de Solución A (hipotónica) fría, cuya composición se indica en la [Tabla VI](#).

**Tabla VI. Solución A (hipotónica)**

HEPES pH=7,9	10 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
DTT*	0,5 mM
PMSF*	0,2 mM
Aprotinina*	2,5 µg/ml
Leupeptina*	2,5 µg/ml
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> *	0,1 mM

\*Adición extemporánea

Los precipitados celulares se mantuvieron en hielo durante 10 minutos en esta solución A, agitando suavemente cada minuto para facilitar la lisis. Al cabo de los 10 minutos, se agitaba cada tubo 10 segundos en el vórtex y se centrifugaban 30 segundos a 13.000 rpm y 4°C. El sobrenadante (que contiene las proteínas citosólicas) se guardaba a -80°C, separando previamente alícuotas para determinar la concentración de proteínas en el extracto, y el precipitado celular remanente se resuspendía en 20-100 µl (dependiendo del tamaño del precipitado) de Solución C (hipertónica) fría, cuya composición se detalla en la [Tabla VII](#).

**Tabla VII. Solución C (hipertónica)**

HEPES pH=7,9	20 mM
Glicerol	25% v/v
NaCl	420 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
EDTA	0,2 mM
DTT*	0,5 mM
PMSF*	0,2 mM
Aprotinina*	2,5 µg/ml
Leupeptina*	2,5 µg/ml
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> *	0,1 mM

\*Adición extemporánea

La lisis nuclear se realizaba durante 20 minutos con los tubos en agitación moderada y constante a 4°C. Tras la lisis, los tubos se centrifugaron 2 minutos a 13.000 rpm, 4°C. El sobrenadante (que contiene las proteínas nucleares) se recogía y guardaba a -80°C, separando previamente alícuotas para valorar la concentración de proteínas en el extracto.

## 5.2 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se empleó el método de Bradford [Bradford, 1976]. Para cada determinación, se preparaba una recta patrón con concentraciones entre 1 y 10 µg/ml de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) Las muestras a valorar se preparaban por duplicado con 2 µl de extracto proteico, agua destilada hasta 800 µl y

200 µl de reactivo de Bradford (Bio-Rad). Tras 5 minutos a temperatura ambiente se cuantificó la absorbancia a 595 nm (Powerwave XS, Biotek)

### 5.3. Inmunoprecipitación de proteínas

Tras los diferentes tratamientos, las células se lavaron 2 veces con PBS frío y se lisaron con tampón RIPA modificado (Tabla V) en el caso de inmunoprecipitaciones para Met o tampón IP (Tabla VIII) en el caso de otras proteínas, siguiendo para el proceso de extracción proteica el esquema que se explica en el apartado 5.1 (extractos de proteínas totales).

**Tabla VIII. Tampón IP.**

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
NP40	1%
EGTA	5 mM
EDTA	5 mM
PMSF*	1 mM
Leupeptina*	5 µg/ml
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> *	0,1 mM
DTT*	0,5 mM
NaF*	0,5 mM
Aprotinina*	1%

\*Adición extemporánea

Del extracto proteico se tomaron 1000 µg de proteína y se diluyeron en tampón de lisis hasta una concentración final de 1 µg/µl, añadiendo anticuerpo primario en una proporción 7 µg de anticuerpo por cada mg de proteína. Esta mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C, en agitación suave. Posteriormente, se incubaron las muestras a 4°C durante 2-4 horas con esferas de agarosa unidas a proteína A (Roche) en el caso de inmunoprecipitaciones para Met o unidas a inmunoglobulina G anti-ratón (*anti-mouse IgG whole molecule-agarose*, Sigma) en el caso de otras proteínas, previamente lavadas 2 veces y resuspendidas en tampón de lisis.

**Tabla IX. Anticuerpos usados para inmunoprecipitación**

ANTICUERPO PRIMARIO	FASE SÓLIDA
<b>p-Tyr</b> Millipore 05-321 (clon 4G10)	IgG (molécula completa) anti-ratón-Agarosa (Sigma)
<b>EGFR</b> Cell signaling 2232	IgG (molécula completa) anti-ratón-Agarosa (Sigma)
<b>Met</b> Santa Cruz SC-162	Proteína A- Agarosa (Roche)

A continuación, se realizaron 3-4 lavados con tampón de lisis y los precipitados se resuspendieron en tampón de carga Laemmli (Tris 80 mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 10%; DTT 10 mM y azul de bromofenol 0,002% p/v), calentando a continuación las muestras a 95°C durante 5-10 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 30 segundos a 13.000 rpm para sedimentar las bolitas y se cargaron (teniendo cuidado

de no cargar las bolitas) en un gel de poliacrilamida para llevar a cabo una separación de proteínas mediante electroforesis. En paralelo se llevaba siempre un control denominado *mock IP* en el que el extracto proteico es sustituido por tampón de lisis. También se llevaba siempre un control negativo con 1 mg. de proteína, pero sin anticuerpo primario.

#### **5.4. Electroforesis de proteínas**

La separación de proteínas por peso molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las muestras proteicas se preparaban en tampón de carga Laemli (ver apartado 5.3.) y se desnaturizaban por calentamiento, a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, se sometían a electroforesis en geles de poliacrilamida según el método descrito por Sambrook y colaboradores (1989) en presencia de un tampón de electroforesis (Tris 25 mM; SDS 0,1%; glicina 0,2 M; a pH 8.3) a un voltaje constante.

#### **5.5. Transferencia de proteínas**

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas cargadas negativamente (debido a la presencia de SDS en el tampón de carga y en el tampón de electroforesis) se transferían a una membrana de PVDF mediante el paso de corriente eléctrica, utilizando uno de los dos métodos siguientes:

- Para la transferencia de proteínas de masa molecular de hasta 90 KDa, se utilizó un equipo de transferencia semi-seco, usando como tampón de transferencia Tris-HCl 48 mM; SDS 0,04%; glicina 39 mM; metanol 20%, a pH 8,3; a 10-15V.
- Para la transferencia de proteínas de masa molecular superior a 90 KDa, se utilizó un equipo de transferencia en húmedo, usando como tampón de transferencia Tris-glicina, cuya composición es: Tris-HCl 66 mM, glicina 386 mM, SDS 0,1%; a 100V.

En ambos casos, el tiempo de transferencia dependía de distintos factores relativos al gel, como su grosor, su tamaño y el porcentaje de poliacrilamida.

En todos los casos se cargaba un pocillo con un marcador de pesos moleculares (SeeBlue Plus2, Invitrogen), para ayudar a la posterior identificación de la proteína de interés.

#### **5.6. Inmunodetección de las proteínas mediante Western blot**

Las membranas con las proteínas transferidas se incubaron en una solución de bloqueo, TTBS (Tris/HCl 10 mM; NaCl 150 mM; Tween-20 0,05%; a pH 7,5) suplementado con 5% de leche desnatada en polvo. Posteriormente, se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario diluido en TTBS suplementado con leche desnatada en polvo o BSA, según las especificaciones del anticuerpo primario a utilizar. Transcurrida esta incubación, las membranas se lavaron en TTBS con el fin de eliminar el anticuerpo no unido a proteína y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado acoplado a la enzima peroxidasa disuelta en TTBS-0,5% leche desnatada en polvo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana era de nuevo lavada en TTBS y la inmunodetección se hacía desarrollando una reacción de quimioluminiscencia con un kit comercializado por Amersham (ECL).

Las membranas podían ser borradas con objeto de ser rehibridadas con otros anticuerpos. Para ello se incubaban durante 15 minutos a temperatura ambiente en solución de borrado (Restore Plus, Thermo Scientific) y se lavaban abundantemente en TTBS.

En la [Tabla X](#) se detallan los anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de proteínas mediante Western Blot.

**Tabla X.** Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot

ANTICUERPO PRIMARIO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	ANTICUERPO SECUNDARIO
<b>β-actina</b>	Sigma A5441 (clon AC-15)	1: 5000	Ratón
<b>p-AKT</b>	Cell signaling 9271 (Ser 473)	1: 500	Conejo
<b>AKT</b>	Cell signaling 9272	1: 500	Conejo
<b>Bcl-x</b>	BD Biosciences 610211	1:1000	Conejo
<b>Bim</b>	BD Biosciences 559685	1:1000	Conejo
<b>Bmf</b>	Alexis biochemicals ALX-804-342. (clon 12E10)	1:500	Rata
<b>Catalasa</b>	Sigma C0979 (clon CAT-505)	1:2000	Ratón
<b>Citocromo c</b>	BD pharmingen 556433 (clon 7H8.2C12)	1:500	Ratón
<b>p-EGFR</b>	Cell signaling 2236 (Tyr 1068)(1H12)	1:500	Ratón
<b>EGFR</b>	Cell signaling 2232	1:1000	Conejo
<b>p-ERK1/2</b>	Cell signaling 9101 (Thr 202/Tyr 204)	1:1000	Conejo
<b>ERK1/2</b>	Cell signaling 9102	1:1000	Conejo
<b>GAPDH</b>	Cell signalling 2118 (14C10)	1:1000	Conejo
<b>γ-GCS</b>	Abcam 40929	1:500	Conejo
<b>p-JNKs</b>	Santa Cruz SC-6254 (clon G7)	1:100	Ratón
<b>JNKs</b>	Cell Signaling 9252	1:1000	Conejo
<b>Met</b>	Santa Cruz SC-162	1:500	Conejo
<b>p-p38</b>	Cell Signaling 9211 (Thr180/Tyr1829)	1:1000	Conejo
<b>p38</b>	Santa cruz SC-535	1:100	Conejo
<b>p-Smad2</b>	Cell signaling 3101 (Ser 465/467)	1: 1000	Conejo
<b>SOD2</b>	Millipore (06-984)	1:1000	Conejo
<b>p-STAT3</b>	Cell signalling 9134	1:1000	Conejo
<b>STAT3</b>	Cell signaling 9132	1:1000	Conejo
<b>p-Tyr</b>	Millipore 05-321 (clon 4G10)	1:2000	Ratón

## **6. Análisis de la expresión de proteínas mediante citometría de flujo.**

Las células se despegaron de las placas de cultivo mediante tripsinización y se centrifugaron a 1.300 rpm durante 5 minutos a 4°C. A continuación se fijaron resuspendiendo en PBS-4% paraformaldehído (PFA) por espacio de 5 minutos a temperatura ambiente, procurando que la densidad celular fuera aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml. De esta suspensión celular se tomaron 100  $\mu$ l ( $0,5 \times 10^6$  células), que se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 500  $\mu$ l de metanol frío al 90% durante 2 minutos. A continuación se realizaron 2 lavados con 1 ml de PBS y se incubaron las células con el anticuerpo primario (anti-*nestina* Millipore MAB353, clon rat-401) diluido 1:50 en PBS suplementado con 0,1% BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo primario se lavó con 1 ml de PBS-0,1% BSA y se incubaron las células con anticuerpo secundario (Alexa fluor 488 goat anti-mouse, Molecular probes) diluido 1:500 en PBS-0,1% BSA, durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Finalmente, tras dos lavados con 1 ml de PBS-0,1% BSA, se resuspendió el precipitado celular en 300  $\mu$ l de PBS-0,1% BSA y 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.

## **7. Detección de proteínas mediante microscopía confocal.**

### **7.1. Inmunocitoquímica.**

Para realizar el análisis de la expresión de proteínas mediante microscopía confocal, las células se cultivaron en cubreobjetos de vidrio en medio DMEM completo. Tras los tratamientos las células se lavaron en PBS y se procedió a su fijación y tinción. Las condiciones de fijación y tinción fueron optimizadas para cada anticuerpo primario y se detallan a continuación:

#### **Detección de A6, vimentina y N-cadherina**

Las células se fijaron en PBS- 4% PFA durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces (5 minutos cada lavado) con PBS.

A continuación se procedió al bloqueo con una solución de PBS- 5%BSA-0,3% Triton X-100 durante una hora a temperatura ambiente. Las células se incubaron con el anticuerpo primario diluido 1:100 (A6 y N-cadherina) o 1:200 (Vimentina) en PBS-0,1% BSA, durante toda la noche a 4°C.

Transcurrida la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados con PBS-0,05% Tween20 y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario que se indica en la tabla XI, diluido 1.500 en PBS-0,1% BSA, durante una hora a temperatura ambiente.

Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS-0,05% Tween 20, se cubrieron con una solución de DAPI durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y se lavaron 3 veces en agua destilada. Finalmente se dejaron secar al aire en oscuridad y se procedió a su montaje sobre portaobjetos con medio de montaje comercial (Vectashield, Vector Laboratories).

#### **Detección de actina mediante Faloidina**

Las células se fijaron con PBS-3% PFA durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con PBS-0,1% Triton X100 durante 5 minutos, realizando posteriormente 3 lavados con PBS.

A continuación se procedió al bloqueo en PBS-0,1% BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El anticuerpo primario utilizado en este caso (Alexa fluor-594 phalloidin, Molecular Probes A12381) estaba acoplado directamente al fluorocromo, con lo que no se necesitaba anticuerpo secundario, y se diluyó 1:40 en solución de DAPI, con lo que se teñían simultáneamente los núcleos. La incubación con esta mezcla se realizó durante 20 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad.

Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS, un lavado final con agua destilada y se procedió al secado y montaje de los cubreobjetos.

### **Detección de citoqueratina 18 y 19 usando los anticuerpos TROMA I y TROMA III**

Las células se fijaron en etanol al 95% conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se dejaron secar al aire. A continuación se lavaron 2 veces en TBS y se procedió al bloqueo con TBS-0,3% Triton X100-5% suero de cabra.

El anticuerpo primario se diluyó en solución de bloqueo y se incubaron las muestras en esta solución durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se realizaron 3 lavados con TBS y se incubaron con el anticuerpo secundario en PBS-0,1% BSA durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

El anticuerpo secundario se lavó 3 veces con TBS. Finalmente se cubrieron las muestras con una solución de DAPI durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavaron 3 veces en agua destilada y, tras dejarlas secar al aire, se procedió a su montaje.

Las células se visualizaron en el microscopio confocal Zeiss BioRad MRC 1024 LSM., del LEC (Laboratory of Experimental Carcinogenesis)-NIH (National Institutes of Health), EE.UU.

## **7.2. Inmunohistoquímica**

Los hígados se fijaron *in vivo* perfundiéndolos con 40 ml de PBS-4% PFA. Tras la perfusión, los órganos se lavaron con PBS, se cortaron en láminas y se introdujeron en PBS-4%PFA, durante 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ , en agitación. Transcurrido este tiempo, se reemplazó la solución de PFA por una solución de sacarosa al 30% en agua, dejando los órganos en esta solución toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ , con agitación suave. Al día siguiente, y tras secar el exceso de humedad sobre papel de filtro, las láminas de hígado se congelaron inmersas en medio de congelación OTC, sobre hielo seco y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para completar el proceso de congelación. Con las muestras congeladas se realizaron secciones en un criomicrotomo, que se depositaron en portaobjetos cubiertos con silano y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos, protegiéndolas de la luz. Las secciones se lavaron 2 veces con PBS para eliminar el medio de congelación e hidratar la muestra. Posteriormente, se incubaron primero en la solución de bloqueo (PBS al 5% BSA y 0,3% Tritón X-100) durante una hora a temperatura ambiente, y a continuación con los anticuerpos primarios A6 y anti-GFP diluidos 1:100 en PBS-0,1%BSA toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras realizar 3 lavados de 5 minutos con una solución de PBS-0.05% Tween 20, se cubrieron las secciones con los anticuerpos secundarios diluidos 1:500 en PBS-0,1% BSA durante 1-2 horas a temperatura ambiente, en oscuridad. Se lavaron las secciones 4 veces con PBS-0.05% Tween 20 y posteriormente se cubrieron con una solución de DAPI en PBS-0,5% Triton X-100, durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se realizaron 3 lavados de 3 minutos con agua destilada y se deshidrataron las muestras sumergiéndolas en soluciones de etanol con concentración creciente (50%, 70%, 95% y 100%) y por último se sumergieron 3 veces en el reactivo clarificador Histo-clear (National Diagnostics). Tras dejar secar las muestras al aire, se montaron y se guardaron a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Los cortes histológicos se visualizaron en el microscopio confocal Zeiss BioRad MRC 1024 LSM. del LEC (Laboratory of Experimental Carcinogenesis)-NIH (National Institutes of Health), EE.UU.

**Tabla XI.** Anticuerpos utilizados para inmunocitoquímica e inmunohistoquímica

	<b>ANTICUERPO PRIMARIO</b>	<b>ANTICUERPO SECUNDARIO</b>
<b>A6</b>	No comercial Cortesía de la Dra. Factor 1:100	Alexa Fluor 594 goat anti-rat (Molecular Probes) 1:500
<b>F-actina</b>	Alexa Fluor 594 - phalloidin (Molecular Probes A12381) 1:40	
<b>N-cadherina</b>	Abcam ab18203 1:100	Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit (Molecular Probes) 1:500
<b>Citoqueratina 18</b>	TROMA I Hybridoma Bank 1:10	Alexa Fluor 488 goat anti-rat (Molecular Probes) 1:500
<b>Citoqueratina 19</b>	TROMA III Hybridoma Bank 1:500	Alexa Fluor 488 goat anti-rat (Molecular Probes) 1:500
<b>GFP</b>	Chemicon AB3080 1:100	Alexa 488 goat anti-rabbit (Molecular Probes) 1:500
<b>Vimentina</b>	Abcam ab45939 1:200	Alexa fluor 488 goat anti-mouse (Molecular Probes) 1:500

## 8. Ensayos de actividad transcripcional

Las células se transfectaron con dos tipos de construcciones del kit comercial Cignal SMAD reporter assay kit, SABiosciences. Una de ellas es una construcción de luciferasa de expresión inducible por Smads que lleva el gen reportero bajo el control de un promotor mínimo de CMV (citomegalovirus) y repeticiones en tandem de SBE (Smad Binding Element). La otra construcción que utiliza como gen reportero renilla es de expresión constitutiva y actúa como un control interno para normalizar las eficiencias de transfección y monitorizar la viabilidad celular. Ambas construcciones están pre-mezcladas en una proporción luciferasa:renilla (40:1),

Para este análisis se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una confluencia de aproximadamente el 80%, idónea para una transfección eficiente. La transfección se llevó a cabo en DMEM 10% FBS en ausencia de otros aditivos. El DNA a transfectar se diluyó en DMEM sin suplementar a una concentración de 0,02 µg/µl y se le añadió el reactivo de transfección FuGENE HD (Roche) atemperado a 25°C, en una proporción 3 µl FuGENE:1 µg DNA. Tras una breve agitación, la mezcla se incubó 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de transfección FuGENE-DNA y se añadieron 5 µl (0,1 µg de DNA) de la mezcla a cada pocillo. Tras 16 horas se eliminó el medio, sustituyéndolo por medio sin suero y 12-16 horas más tarde, las células se trataron con TGF-β durante 8 horas adicionales. Para medir la actividad luciferasa en los extractos de células previamente transfectadas y estimuladas con TGF-β, se empleó el sistema "Dual-Luciferase Reporter Assay

System“ (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con este sistema se mide en cada muestra la luminiscencia proporcionada por cada una de las proteínas (luciferasa y renilla) de manera secuencial. Para la lectura de la luminiscencia se empleó un luminómetro Fluostar Omega. Para cada condición, los datos de luminiscencia de la luciferasa se corrigieron con los datos de luminiscencia de la renilla y se expresaron como ratio respecto a un control sin tratar.

## 9. Análisis de proliferación celular mediante incorporación de timidina tritiada

La síntesis de ADN fue determinada mediante la incorporación de (<sup>3</sup>H)-Timidina en las últimas 40 horas de cultivo siguiendo el método descrito por Dicker y Rozengurt en 1980, modificado por de Juan y colaboradores (1992b). Una vez tratadas las células y tras esperar entre 6 y 8 horas para que se estabilizaran, se añadió a los platos de cultivo una mezcla de timidina radiactiva (0,5 µCi/ml 3H-timidina, GE Healthcare) y timidina fría 1 µM (Sigma), diluidas en DMEM sin suplementar. Finalizado el período de incubación (48 horas para los factores de crecimiento y unas 40 horas para la mezcla de timidinas), se retiró el medio radiactivo y se lavaron las placas con PBS frío. A continuación, se cubrieron las células con una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) durante 20 minutos a 4°C, para precipitar proteínas y ácidos nucleicos. Seguidamente se retiró el TCA y se lavaron las placas dos veces con etanol al 70% (v/v), dejándolas secar completamente. Por último, el material precipitado se recogió mediante incubación con 100 µl por pocillo de una solución de composición 0,1N NaOH, 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y SDS 0,5% a 37°C durante 20 minutos en agitación. Estos 100 µl se recogían y se diluían en 2 ml de líquido de centelleo (Perkin Elmer). Los resultados se expresan como cuentas por minuto (cpm) por pocillo.

## 10. Análisis de la muerte por apoptosis

### 10. 1. Cuantificación de la actividad caspasa-3

Tras los diferentes tratamientos, las células eran lisadas en un tampón de lisis cuya composición se detalla en la [Tabla XII](#), a 4°C durante 10 minutos.

**Tabla XII.**Tampón de lisis caspasas

Tris HCl, pH= 8	5 mM
EDTA	20 mM
Triton X-100	0,5%

Posteriormente, y tras valorar la concentración en proteína de los lisados mediante el método de Bradford (apartado 5.2) 20 µg de proteína se incubaban en presencia del sustrato sintético de caspasa-3 Ac-DEVD-AMC (BD Pharmingen) a una concentración 20 µM, en un tampón de reacción cuya composición se especifica en la [Tabla XIII](#) durante 2 horas a 37°C en oscuridad. La proteólisis del sustrato sintético por la caspasa 3 activa presente en los lisados libera el compuesto fluorogénico AMC, cuya fluorescencia se midió en un fluorímetro (Perkin Elmer LS-50), utilizando una  $\lambda$  de excitación= 380 nm y  $\lambda$  emisión= 440 nm.

**Tabla XIII.** Tampón ensayo caspasas

HEPES pH=7,5	20 mM
Glicerol	10%
DTT*	2 mM

\*Adición extemporánea

Una unidad de actividad caspasa-3 se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de 1 unidad arbitraria de fluorescencia en dos horas. Los resultados se expresan como unidades de actividad caspasa 3 por microgramo de proteína.

### **10.2. Contaje de núcleos apoptóticos tras tinción con yoduro de propidio**

Tras los diferentes tratamientos, las células se lavaron con PBS frío y se fijaron con una mezcla de metanol:acético en proporción 3:1 a -20°C, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con una solución de yoduro de propidio (IP), 5 µg/ml, 0,1% de tritón X-100, EDTA 0,1 M y 25 U/ml de RNAsa (Sigma), en PBS, durante 30 minutos a 37°C. 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 como medio de montaje. Los núcleos apoptóticos se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Eclipse TE300 (Nikon). De cada condición se contaron al menos 1000 núcleos y durante el contaje se desconocía la condición que se estaba analizando (contaje ciego).

### **10.3. Determinación del porcentaje de células apoptóticas mediante citometría de flujo.**

Para estos experimentos se utilizó un kit comercial Anexina V-FITC/yoduro de propidio (BD Pharmingen). Las células se despegaron de la placa de cultivo mediante tripsinización y se centrifugaron a 1.300 rpm, 4 °C, 5 minutos. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS frío y se resuspendieron en tampón de unión 1x (0.01 M Hepes/NaOH pH 7,4, 0,14 M NaCl, 2,5 mM CaCl), ajustando la densidad celular a  $5 \times 10^5$  células/ml. De esta suspensión celular se tomaron  $10^5$  células (195 µl) que se incubaron con 5 µl de solución AnexinaV-FITC del kit durante 10 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Como consecuencia del proceso de apoptosis, la fosfatidilserina se trasloca desde el lado citoplasmático de la membrana hacia el lado extracelular y puede ser unida por la AnexinaV conjugada con el fluorocromo FITC (que emite a 515-530 nm)

Tras esta incubación, las células se centrifugaron y se llevaron a un volumen final de 300 µl con tampón de unión 1x. Finalmente, se añadía yoduro de propidio (IP) a una concentración final de 1 µg/ml, con el fin de poder distinguir las células vivas de las muertas (permeables al yoduro de propidio o IP positivas) y descartar estas últimas para el análisis.

De cada condición se analizaron 10.000 células mediante citometría de flujo en un citómetro FACScan (Beckton Dickinson) del Servicio de Citometría de la Universidad Complutense de Madrid. Los resultados se expresan como porcentaje de células apoptóticas (positivas para anexina y negativas para IP) frente al total de células vivas (negativas para IP).

## 11. Cuantificación de la producción de radicales libres de oxígeno.

Para la determinación de los radicales libres de oxígeno (ROS) se utilizó DCFH<sub>2</sub>-DA (2'-7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína, Molecular Probes). Este compuesto se incorpora en las células, donde se convierte en 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>) por la acción de esterasas intracelulares. A su vez, el DCFH<sub>2</sub> al ser oxidado por el peróxido de hidrógeno se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), siendo este último compuesto fluorescente.

Las células se despegaron de la placa de cultivo mediante tripsinización, se centrifugaron a 1.300 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS atemperado a 37°C a una concentración de 1x10<sup>6</sup> células/ml. De esta suspensión se tomaron 500 µl (5x10<sup>5</sup> células), que se incubaron a 37°C durante 30 minutos con 5 µM DCFH<sub>2</sub>-DA. Finalizado el tiempo de incubación con la sonda, se añadió IP a una concentración final de 1 µg/ml y se analizaron 10.000 células por condición mediante citometría de flujo en un citómetro FACScan (Beckton Dickinson) del Servicio de Citometría de la Universidad Complutense de Madrid. Como se ha mencionado anteriormente (apartado 9.3.), el IP se añadió para posibilitar la exclusión de las células muertas de la población celular a analizar.

## 12. Determinación del potencial de membrana mitocondrial.

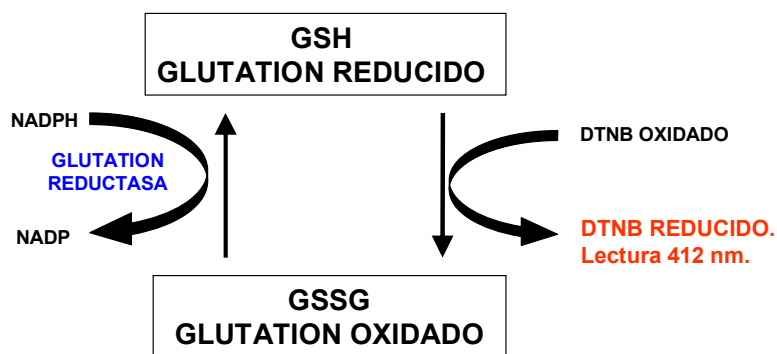
Para la determinación de potencial de membrana de la mitocondria se usó un compuesto denominado JC1 (yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro 1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), que es una sonda lipofílica cargada positivamente que se acumula en el interior de la mitocondria en función del potencial. A bajas concentraciones, este compuesto está en forma de monómero y emite fluorescencia verde (515-530 nm) mientras que a altas concentraciones, cuando se acumula en la matriz mitocondrial, se forman agregados que emiten fluorescencia roja (585-590 nm). El ratio entre la fluorescencia roja (FL2) y la fluorescencia verde (FL1) refleja los cambios en el potencial de membrana mitocondrial.

Las células se despegaron de la placa de cultivo mediante tripsinización y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos, tras lo cual se resuspendieron en 500 ul de DMEM (Gibco) sin suero, en presencia de JC1 (2 µM) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. A continuación las muestras se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos, se retiró el medio y se añadieron 500 ul de medio sin suero. De cada condición se analizaron 10.000 células mediante citometría de flujo en un citómetro FACScan (Beckton Dickinson) del Servicio de Citometría de la Universidad Complutense de Madrid, utilizando como control positivo células tratadas con un desacoplante mitocondrial, FCCP 2 µM.

## 13. Determinación del contenido intracelular de glutatión

El contenido total de glutatión intracelular (GSH y GSSG) se midió siguiendo el método de Griffith (1980) modificado, basado en una reacción continua de oxidoreducción del glutatión intracelular en presencia del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), NADPH y glutatión reductasa, monitorizando el cambio de absorbancia a 412 nm ([Esquema 1](#)).

Esquema 1.



Tras los tratamientos, se recogían las células por raspado y se lisaban con tritón X-100 al 0,2%. Tras tomar una alícuota para valorar la cantidad de proteína, se añadía a las muestras ácido sulfosalicílico al 50% (p/v) (concentración final 2,5%). Finalmente, se centrifugaba durante 10 minutos a 12000 rpm y se guardaba el sobrenadante donde se encuentra el glutatión.

Para realizar el ensayo enzimático, se preparaban dos cubetas con tampón fosfato 0,05 M; EDTA 1 mM a pH 7,5, a las que se añadía por separado DTNB 0,1 mM y NADPH 0,15 mM. A continuación, se añadía en una de las cubetas 20-50  $\mu$ l de muestra, y tras ajustar el cero con la otra cubeta, se iniciaba la reacción añadiendo 0,6 unidades de enzima glutatión reductasa y se monitorizaba la absorbancia a 412 nm durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo, en la misma cubeta problema, se añadía una cantidad conocida de glutatión reducido (0,5 nmoles), que actuaba como patrón interno, y se realizaba de nuevo la medida durante 2 minutos. Así, conocido el incremento de absorbancia que se producía debido al patrón interno, y el incremento que se producía debido sólo a la muestra, se podía calcular la cantidad de glutatión existente en la muestra. Finalmente, se corregían los resultados por la cantidad de proteína de los extractos iniciales, y se expresaban como porcentaje con respecto al control.

## 14. Estudio estadístico

Las representaciones gráficas de los resultados se han elaborado utilizando el valor medio  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M). La significatividad se ha determinado mediante el test "t de Student". En las gráficas se indica la significatividad estadística de la siguiente manera: \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$  y \*:  $p < 0,05$ .

**V.**

---

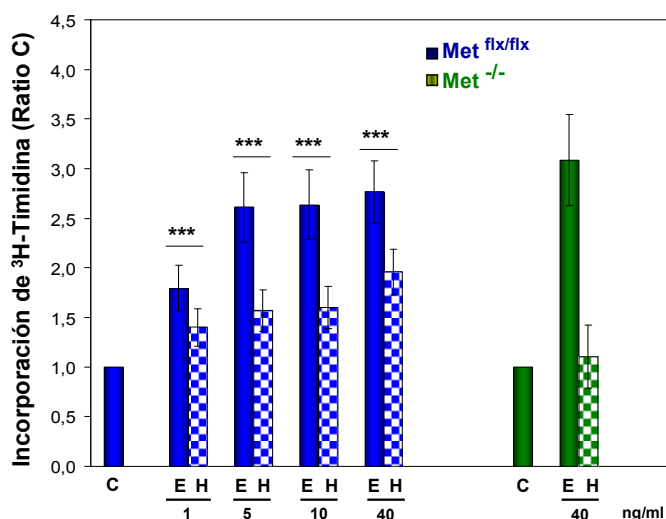
**Resultados**



## 1. Relevancia de la vía de señalización de EGF-EGFR en la biología de las células ovas

### 1.1. El EGF como mitógeno para las células ovas.

Resultados previos de nuestro grupo habían puesto de manifiesto que el HGF actúa como mitógeno en células ovas, y que la señalización autocrina de HGF/Met en estas células es crítica para la protección frente a la apoptosis inducida por falta de suero y por TGF- $\beta$  [del Castillo et al., 2008a]. Para profundizar en el conocimiento de las señales que regulan la proliferación y supervivencia de células ovas, a continuación decidimos centrar nuestra atención en otro factor de crecimiento, el EGF, ya que los ligandos del EGFR son conocidos inductores de proliferación y supervivencia en hepatocitos [Michalopoulos, 2007; revisado por Sánchez y Fabregat, 2010] y, además, experimentos *in vivo* sugieren funciones similares para los ligandos del EGFR en las células progenitoras hepáticas [Everts et al., 1993, Nagy et al., 1996].

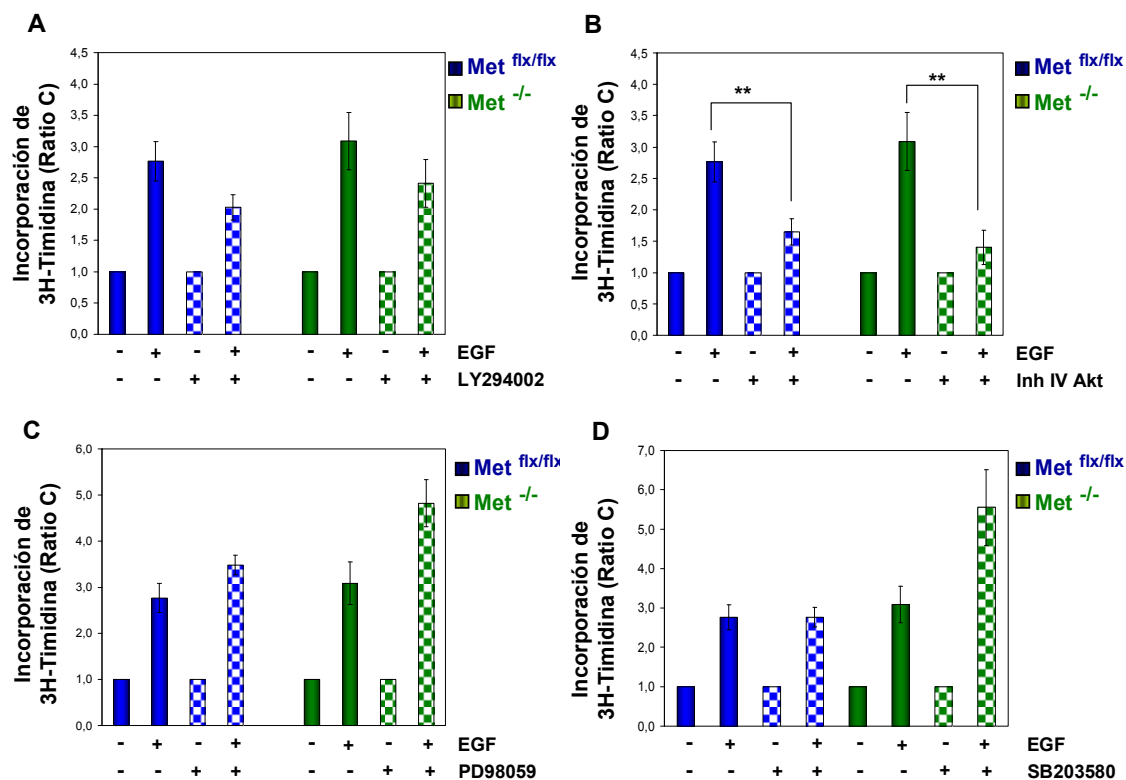


**Figura 1.** Efecto del EGF y el HGF sobre la proliferación de células ovas. Las células ovas se privaron de suero durante 2 horas y posteriormente se trataron durante 48 horas con EGF o HGF a las concentraciones indicadas. La síntesis de DNA se determinó mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, realizados por duplicado. \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01.

En primer lugar, quisimos investigar los efectos mitogénicos del EGF exógeno sobre las células ovas. La proliferación se midió mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina al DNA durante la fase S del ciclo celular, en células Met<sup>fix/fix</sup> tratadas durante 48h con concentraciones crecientes de EGF, entre 1 y 40 ng/ml. En la Fig. 1 se observa que el tratamiento con EGF induce proliferación en células ovas. El efecto del EGF sobre la síntesis de DNA es dependiente de la dosis, alcanzándose valores de aproximadamente 3 veces sobre el control a concentraciones de EGF de 40 ng/ml. Aunque se observan pequeñas diferencias entre células Met<sup>fix/fix</sup> y Met<sup>-/-</sup> en la proliferación inducida por EGF, estas no son estadísticamente significativas. Ambas líneas celulares proliferan en la misma medida en respuesta al EGF. A efectos comparativos se determinó también, con el mismo esquema experimental que para el EGF, la proliferación de células ovas en respuesta a distintas concentraciones de HGF (Fig. 1). En el caso del HGF, incluso a la mayor concentración ensayada, la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina no supera las 2 veces sobre el control sin tratar.

Por tanto, nuestros resultados muestran que tanto el EGF como el HGF son importantes mitógenos para las células ovas, al igual que para otras células hepáticas. Sin embargo, ambos factores de crecimiento no son equivalentes en cuanto a sus efectos proliferativos en células ovas, siendo el EGF un mitógeno significativamente más potente que el HGF.

Con el fin de identificar las vías de señalización que median los efectos mitogénicos del EGF, se realizaron ensayos de incorporación de timidina tritiada en células  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  estimuladas durante 48 horas con EGF, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores químicos específicos para PI3K (LY294002), Akt (Inhibidor IV), ERK1/2 (PD98059) y p38 (SB203580). Los resultados (Fig. 2) indican que tanto en células ovas  $Met^{flx/flx}$  como  $Met^{-/-}$ , la tasa de proliferación en respuesta al EGF se ve disminuida en presencia del inhibidor de PI3K y en presencia del inhibidor de Akt, en este caso de manera estadísticamente significativa. En cambio, la inhibición de ERK1/2 y p38 no produjo disminución de la incorporación de timidina tritiada respecto a los valores alcanzados en ausencia de inhibidor. Estos resultados indican la relevancia de la vía PI3K-Akt en la proliferación inducida por EGF en células ovas.

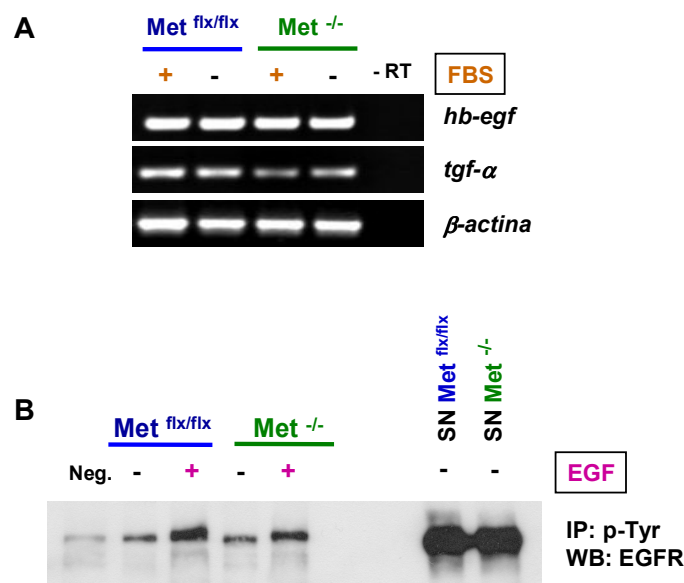


**Figura 2.** Efecto de la inhibición de PI3K, Akt, ERK1/2 y p38 en la proliferación inducida por EGF en células ovas. La síntesis de DNA se determinó mediante la incorporación de  $^3H$ -timidina. Las células ovas se pre-trataron durante 30 minutos con el inhibidor de PI3K LY294002 7,5  $\mu M$  (A), Inhibidor de Akt IV 2,5  $\mu M$  (B), inhibidor de ERK1/2 MAPKs PD98059 20  $\mu M$  (C), inhibidor de p38 SB203580 10  $\mu M$  (D) y posteriormente se trataron con EGF 40 ng/ml durante 48 horas. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, realizados por duplicado. \*\*  $P < 0,01$

## 1.2. Existencia de una regulación autocrina del EGFR y su importancia para la proliferación y supervivencia de células ovas.

Dado que resultados previos de nuestro grupo habían demostrado la existencia de una señalización autocrina de HGF y su importancia para la supervivencia de células ovas [del Castillo et al., 2008a], quisimos comprobar si también existía una

activación autocrina del EGFR y si ésta podría contribuir de alguna manera a la proliferación basal de estas células y a la protección frente a estímulos pro-apoptóticos. Para resolver estas cuestiones, se investigó en primer lugar la expresión de ligandos del EGFR en células ovas mediante RT-PCR semicuantitativa. Para ello, las células se cultivaron en medio suplementado con 10% de suero (medio completo) y en medio libre de suero durante 24 horas. Como se observa en la Fig. 3A, se detectaron transcritos de HB-EGF y TGF- $\alpha$  tanto en células Met<sup>flx/flx</sup> como en células Met<sup>-/-</sup>, en ausencia y en presencia de suero, demostrando una expresión constitutiva de estos ligandos del EGFR en células ovas murinas. Los resultados mostrados en la Fig. 1 y resultados previos de nuestro grupo [del Castillo et al., 2008a], prueban que las células ovas expresan EGFR, dado que responden al EGF exógeno aumentando su proliferación. Por tanto, basándonos en las evidencias de una expresión simultánea de ligandos del EGFR y de su receptor, EGFR, hipotetizamos que en las células ovas podría existir una señalización autocrina a través del EGFR. Para probar dicha hipótesis, analizamos la fosforilación del EGFR en células ovas Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup>, tanto en condiciones basales (ausencia de suero y de estímulos exógenos), como en respuesta a la estimulación con EGF (Fig. 3B). Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-fosfotirosina. Tras realizar un western blot con anticuerpo anti-EGFR, se detectó en las células ovas tratadas con EGF (20 ng/ml) una banda de una proteína de 170 kDa, correspondiente al EGFR fosforilado en tirosina. Aunque menos intensa, también se detectó una banda de 170 KDa en células que habían sido cultivadas en ausencia de suero y de EGF, mostrando así una fosforilación endógena del EGFR en ambas líneas celulares. Estos resultados constituyen una sólida evidencia de la existencia de una señalización autocrina del EGFR en células ovas murinas.

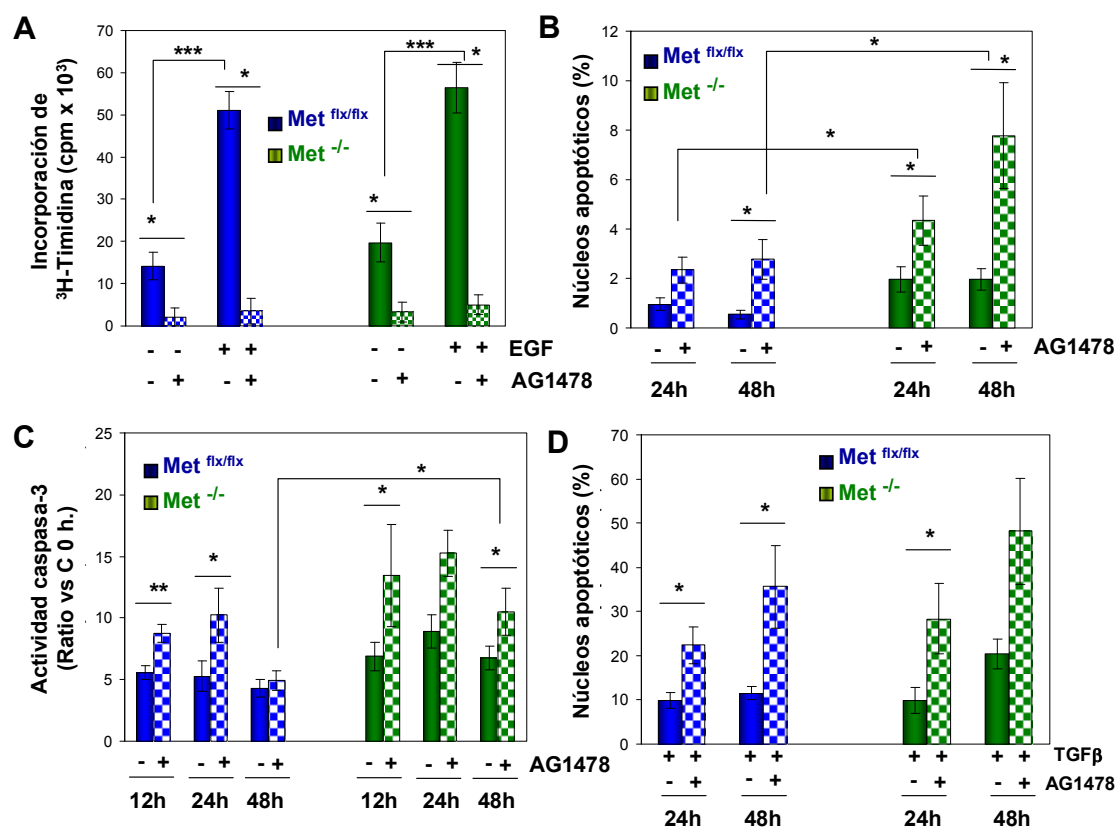


**Figura 3.** Expresión constitutiva de ligandos del EGFR y activación constitutiva de este receptor en células ovas Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup>. **(A)** La expresión del mRNA de los ligandos del EGFR se analizó mediante RT-PCR en células ovas cultivadas durante 24 h en ausencia o presencia de 10% FBS. Como gen normalizador se utilizó  $\beta$ -actina. RT-: no retrotranscripción. Se muestra un experimento representativo de dos realizados. **(B)** Las células ovas fueron deprivadas de suero durante 12 h y luego tratadas con EGF (20 ng/ml) durante 5 minutos. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-fosfotirosina y las membranas se incubaron con anticuerpo anti-EGFR. Neg: control negativo (sin anticuerpo primario). SN: Control positivo, sobrenadantes recogidos tras la inmunoprecipitación de los lisados. Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

Para evaluar la relevancia funcional de la señalización autocrina mediada por EGFR en células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  examinamos a continuación el efecto de la inhibición de la actividad del EGFR mediante el inhibidor específico AG1478 sobre la proliferación y supervivencia de células cultivadas en medio sin suero y sin estímulos exógenos, y que por tanto no pueden contener más que factores autocrinos secretados por ellas mismas. Como se observa en la Fig. 4A, ensayos de proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada al DNA muestran que la proliferación basal de las células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  se ve fuertemente inhibida por la presencia de AG1478, demostrando que la proliferación basal es dependiente de la actividad tirosina quinasa del EGFR. Como control positivo de la funcionalidad del AG1478 se utilizaron células tratadas con EGF en presencia y ausencia de este inhibidor. En cuanto a la apoptosis, la inhibición del EGFR indujo en ambas líneas celulares un aumento moderado, pero significativo, en el índice apoptótico, medido mediante el conteo al microscopio de fluorescencia de núcleos con morfología apoptótica tras tinción con yoduro de propidio, tal como se detalla en Materiales y Métodos (Fig. 4B). Particularmente destacable fue el mayor índice apoptótico detectado en las células  $Met^{-/-}$  comparado con el de las células  $Met^{flx/flx}$ , en presencia del inhibidor. En paralelo, se determinó la actividad caspasa-3, mediante un ensayo fluorimétrico, en las mismas condiciones experimentales (Fig. 4C). En consonancia con los datos anteriores, el inhibidor del EGFR produjo un incremento de la actividad caspasa en ambas líneas celulares, siendo el aumento significativamente mayor y más persistente en las células  $Met^{-/-}$ . Estos resultados muestran que la señalización autocrina mediada por el EGFR en células ovasales promueve proliferación y supervivencia.

Para estudiar con más profundidad el efecto anti-apoptótico del EGF autocrino analizamos el efecto de la inhibición del EGFR en células tratadas con TGF- $\beta$  (Fig. 4D). Resultados anteriores de nuestro grupo habían demostrado que el TGF- $\beta$  induce apoptosis en células ovasales y que los ligandos del EGFR protegen frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en otras células hepáticas, en concreto hepatocitos fetales de rata y células de hepatoma [Fabregat et al., 1996; Sancho et al., 2009]. El tratamiento con AG1478 aumenta significativamente la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  tanto en células  $Met^{flx/flx}$  como en células  $Met^{-/-}$ , alcanzándose índices apoptóticos de  $35,6 \pm 9,3$  y  $48,2 \pm 12$  % respectivamente, tras 48 horas de tratamiento. De nuevo, los índices apoptóticos son mayores en células  $Met^{-/-}$ , aunque las diferencias entre  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  no son estadísticamente significativas. Por tanto, nuestros datos apoyan una función importante del EGFR en la protección frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en células ovasales, en concordancia con lo que nuestro grupo ha descrito en otras células hepáticas.

En resumen, los datos mostrados hasta ahora revelan la existencia de una señalización autocrina dependiente del EGFR en las células ovasales. Esta señalización autocrina es fundamental para promover la proliferación basal, a la vez que contribuye a proteger a estas células frente a la apoptosis inducida por la falta de suero y por tratamiento con TGF- $\beta$ .



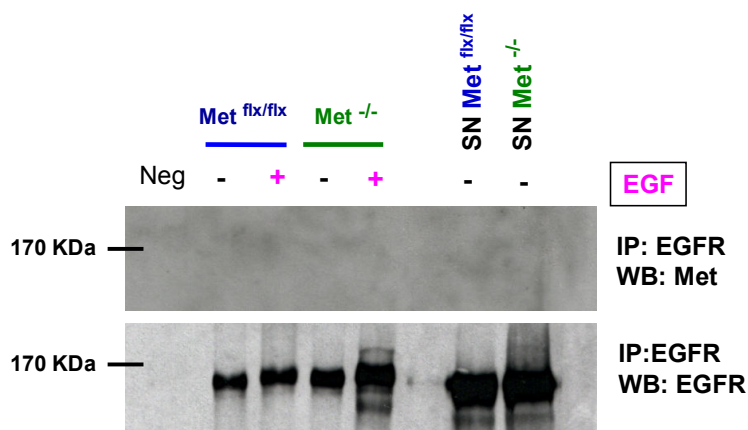
**Figura 4.** Efecto de la inhibición del EGFR con AG1478 en la proliferación y apoptosis de células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$ . (A) Síntesis de DNA determinada mediante incorporación de  $^3H$ -Timidina en células ovasales sin tratar o tratadas durante 48 h con EGF (20 ng/ml) y pretratadas o no con AG1478 (5  $\mu$ M) durante 30 minutos. Se representa la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  (B) Índice apoptótico en células ovasales tratadas con AG1478 (5  $\mu$ M) durante los tiempos indicados. Los núcleos apoptóticos se visualizaron y contaron tras tinción con yoduro de propidio en un microscopio de fluorescencia mediante conteo ciego. Se contaron un mínimo de 1000 núcleos por condición. Se representa la media  $\pm$  SEM de 6 experimentos independientes \* $P < 0,05$ . (C) Cinética de la actividad caspasa-3 en células ovasales tratadas con AG1478 5  $\mu$ M. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 6 experimentos independientes \*  $P < 0,05$  \*\*\*  $P < 0,001$  (D) Índice apoptótico en células ovasales tratadas con TGF- $\beta$  (1 ng/ml) con o sin pretratamiento con AG1478 (5  $\mu$ M). Los núcleos apoptóticos se visualizaron y contaron como en (B). Se representan la media  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes, con condiciones por duplicado. \*  $P < 0,05$ .

### 1.3 Análisis de la posible interacción cruzada entre Met y EGFR en células ovasales

Existen en la literatura evidencias en aumento de la existencia de una interacción cruzada entre los receptores EGFR y Met. Los mecanismos propuestos para esta interacción cruzada son complejos y dependen del tipo celular y del contexto fisiológico y fisiopatológico. Así, esta interacción puede ocurrir de manera directa o indirecta, implica distintos niveles de interacción y puede tener efectos aditivos o antagónicos [Lai et al., 2009]. Aunque la interacción cruzada entre Met y EGFR puede ser bidireccional, está más establecido un papel para el EGFR en la señalización mediada por Met, especialmente en células hepáticas [Tomiya et al., 2000; Scheving et al., 2002; Jo et al., 2000]. En base a estos precedentes, decidimos utilizar nuestro modelo celular carente de actividad tirosina quinasa de Met para investigar si en células progenitoras hepáticas adultas el EGFR y/o sus ligandos pueden desempeñar un papel en la señalización dependiente de Met y viceversa.

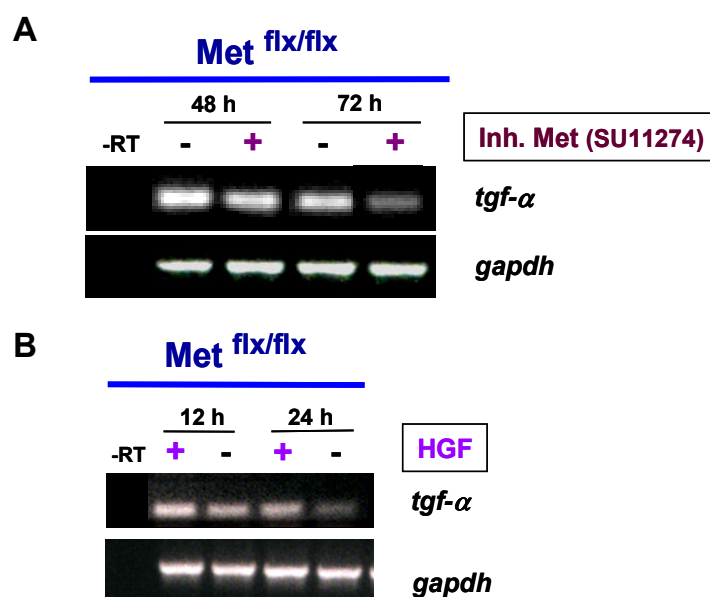
Se sabe que en ciertos sistemas celulares el EGFR transactiva Met [Bergström et al., 2000; Jo et al., 2000; Pai et al., 2003] y el HGF puede activar al EGFR [Spix et

al., 2007]. Sin embargo, como se mencionó en el apartado de “Antecedentes”, resultados previos de nuestro grupo habían mostrado que en células ovas murinas el tratamiento con HGF induce la fosforilación de Met pero no del EGFR. Por otra parte, el EGF induce fosforilación del EGFR pero no de Met. Estos resultados demostraban que no se produce transactivación directa de los receptores por una activación cruzada EGF-Met o HGF-EGFR. Para determinar si existe una interacción física directa entre los dos receptores, estimulamos células ovas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  con EGF 20 ng/ml durante 10 minutos. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-EGFR, hibridando posteriormente la membrana con anticuerpo anti-Met. No se detectó ninguna banda (Fig.5), aunque la inmunoprecipitación funcionó correctamente, como lo demuestra el patrón de bandas detectadas al hibridar la membrana con anticuerpo anti-EGFR. Estos resultados, junto con la falta de activación cruzada EGF-Met y HGF-EGFR que se ha mencionado previamente (ver “Antecedentes”), parecen indicar que no existe una transactivación directa entre receptores.



**Figura 5. Análisis de la interacción entre los receptores EGFR y Met.** Las células ovas fueron deprivadas de suero durante 12 h y luego tratadas con EGF 20 ng/ml durante 10 minutos. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-EGFR y las membranas se incubaron con anticuerpo anti-Met y anti-EGFR. Neg: control negativo (sin anticuerpo primario). SN: Control positivo, sobrenadantes recogidos tras la inmunoprecipitación de los lisados. Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

A continuación, analizamos si la expresión de ligandos del EGFR depende de la actividad tirosina quinasa de Met, ya que se ha descrito que este es uno de los mecanismos de transactivación indirecta de los receptores [Reznik et al., 2008]. Los resultados mostrados en la Fig. 3A parecen revelar una menor expresión del transcrito de TGF- $\alpha$  en células  $Met^{-/-}$ , tanto en ausencia como en presencia de suero, en comparación a las células  $Met^{flx/flx}$ , lo que sugiere un papel del receptor Met en la regulación de la expresión de TGF- $\alpha$ . No obstante, utilizamos dos abordajes experimentales adicionales para intentar corroborar este dato. Así, la inhibición de la actividad tirosina quinasa de Met en células  $Met^{flx/flx}$  mediante el uso del inhibidor químico específico SU11274 también resultó en una disminución de la expresión de TGF- $\alpha$  (Fig. 6A). Además, el tratamiento de células ovas  $Met^{flx/flx}$  con HGF exógeno incrementa los niveles del transcrito de TGF- $\alpha$  (Fig. 6B). Estos tres resultados sugieren fuertemente que el eje HGF-Met regula la expresión de TGF- $\alpha$ .

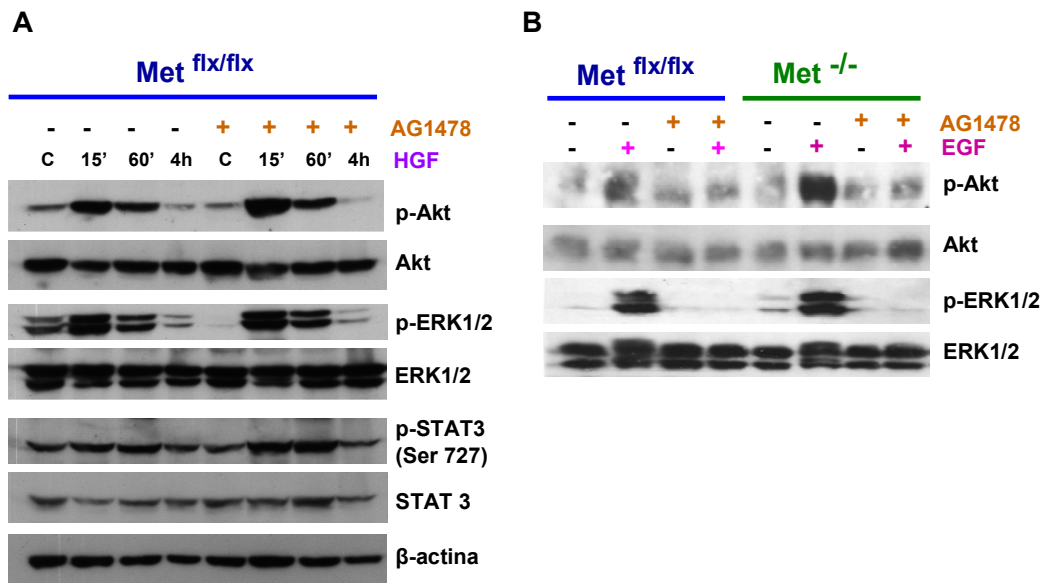


**Figura 6. Regulación de la expresión de TGF- $\alpha$  por el eje HGF/Met.** (A) La expresión del mRNA de TGF- $\alpha$  se analizó mediante RT-PCR en células ovasales Met<sup>flx/flx</sup> deprivadas de suero y tratadas durante 48 o 72 horas con el inhibidor de Met SU11274 (2,5  $\mu$ M). (B) La expresión del mRNA de TGF- $\alpha$  se analizó mediante RT-PCR en células ovasales Met<sup>flx/flx</sup> deprivadas de suero y tratadas durante 12 o 24 horas con HGF 20 ng/ml. En (A) y (B) como gen normalizador, se utilizó *Gapdh*. RT-: no retrotranscripción. Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

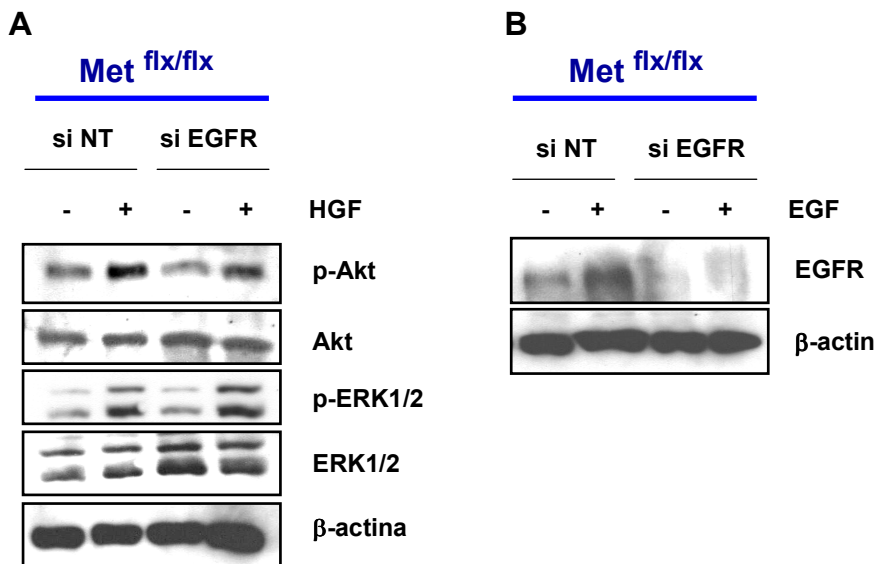
#### 1.4. La actividad antiapoptótica y pro-supervivencia inducidas por HGF en células ovasales son independientes de la actividad quinasa del EGFR.

Los resultados mostrados hasta el momento descartan la existencia de una transactivación directa de los receptores, pero sugieren que el eje HGF-Met regula positivamente la expresión de ligandos del EGFR (TGF- $\alpha$ ). En base a estos datos y al hecho de que tanto EGF como HGF inducen proliferación y supervivencia en células ovasales, nos preguntamos a continuación si la expresión de los ligandos del EGF inducida por HGF-Met media o potencia la señalización y/o los efectos anti-apoptóticos y mitogénicos inducidos por este factor. Si esta hipótesis fuera cierta, esperaríamos que las respuestas al HGF se vieran modificadas cuando se inhibe la actividad del EGFR.

Para analizar el efecto de la inhibición química del EGFR en la señalización disparada por HGF, las células Met<sup>flx/flx</sup> se trataron durante 30 minutos con AG1478 y posteriormente con HGF, analizando mediante western blot la fosforilación de Akt, ERK1/2 y STAT3 y comparándola con la señalización inducida por HGF en ausencia de AG1478. Como se observa en la Fig. 7A, la presencia de AG1478 no afectó a la activación por HGF de ninguna de las vías analizadas en células Met<sup>flx/flx</sup>, pero anuló completamente la activación de Akt y ERK1/2 en células estimuladas con EGF (Fig. 7B).



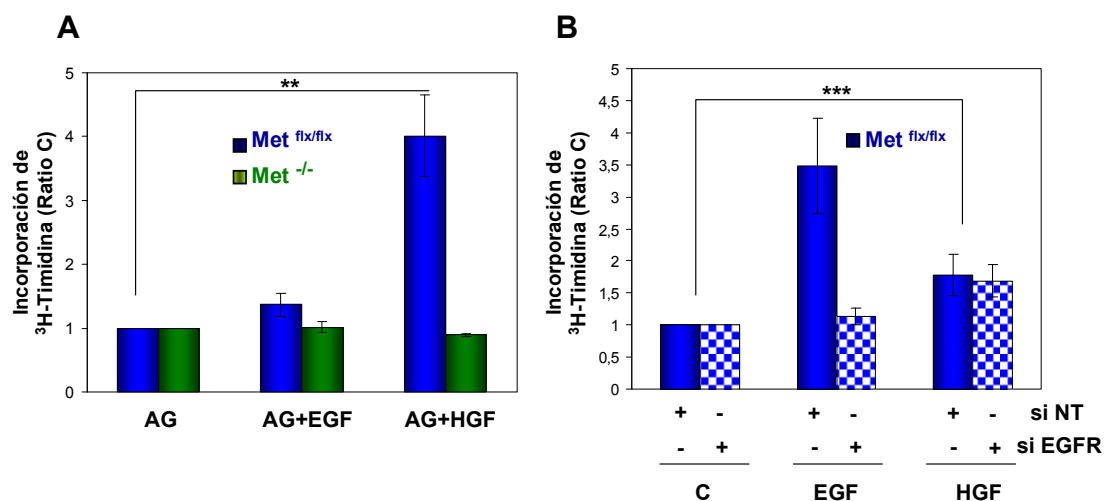
**Figura 7.** Comparación de la señalización inducida por HGF en células ovas en ausencia o presencia del inhibidor de EGFR AG1478. **(A)** Las células ovas  $Met^{flx/flx}$  se privaron de suero y se trataron con HGF (40 ng/ml) durante distintos tiempos. Cuando se indica, se añadió AG1478 (5  $\mu$ M) 30 minutos antes del tratamiento. Los lisados celulares se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturizantes y las membranas se hibridaron con los anticuerpos indicados.  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga. **(B)** Las células ovas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  se trataron con EGF (20 ng/ml) durante 10 min, con o sin pre-tratamiento con AG1478 (5  $\mu$ M). Los lisados se procesaron como se indica en (A). En (A) y (B) se muestra un experimento representativo de dos realizados.



**Figura 8.** Efecto del silenciamiento de la expresión del EGFR en la señalización inducida por HGF en células ovas  $Met^{flx/flx}$ . **(A)** Las líneas de células ovas  $Met^{flx/flx}$  se transfectaron con siRNA sin diana (no Targeting, NT) (control negativo) o con siRNA para EGFR. Posteriormente, se privaron de suero y se trataron con HGF (40 ng/ml) durante 15 min. Los lisados celulares se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturizantes y las membranas se hibridaron con los anticuerpos indicados.  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga. **(B)** Eficiencia del silenciamiento de la expresión de EGFR analizada mediante western blot. Las líneas celulares  $Met^{flx/flx}$  se transfectaron, cultivaron y procesaron como en (A), pero en este caso el tratamiento se realizó con EGF 20 ng/ml. durante 15 min. En (A) y (B) se muestra un experimento representativo de dos realizados.

Adicionalmente, se silenció la expresión génica del EGFR mediante siRNA, para soslayar posibles efectos inespecíficos de la inhibición química mediante AG1478. Las células ovasales  $Met^{flx/flx}$  se transfectaron con siRNA sin diana y con siRNA específico para EGFR y se analizó por western blot el efecto del silenciamiento sobre la señalización inducida por HGF. En la Fig. 8A se puede apreciar que la activación de Akt y ERK1/2 en respuesta al HGF no se ve afectada por el silenciamiento de la expresión de EGFR. La Fig. 8B muestra la eficiencia del silenciamiento del receptor de EGF, analizada también mediante western blot. Estos resultados indican que los ligandos del EGFR inducidos por Met no son responsables de la activación de Akt, ERK1/2 y STAT3 disparadas por el receptor Met y en general que para la señalización mediada por Met no es necesaria la actividad quinasas del EGFR.

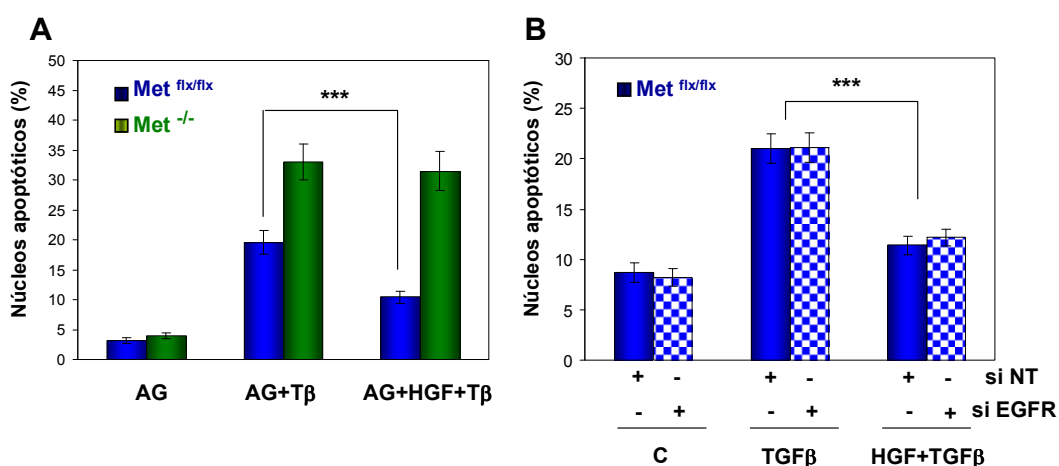
Como hemos visto en la Fig. 1 y como han demostrado resultados previos de nuestro grupo [del Castillo et al., 2008a], el HGF induce una respuesta mitogénica en células ovasales murinas. La respuesta proliferativa al HGF en presencia de AG1478 se analizó mediante la incorporación de timidina tritiada al DNA en células pre-tratadas con AG1478 durante 30 minutos y posteriormente estimuladas con HGF durante 48 horas. En la Fig. 9A (y comparando con la Fig. 1) se puede apreciar que la tasa de proliferación en respuesta al HGF en células ovasales  $Met^{flx/flx}$  no disminuye en presencia de AG1478. Es más, el hecho de que el AG1478 disminuya la proliferación basal de las células ovasales (Fig. 4A), hace que el efecto proliferativo del HGF sea incluso mayor que en ausencia de AG1478. Como control positivo para la especificidad y eficacia del inhibidor AG1478 se usaron células tratadas con EGF, observándose que el AG1478 anuló completamente el aumento en la síntesis de DNA mediada por el EGF. Para corroborar estos datos se utilizó siRNA para silenciar la expresión de EGFR en células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y evaluar el efecto proliferativo del HGF en estas condiciones. Como muestran los resultados mostrados en la Fig. 9B, la tasa de incorporación de timidina tritiada en respuesta al HGF es idéntica en células ovasales  $Met^{flx/flx}$  transfectadas con siRNA sin diana y con siRNA para EGFR. Como control de la eficacia del silenciamiento del EGFR se comprobó que la respuesta proliferativa del EGF estaba impedida en presencia del siRNA específico para EGFR.



**Figura 9. Efecto de la inhibición y el silenciamiento del EGFR en la proliferación inducida por el HGF en células ovasales.** La síntesis de DNA se determinó mediante incorporación de  $^3H$ -timidina. (A) Las células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  fueron tratadas durante 48h con EGF 20 ng/ml o HGF 40 ng/ml tras un pretratamiento de 30 minutos con AG1478 5  $\mu$ M. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes con condiciones por triplicado. (B) Las líneas celulares  $Met^{flx/flx}$  se transfectaron con siRNA sin diana (no targeting, NT) o con siRNA para EGFR y posteriormente se sembraron de nuevo y se trataron con EGF 20 ng/ml o HGF 40 ng/ml durante 48 h. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes, con condiciones por cuadruplicado. \*\*\* $P < 0,001$  \*\* $P < 0,01$ .

Nuestro grupo ha demostrado anteriormente que la adición de HGF exógeno provoca una disminución de aproximadamente el 50% de la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  [del Castillo et al., 2008a]. Para comprobar si la inhibición del EGFR tenía algún efecto sobre el efecto protector del HGF frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ , se trataron células ovasales Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup> con AG1478 durante 30 minutos y posteriormente se estimularon con TGF- $\beta$ , sólo o en combinación con HGF, durante 24 horas. La determinación del número de núcleos apoptóticos reveló que la pre-incubación con AG1478 no modifica el efecto pro-supervivencia del HGF sobre la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  (Fig. 10A). Estos resultados fueron también corroborados mediante ensayos de silenciamiento del EGFR mediante siRNA. Así, se procedió a la determinación del índice apoptótico en células ovasales Met<sup>flx/flx</sup> transfectadas con siRNA para EGFR y tratadas con TGF- $\beta$  sólo o en combinación con HGF. En los resultados mostrados en la Fig. 10B se puede observar que en células ovasales Met<sup>flx/flx</sup> el HGF disminuye la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en condiciones en las que se ha silenciado la expresión del EGFR. Estos resultados indican que el EGFR no media la protección por HGF frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ .

En resumen, los ligandos del EGFR no median las respuestas proliferativas y pro-supervivencia inducidas por el receptor Met. Nuestros resultados muestran además que la actividad tirosina quinasa del EGFR no es necesaria ni para el efecto proliferativo ni para el efecto pro-supervivencia frente a la apoptosis inducida por el TGF- $\beta$  promovidos por el HGF en células ovasales.

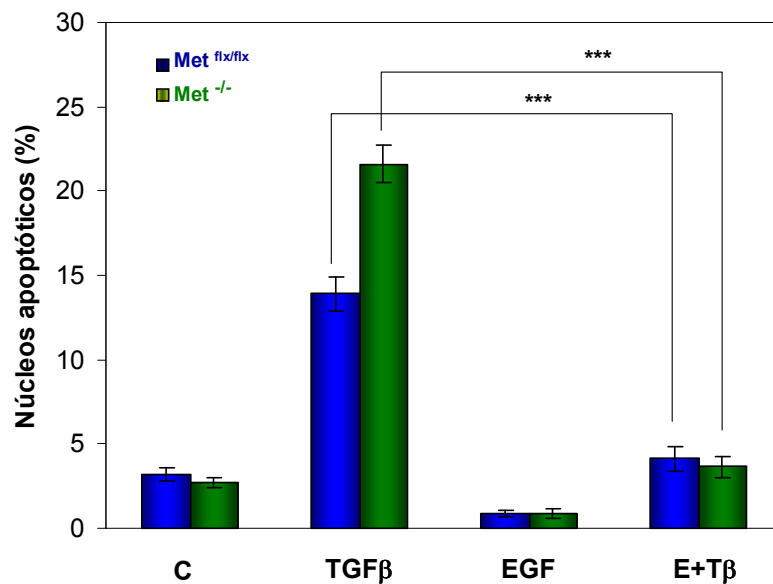


**Figura 10.** Efecto de la inhibición y el silenciamiento del EGFR en la protección por HGF frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ . (A) Índice apoptótico en células ovasales tratadas con TGF- $\beta$  1 ng/ml sólo o en combinación con HGF 40 ng/ml durante 24 h, con o sin pre-tratamiento con AG1478 5  $\mu$ M. Los núcleos apoptóticos se contaron y visualizaron como se indica en la figura 5B. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes realizados por triplicado. (B) Índice apoptótico en células Met<sup>flx/flx</sup> transfectadas con siRNA sin diana (no targeting, NT) o con siRNA para EGFR. Las células se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml sólo o en combinación con HGF 40 ng/ml. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado. \*\*\*P<0,001.

Por otra parte, nuestros resultados previos indicaban que el EGFR induce la activación de Akt y ERK1/2 tanto en células Met<sup>flx/flx</sup> como en células Met<sup>-/-</sup> (ver Antecedentes). Esto, junto al hecho de que el efecto mitogénico del EGF en células ovasales Met<sup>-/-</sup> es indistinguible del producido en células Met<sup>flx/flx</sup> (Fig. 1), constituyen evidencias sólidas de que tampoco el EGFR requiere la actividad quinasa de Met para inducir su cascada de señalización y sus efectos biológicos. Para confirmar estas evidencias, quisimos también estudiar la actividad antiapoptótica del EGF frente a

TGF- $\beta$  en las líneas celulares  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$ . En la Fig. 11 se observa que el tratamiento de las células ovas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  con EGF anula completamente la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en ambas líneas celulares, corroborando la idea de que la actividad tirosina quinasa de Met es completamente dispensable para el efecto de supervivencia del EGF frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ . Por tanto, nuestros resultados muestran que la actividad tirosina quinasa de Met no es necesaria para la proliferación y supervivencia inducidas por EGFR en células ovas murinas.

En resumen, podemos concluir que los receptores Met y EGFR promueven supervivencia y proliferación en células ovas y que para mediar estos efectos actúan de manera independiente el uno del otro.



**Figura 11.** Protección por EGF frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en líneas de células ovas murinas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$ . Las células se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml sólo o en combinación con EGF 20 ng/ml durante 48 h. Los núcleos apoptóticos se contaron tal como se describe en la figura 5B. Se representa la media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes realizados por triplicado. \*\*\* $P < 0,001$ .

## 2. Protección por HGF autocrino frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ en células ovas.

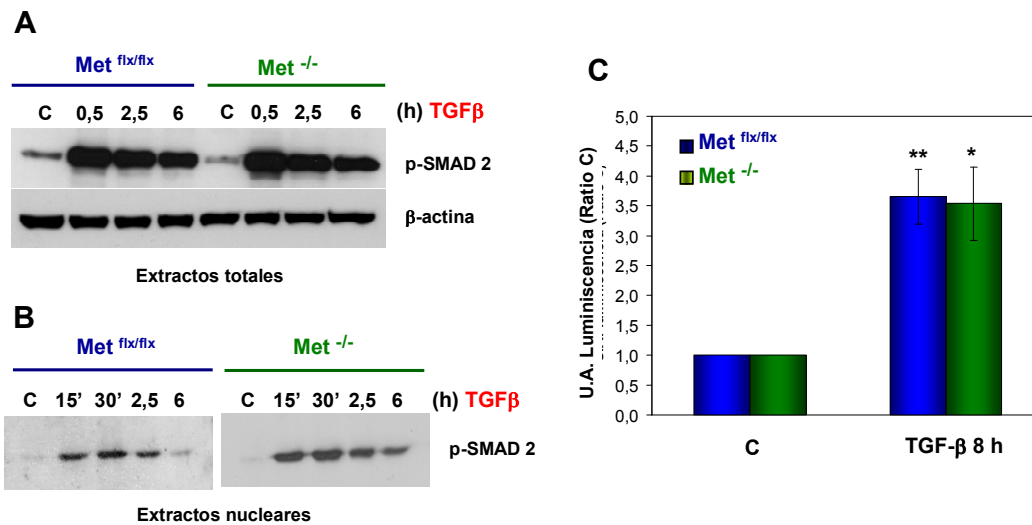
Resultados previos de nuestro grupo habían demostrado que el TGF- $\beta$  induce apoptosis en células ovas y que el HGF exógeno protege de la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  [del Castillo et al 2008a]. En este mismo trabajo también demostramos que las células ovas murinas tienen un bucle autocrino de HGF, de manera que en ausencia de HGF exógeno, las células ovas  $Met^{flx/flx}$  presentan una mayor protección que las células ovas  $Met^{-/-}$  frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ . Tomando como base estos resultados, hemos intentado profundizar en la relevancia de la señalización autocrina HGF/Met en la protección frente a apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en células ovas y los mecanismos moleculares que median esta protección, lo que implica la necesidad de caracterizar previamente la apoptosis por TGF- $\beta$  en este modelo celular.

### 2.1. Vías de señalización disparadas por el TGF- $\beta$ en células ovas $Met^{flx/flx}$ y $Met^{-/-}$ .

En primer lugar, analizamos las vías de señalización activadas por TGF- $\beta$  en células ovas, empezando por la **vía canónica**, es decir la señalización mediada por las proteínas Smads, con la intención de determinar si esta vía canónica se ve afectada en ausencia de actividad tirosina quinasa de Met. Para ello analizamos mediante western blot la fosforilación de Smad2 en extractos totales de células ovas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  tratadas con TGF- $\beta$  durante 0.5, 2.5 y 6 horas. Como se observa en la [Fig. 12A](#), el TGF- $\beta$  induce fosforilación de Smad2 en ambas líneas celulares siendo éste un efecto rápido: la fosforilación de Smad2 es ya evidente a los 30 minutos de tratamiento y tiende a disminuir con el tiempo. No observamos diferencias notables entre ambas líneas celulares.

A continuación se estudió la translocación al núcleo de Smad2 fosforilado, mediante western blot realizado con extractos nucleares obtenidos de células tratadas con TGF- $\beta$  en un intervalo de tiempo comprendido entre los 15 minutos y las 6 horas. Los resultados de la [Fig. 12B](#) muestran que ya a los 15 minutos Smad2 fosforilado se ha traslocado al núcleo en ambas líneas celulares. La cinética de permanencia de Smad2 en el núcleo es similar en ambas líneas y está en consonancia con la cinética de fosforilación, observándose que con el tiempo disminuyen los niveles nucleares de Smad2 fosforilado.

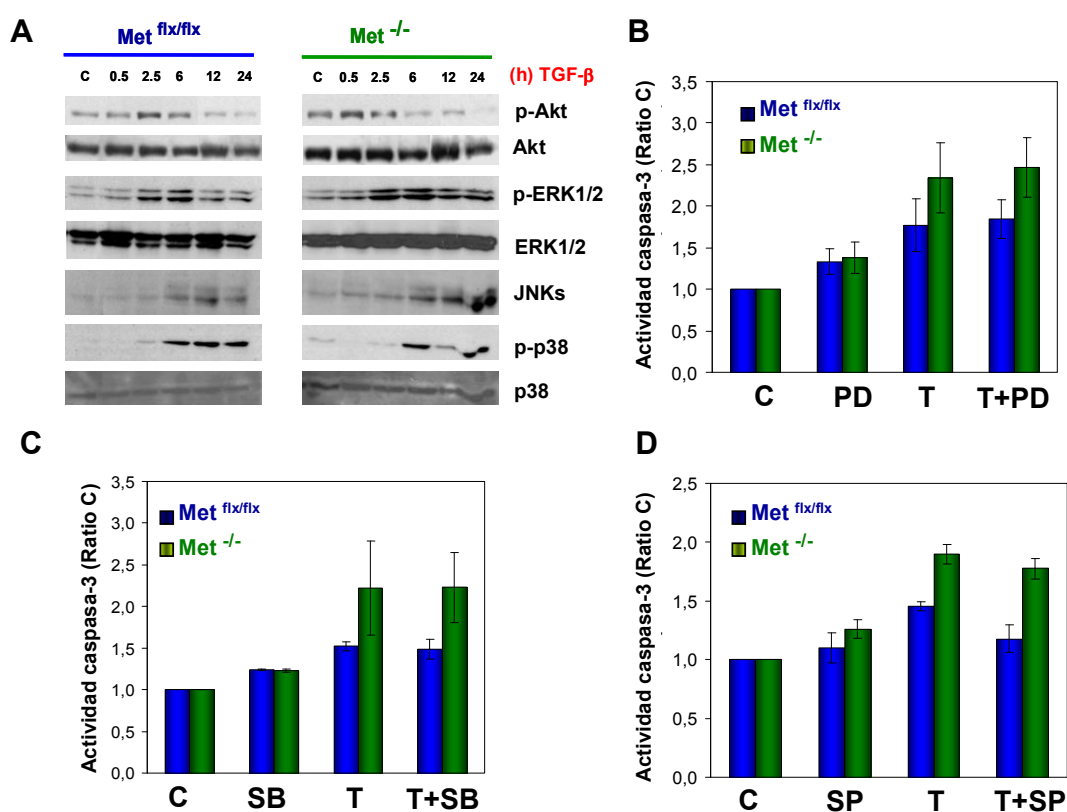
Por último, analizamos si la actividad transcripcional dependiente de Smads presentaba diferencias entre líneas. Para ello, las células se transfectaron con dos construcciones premezcladas contenidas en el kit comercial Signal SMAD reporter assay kit (SABiosciences). Una de ellas es una construcción de luciferasa de expresión inducible por Smads y la otra utiliza como gen reportero renilla de expresión constitutiva, que actúa como un control interno para normalizar las eficiencias de transfección y monitorizar la viabilidad celular (ver Materiales y Métodos, apartado 8). Una vez transfectadas, las células ovas se privaron de suero durante 16 horas y posteriormente se trataron durante 8 horas con TGF- $\beta$ . Como muestran los resultados de la [Fig. 12C](#), la actividad transcripcional dependiente de Smads en ambas líneas celulares es significativamente mayor en células tratadas con TGF- $\beta$  que en células sin tratar, sin que se observen diferencias entre líneas. En conjunto, estos resultados indican que en células ovas el TGF- $\beta$  activa la vía de Smads o vía canónica, y que ésta es funcional como demuestran los ensayos de actividad transcripcional. Además nuestros datos sugieren que la ausencia de actividad tirosina quinasa de Met no afecta a esta ruta de señalización inducida por el TGF- $\beta$ .



**Figura 12.** Activación de la vía canónica por TGF- $\beta$  en células ovas murinas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$ . (A) La fosforilación de Smad2 se analizó mediante western blot en extractos totales de células ovas deprivadas de suero durante 12 horas y posteriormente tratadas con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. Se muestra un experimento representativo de dos realizados. (B) La translocación al núcleo de Smad2 fosforilado se analizó mediante western blot realizado con extractos nucleares obtenidos de células tratadas con TGF- $\beta$  1 ng/ml, tras una deprivación de suero de 12 horas, en un intervalo de tiempo comprendido entre los 15 minutos y las 6 horas. Se muestra un experimento representativo de dos realizados. (C) Análisis de la actividad transcripcional dependiente de Smads. Las células se transfectaron con una construcción de luciferasa de expresión inducible por Smads y una segunda construcción de renilla de expresión constitutiva. Los valores de luminiscencia de la renilla se utilizaron como normalizadores de la eficiencia de transfección. Una vez transfectadas, las células ovas se deprivaron de suero durante 12 horas y posteriormente se trataron durante 8 horas con TGF- $\beta$  1 ng/ml. Los datos representados son la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes, realizados por cuadruplicado. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$

Además de la vía canónica o mediada por Smads, el TGF- $\beta$  puede activar otras vías de señalización **no canónicas**. Así, se ha descrito que el TGF- $\beta$  puede activar distintas quinasas entre las cuales destacan Akt, ERK1/2, JNKs y p38 [Moustakas y Heldin, 2005; Zhang, 2009]. Quisimos por tanto analizar también la posible activación de estas quinasas en células ovas murinas mediante western blot. Como se observa en la [Fig. 13A](#) el TGF- $\beta$  activa las quinasas Akt, ERK1/2, p38 y JNK tanto en células ovas  $Met^{flx/flx}$  como  $Met^{-/-}$ . La fosforilación de Akt y ERK1/2 es patente hasta las 2,5 horas en el caso de Akt y hasta las 6 horas en el caso de ERK1/2. En cambio, p38 y JNKs se fosforilan de manera más tardía, detectándose de forma clara las formas activas a las 6 horas y aumentando progresivamente con el tiempo.

Para estudiar el posible efecto de la activación de estas quinasas en la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ , determinamos la actividad caspasa-3 en células tratadas con TGF- $\beta$  durante 12 horas, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores químicos específicos para ERK1/2, p38 y JNKs. Ninguno de estos inhibidores ([Figs. 13B](#), [13C](#) y [13D](#)) modificó la actividad caspasa-3 inducida por TGF- $\beta$ , ni en células  $Met^{flx/flx}$  ni en células  $Met^{-/-}$ , mostrando que ni ERK1/2 ni p38 ni JNKs influyen de manera relevante en la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  y por tanto, las diferencias en la respuesta apoptótica al TGF- $\beta$  observadas entre líneas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$ , tampoco pueden deberse a una activación diferencial de estas vías entre ambas líneas celulares.

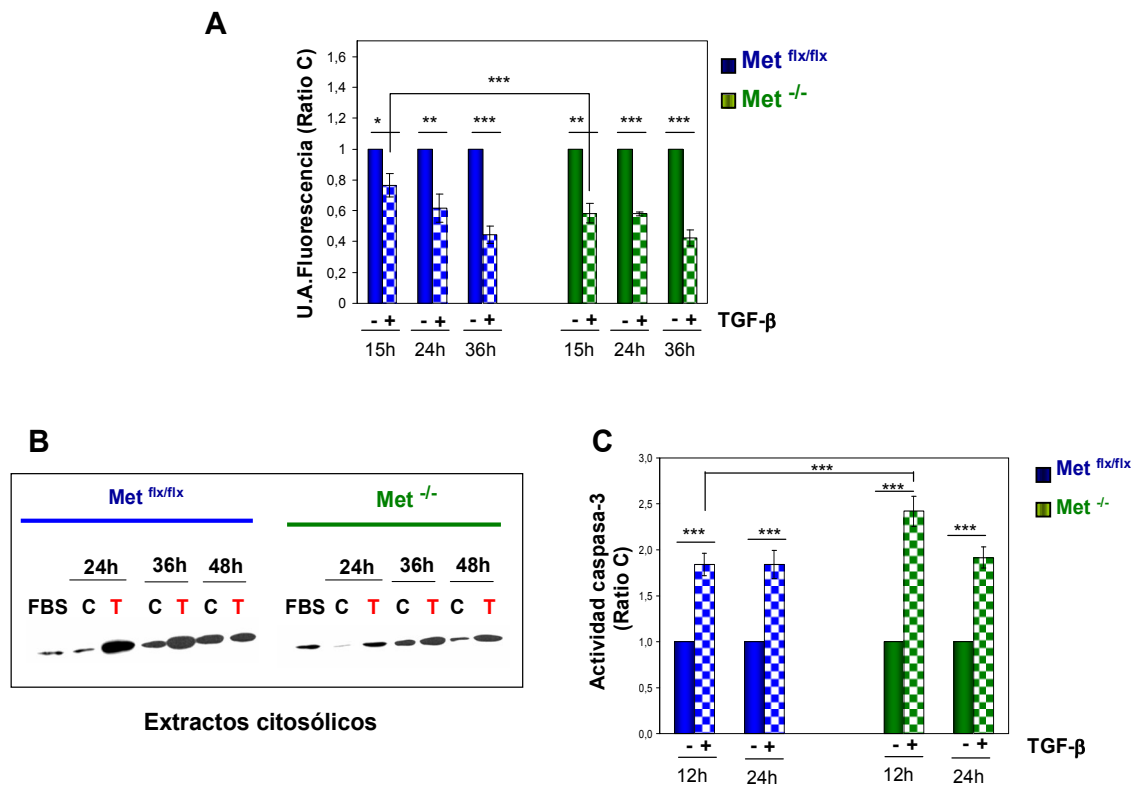


**Figura 13.** Papel de la activación de Akt, ERK1/2, JNKs y p38 en la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en células ovas *Met*<sup>flx/flx</sup> y *Met*<sup>-/-</sup>. (A) Las células ovas se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. La activación de Akt, ERK1/2, JNKs y p38 se analizó mediante western blot en extractos totales. Se muestra un experimento representativo de dos realizados. (B-D) Actividad caspasa 3 en células ovas pretratadas o no durante 30 minutos con los inhibidores específicos de ERK1/2 (PD98059 20  $\mu$ M), p38 (SB203580 10  $\mu$ M) y JNKs (SP603105 30  $\mu$ M) y tratadas posteriormente con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante 12 horas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de entre dos y seis experimentos independientes.

## 2.2. En células ovas murinas, el TGF- $\beta$ induce apoptosis por la vía mitocondrial

Dado que ni la vía canónica ni las vías no canónicas activadas por el TGF- $\beta$  exploradas hasta el momento parecen verse afectadas por la ausencia de actividad tirosina quinasa de Met, nos centramos a continuación en el estudio comparativo del mecanismo apoptótico puesto en marcha por el TGF- $\beta$  en líneas de células ovas *Met*<sup>flx/flx</sup> y *Met*<sup>-/-</sup>. Tal como se describe en la introducción (ver apartado 6.5), se ha demostrado en distintas células hepáticas que el TGF- $\beta$  induce apoptosis por la vía mitocondrial, provocando la despolarización de la mitocondria, la consecuente salida del citocromo c desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol y, finalmente, la activación de caspasas ejecutoras, como la caspasa 3 [Rodrigues et al., 1999; Freathy et al., 2000; Herrera et al., 2001b]. Como se observa en la Fig.14A el TGF- $\beta$  induce en células ovas una drástica despolarización de la membrana mitocondrial. Además hay que destacar que la caída del potencial de membrana mitocondrial es significativamente mayor en células *Met*<sup>-/-</sup> respecto a las células ovas *Met*<sup>flx/flx</sup> a las 15 horas de tratamiento con TGF- $\beta$ , igualándose en ambas líneas a 24 y 36 horas. Dado que el fenómeno de despolarización de la membrana mitocondrial resulta en la salida

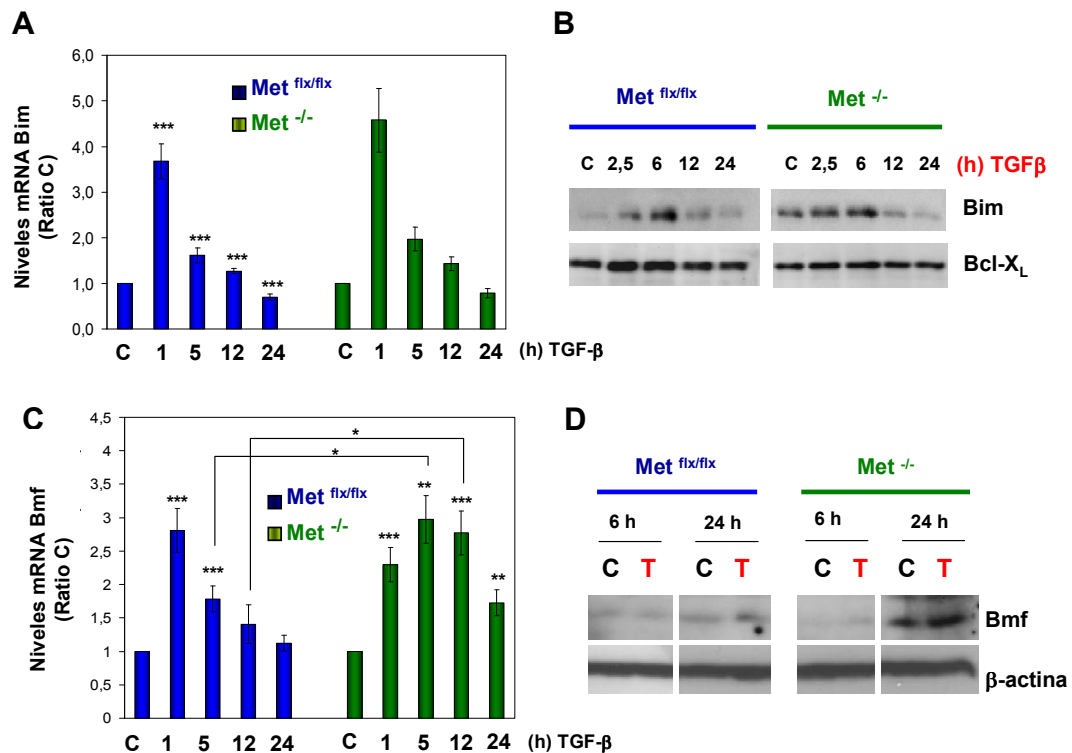
de proteínas proapoptóticas desde la mitocondria al citosol, se analizó si se producía la liberación de citocromo c al citosol en respuesta al TGF- $\beta$ . Los resultados de la Fig. 14B muestran que, como cabía esperar, el TGF- $\beta$  dispara la salida de citocromo c al citosol en células ovas. Finalmente, el análisis de la actividad caspasa-3 a distintos tiempos de tratamiento con TGF- $\beta$  (Fig. 14C) revela que, como culminación de la cascada apoptótica desencadenada por esta citoquina, en células ovas aumenta de manera significativa la actividad de esta caspasa ejecutora. De nuevo, se observa que la actividad caspasa-3 a 12 horas es significativamente mayor en células *Met*<sup>-/-</sup> que en células *Met*<sup>flx/flx</sup>. En resumen, los datos de despolarización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c al citosol revelan que la mitocondria está implicada en la respuesta apoptótica al TGF- $\beta$  en células ovas. La amplificación de la respuesta apoptótica observada en células carentes de actividad quinasa de Met (ver Antecedentes) está asociada con una mayor intensidad en la disminución del potencial de membrana mitocondrial y con una mayor activación de caspasa-3, revelando un papel de la señalización autocrina de HGF/Met en estos procesos.



**Figura 14.** El TGF- $\beta$  induce apoptosis por la vía mitocondrial en células ovas *Met*<sup>flx/flx</sup> y *Met*<sup>-/-</sup>. (A) Potencial de membrana mitocondrial determinado mediante citometría de flujo tras incubación con la sonda fluorescente JC1. Las células se privaron de suero 2-4 horas y posteriormente se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. Se representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  (B) Determinación de los niveles de citocromo c mediante western blot en extractos citosólicos. Las células ovas se sometieron a privación de suero durante 2-4 horas y se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml (T) durante 24, 36 y 48 horas. Se muestra un experimento representativo de dos realizados. (C) Actividad caspasa-3 en células ovas tratadas con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. Se representa la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos independientes, realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$

### 2.3. En células ovasales $Met^{flx/flx}$ y $Met^{-/-}$ el TGF- $\beta$ induce la expresión de Bim y Bmf, proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2.

Nuestro grupo ha caracterizado los mecanismos de apoptosis por TGF- $\beta$  en células hepáticas, fundamentalmente hepatocitos fetales aunque también células de hepatoma, contribuyendo a completar en estos tipos celulares un esquema de señalización apoptótica por TGF- $\beta$  en el que juegan un papel importante el estrés oxidativo [Herrera et al., 2001b], la inducción de la NADPH oxidasa NOX4 [Carmona-Cuenca et al., 2008] y la regulación de proteínas de la familia Bcl-2 [Herrera et al., 2001a]. Por tanto, el siguiente paso fue investigar si los eventos descritos en la cascada apoptótica inducida por el TGF- $\beta$  en hepatocitos fetales y células de hepatoma podría darse también en las células progenitoras hepáticas adultas, evaluando al mismo tiempo el efecto de la señalización autocrina de HGF/Met en estos procesos. Exploramos en primer lugar la posible inducción de la expresión de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, especialmente Bim y Bmf, para las que se ha demostrado un papel relevante en la apoptosis por TGF- $\beta$  [Ramjaun et al., 2007, Caja et al., 2009]. Para ello, las células se privaron de suero y se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml, analizando en un curso temporal entre 1 hora y 24 horas la expresión de Bim y Bmf, bien mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real o bien mediante western blot. El análisis de los niveles de transcrito de Bim (Fig. 15A) reveló que la transcripción de este gen es inducida de manera rápida y transitoria por TGF- $\beta$ , con un pico de inducción a 1 hora de tratamiento, tanto en células  $Met^{flx/flx}$  como en células  $Met^{-/-}$ . La intensidad de esta inducción disminuye con el tiempo y a las 24 horas los niveles de transcrito de Bim están por debajo del control. La cinética de la inducción es idéntica en ambos tipos celulares. El análisis de los niveles de proteína Bim (Fig. 15B) corrobora el perfil cinético de la inducción del mRNA obtenido mediante RT-PCR cuantitativa, observándose una inducción por TGF- $\beta$  hasta las 6 horas y posterior caída a los niveles basales. El hecho de que no se observen diferencias aparentes entre líneas celulares en la regulación de la expresión de Bim por TGF- $\beta$  sugiere que Met no tiene un papel relevante en esta respuesta aunque hay que destacar que los niveles basales de Bim en células  $Met^{-/-}$  son mayores que en células  $Met^{flx/flx}$ , lo que podría sugerir un papel de Met en la regulación de Bim a nivel basal. A diferencia de lo observado respecto a Bim, los niveles de transcrito de Bmf muestran dos perfiles claramente distintos entre células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  (Fig. 15C). En las células ovasales  $Met^{flx/flx}$  se observa una inducción rápida y transitoria por TGF- $\beta$ , recuperando a las 12 horas niveles muy similares al control. Sin embargo, en las células ovasales  $Met^{-/-}$ , la inducción de la expresión del transcrito de Bmf es más sostenida en el tiempo estando por encima de los niveles control hasta 24 horas después del tratamiento. En consonancia con estos datos, se observó una inducción de la proteína Bmf por TGF- $\beta$  mediante western blot (Fig. 17C). Además, los niveles de proteína, tanto basales como bajo tratamiento con TGF- $\beta$ , eran mayores en células  $Met^{-/-}$  que en células  $Met^{flx/flx}$ . Todos estos datos revelan un papel del receptor Met en la regulación de la expresión de Bmf en respuesta al TGF- $\beta$ , sugiriendo fuertemente que la señalización autocrina HGF/Met contribuye a contrarrestar la inducción de Bmf por TGF- $\beta$ .

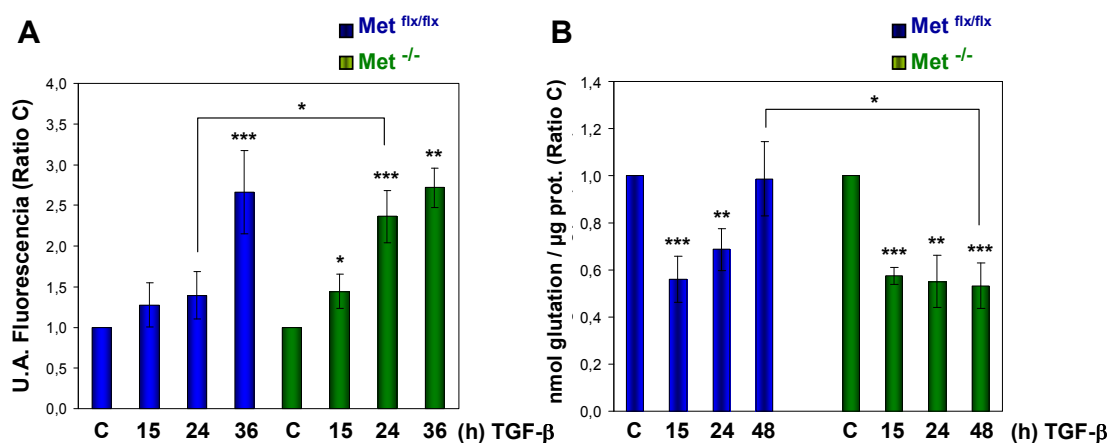


**Figura 15.** Efecto del TGF- $\beta$  en la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bim y Bmf en células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$ . (A,C) Niveles de transcrito de Bim y Bmf, respectivamente, analizados mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Las células ovasales se privaron de suero durante 12 horas y posteriormente se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cinco experimentos independientes. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  (B, D) Expresión de las proteínas Bim y Bmf, respectivamente, analizada mediante western blot en extractos totales. Se muestra un experimento representativo de tres (Bim) o dos (Bmf) realizados. La expresión de  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga.

## 2.4. La ausencia de actividad tirosina quinasa de Met amplifica el estrés oxidativo inducido por TGF- $\beta$ en células ovasales.

Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) median la apoptosis vía mitocondrial inducida por TGF- $\beta$  en hepatocitos fetales de rata [Herrera et al., 2001b]. El siguiente paso fue, por tanto, analizar la producción de ROS en respuesta al TGF- $\beta$  en células ovasales. Para ello, las células ovasales se privaron de suero 2-4 horas y se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml, analizando en un marco temporal comprendido entre 15 y 36 horas el contenido en ROS mediante citometría de flujo utilizando la sonda fluorescente DCFH-DA (ver Materiales y Métodos, apartado 11). Como se puede ver en la Fig. 16A, el contenido intracelular de ROS aumenta en ambas líneas celulares en respuesta al TGF- $\beta$ , aunque el proceso es más rápido en las células que carecen de actividad tirosina quinasa de Met, donde se observa un aumento significativo respecto al control desde las 15h de tratamiento con TGF- $\beta$ . Además, a 24h de tratamiento el contenido en ROS de las células ovasales  $Met^{-/-}$  es significativamente mayor que en células  $Met^{flx/flx}$ . El glutatión es un importante agente antioxidante intracelular que mantiene el microambiente celular en estado reducido al eliminar ROS [Anderson, 1998]. En células hepáticas, su disminución se suele considerar una evidencia de que las células están sufriendo estrés oxidativo [Loguercio y Federico, 2003]. Por ello, determinamos también el contenido intracelular de glutatión de células ovasales sometidas a tratamiento con TGF- $\beta$ , en ausencia de suero, en un intervalo temporal comprendido entre 15 y 48 horas. Como se observa en la Fig. 16B, el TGF- $\beta$  induce tanto en células ovasales  $Met^{flx/flx}$  como  $Met^{-/-}$  una disminución en los niveles intracelulares de glutatión

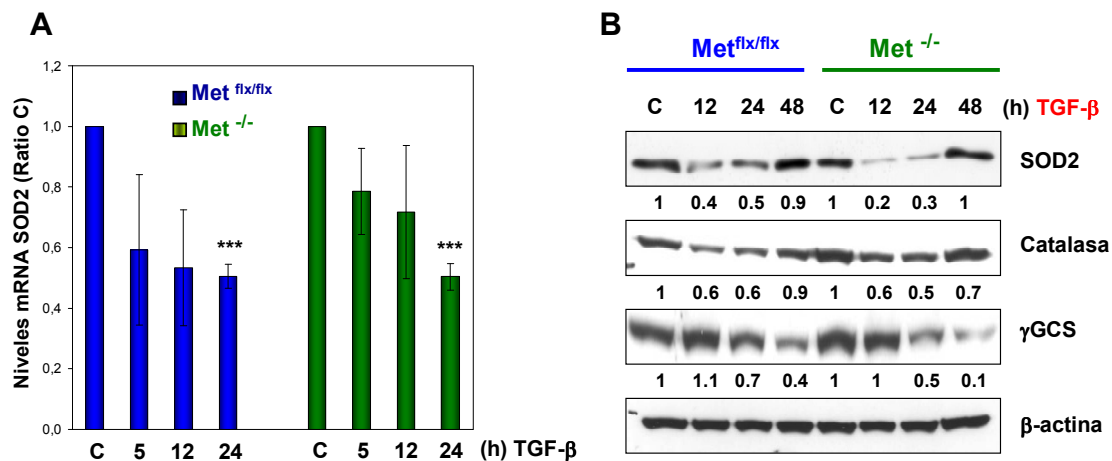
entre 15 y 24 horas de igual magnitud en ambos tipos celulares. En cambio a 48 horas, las células ovales  $Met^{flx/flx}$  han recuperado los niveles de glutatión, mientras que en las  $Met^{-/-}$  siguen disminuidos respecto al control, haciendo que a este tiempo las diferencias entre líneas sean significativas.



**Figura 16. Estrés oxidativo inducido por TGF- $\beta$  en células ovales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$**  (A) Las células ovales se privaron de suero durante 2-4 horas y se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. El contenido intracelular de ROS se determinó mediante incubación con la sonda fluorescente DCFH-DA y posterior análisis mediante citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  (B) Contenido intracelular de glutatión en células ovales privadas de suero durante 2-4 horas y posteriormente tratadas con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$

El aumento en ROS inducido por el TGF- $\beta$  puede deberse a una disminución de las defensas antioxidantes de la célula y/o a un aumento en la producción de ROS mediante distintos sistemas generadores de radicales. Exploramos por tanto el papel que pudieran tener distintas **enzimas antioxidantes** celulares en este fenómeno (Fig. 19), haciendo hincapié en la superóxido dismutasa 2 (SOD2) que al ser mitocondrial [Zelko et al., 2003] pensamos tendría un papel importante en la apoptosis por TGF- $\beta$ , ya que este proceso (como hemos visto en la Fig. 14) implica una desregulación de la función mitocondrial. Además nuestro grupo ha demostrado previamente que el TGF- $\beta$  induce una disminución de SOD2 en hepatocitos fetales [Herrera et al., 2004a]. El estudio de las posibles variaciones en la expresión de SOD2 en células ovales se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real y western blot. Como se observa en la Fig. 17A, el TGF- $\beta$  disminuye los niveles de transcrito de SOD2 en células ovales. Esta disminución no se ve afectada por la ausencia de actividad tirosina quinasa de Met, puesto que las cinéticas de expresión de SOD2 en líneas celulares  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$ , son muy similares. En la Fig. 17B se muestran los resultados del análisis de la expresión proteica de SOD2 y otras enzimas antioxidantes, concretamente catalasa (enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua) y  $\gamma$ -glutamil cisteín sintetasa ( $\gamma$ -GCS, enzima implicada en la ruta biosintética del glutatión). Los resultados revelan que la SOD2 disminuye notablemente en ambas líneas celulares en respuesta al TGF- $\beta$  siendo esta disminución más acusada en el caso de células  $Met^{-/-}$ , lo que sugiere que Met podría tener un papel en la regulación post-transcripcional de SOD2. El TGF- $\beta$  también produce una disminución en la expresión de catalasa y  $\gamma$ GCS. La modulación de los niveles de catalasa sigue el mismo esquema temporal que la modulación de SOD2, disminuyendo respecto al control a 12 y 24 horas y recuperándose a 48 horas, sin que se observen diferencias

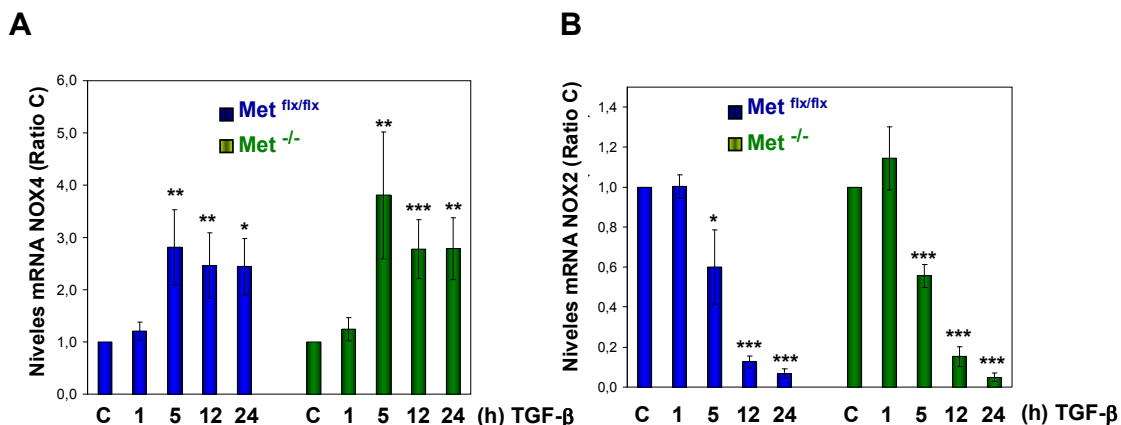
aparentes entre líneas. En cambio, la expresión de  $\gamma$ -GCS disminuye más tardíamente (a partir de las 24 horas) y se mantiene baja hasta las 48 horas, observándose además que esta regulación es más drástica en células ovasales  $Met^{-/-}$  que en células  $Met^{flx/flx}$ . Todos estos datos evidencian que el TGF- $\beta$  altera el estado redox de las células ovasales, aumentando el contenido en ROS y disminuyendo el contenido intracelular de glutation así como la expresión de distintas enzimas antioxidantes como la SOD2, la  $\gamma$ GCS y la catalasa. Además, las células que carecen de señalización autocrina de HGF/Met ven potenciados estos efectos, revelando un papel de la señalización autocrina HGF/Met en la modulación del estrés oxidativo inducido por el TGF- $\beta$ .



**Figura 17. Efecto del TGF- $\beta$  sobre enzimas antioxidantes en células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$ .** (A) Niveles de transcrito de SOD2 analizados mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Las células ovasales se privaron de suero durante 12 horas y posteriormente se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$  (B) Las células ovasales se privaron de suero durante 2-4 horas y posteriormente se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. Los lisados celulares se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturizantes y las membranas se hibridaron con los anticuerpos indicados.  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de dos realizados

Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que también hay sistemas **generadores de ROS** que tienen un papel fundamental en la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ . Este es el caso de NOX4, enzima que tiene un papel esencial en la inducción de apoptosis por TGF- $\beta$  en hepatocitos fetales de rata y humanos y en células de hepatoma, de tal manera que si se bloquea la inducción de NOX4 no se produce la apoptosis por TGF- $\beta$  [Carmona-Cuenca et al, 2008]. Por tanto, quisimos también estudiar en nuestro modelo celular la posible regulación por TGF- $\beta$  de NOX4 y otros componentes del sistema de NADPH-oxidasas (NOX1 y NOX2), mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Como se observa en la Fig. 18A, el TGF- $\beta$  induce un aumento en los niveles de expresión del mRNA de NOX4, con una inducción máxima a 5 horas, que tiende a ser mayor en las células  $Met^{-/-}$  que en las  $Met^{flx/flx}$ , aunque las diferencias entre líneas no son estadísticamente significativas. En cambio, la expresión de NOX2 disminuye con el tratamiento con TGF- $\beta$  en células ovasales (Fig. 18B) y de nuevo no se observan diferencias entre células con o sin actividad tirosina quinasa de Met. Respecto a NOX1, no se pudo detectar su expresión en células ovasales, ni en presencia ni en ausencia de TGF- $\beta$ . Conjuntamente, estos resultados indican que en células ovasales, el TGF- $\beta$  induce un proceso de estrés oxidativo con aumento de la producción de ROS y una disminución del contenido intracelular de glutation, que se acompaña de una regulación negativa de la expresión de enzimas antioxidantes y un

aumento de la expresión de un sistema generador de ROS, NOX4. El proceso de estrés oxidativo inducido por TGF- $\beta$  es más pronunciado en células Met<sup>-/-</sup> datos que sugieren un papel antioxidante para el HGF.

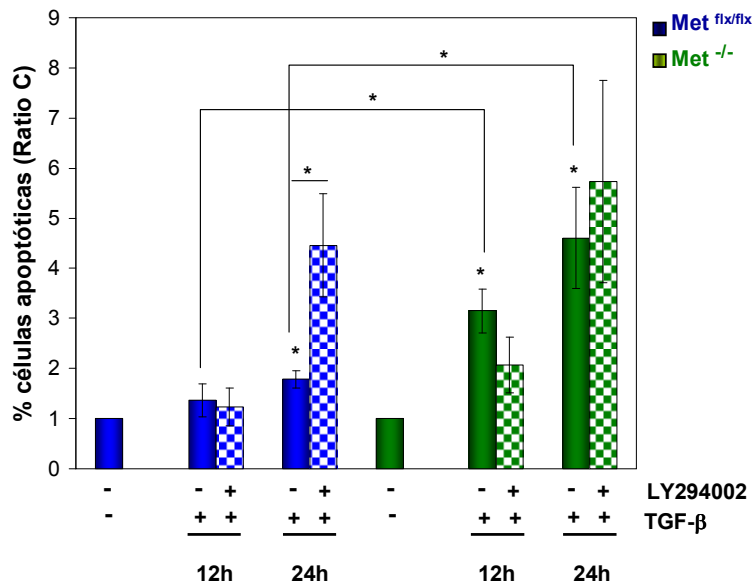


**Figura 18.** Efecto del TGF- $\beta$  sobre la transcripción de NOX4 y NOX2 en células ovas Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup>. (A, B) Niveles de transcrito de NOX4 y NOX2, respectivamente, analizados mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Las células ovas se privaron de suero durante 12 horas y posteriormente se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

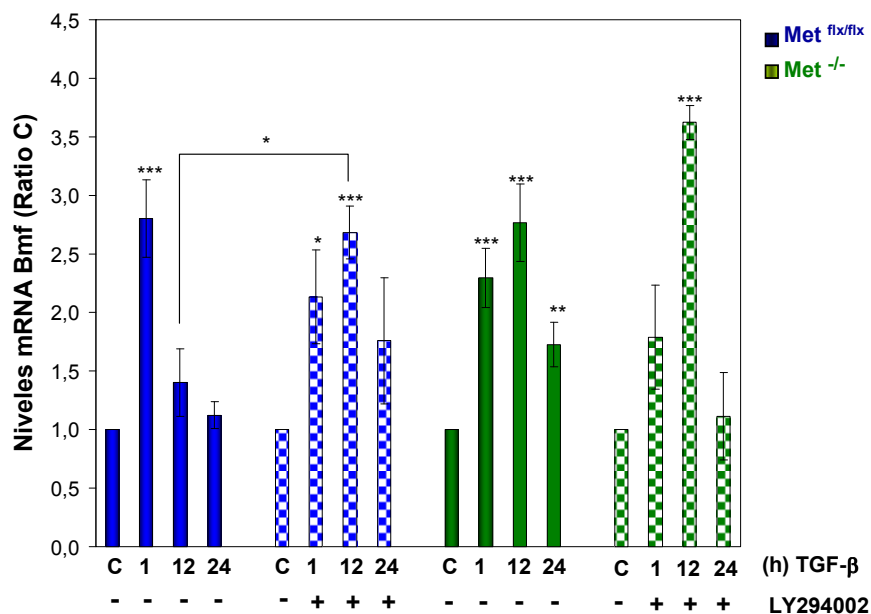
## 2.5. Importancia de la PI3K en la protección frente a apoptosis inducida por TGF- $\beta$ en células ovas

Según hemos visto hasta ahora, nuestro modelo de células ovas carente de actividad tirosina quinasa de Met nos ha permitido poner de manifiesto que el bucle HGF autocrino/Met frena la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ , mostrando nuestros resultados que en células Met<sup>-/-</sup> están amplificadas eventos como despolarización de la membrana mitocondrial, el incremento de ROS, la caída en los niveles de glutathion, y la regulación negativa de las proteínas antioxidantes SOD2 y  $\gamma$ GCS, así como la inducción transcripcional de Bmf. El siguiente paso fue profundizar en cuál/es de las vías de señalización activadas por Met son responsables de estas diferencias en la apoptosis en respuesta al TGF- $\beta$  que observamos entre células Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup>. Como hemos visto en la Fig. 13, ya habíamos comprobado que ni la inhibición de ERK1/2, ni de JNK ni de p38 tienen efecto en la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ . Debido a que la ruta de señalización de la PI3K se ha relacionado frecuentemente con procesos de supervivencia, incluidos aquellos mediados por Met, en numerosos contextos biológicos [Grotegut et al., 2010; Yu et al., 2010; Schulze-Bergkamen, 2004; Webster y Anwer, 2001; Moumen et al., 2007] nos planteamos la hipótesis de que la activación de PI3K estuviese implicada en la protección que el HGF autocrino ejerce frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en células progenitoras hepáticas adultas. Para comprobar dicha hipótesis, las células ovas se pre-trataron durante 30 minutos con un inhibidor químico específico de PI3K, el LY294002 y posteriormente durante 12 o 24 horas con TGF- $\beta$  1 ng/ml. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo utilizando anexina V para la determinación del porcentaje de células que exponen fosfatidil serina en su membrana plasmática, tal como se detalla en Materiales y Métodos (apartado 10.3.). Como se aprecia en la Fig. 19, el TGF- $\beta$  induce apoptosis en células ovas, siendo su efecto mayor en las células Met<sup>-/-</sup> que en las células Met<sup>flx/flx</sup>. Además, se observa que el tratamiento combinado con TGF- $\beta$  + LY294002 aumenta de manera significativa la apoptosis respecto al

tratamiento con TGF- $\beta$  en células ovasales Met<sup>flx/flx</sup> y que esto no sucede en células ovasales Met<sup>-/-</sup>, indicando un papel para la PI3K en la protección que ejerce el HGF autocrino frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en células ovasales murinas.



**Figura 19.** Efecto de la inhibición de PI3K en la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en células ovasales Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup>. Porcentaje de células apoptóticas determinado mediante citometría de flujo, tras incubación con anexina V-FITC y yoduro de propidio. Las células ovasales se privaron de suero durante 2-4 horas y se pretrataron con el inhibidor de PI3K LY294002 7,5 uM (cuando se indica) previamente al tratamiento con TGF- $\beta$  1 ng/ml. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.



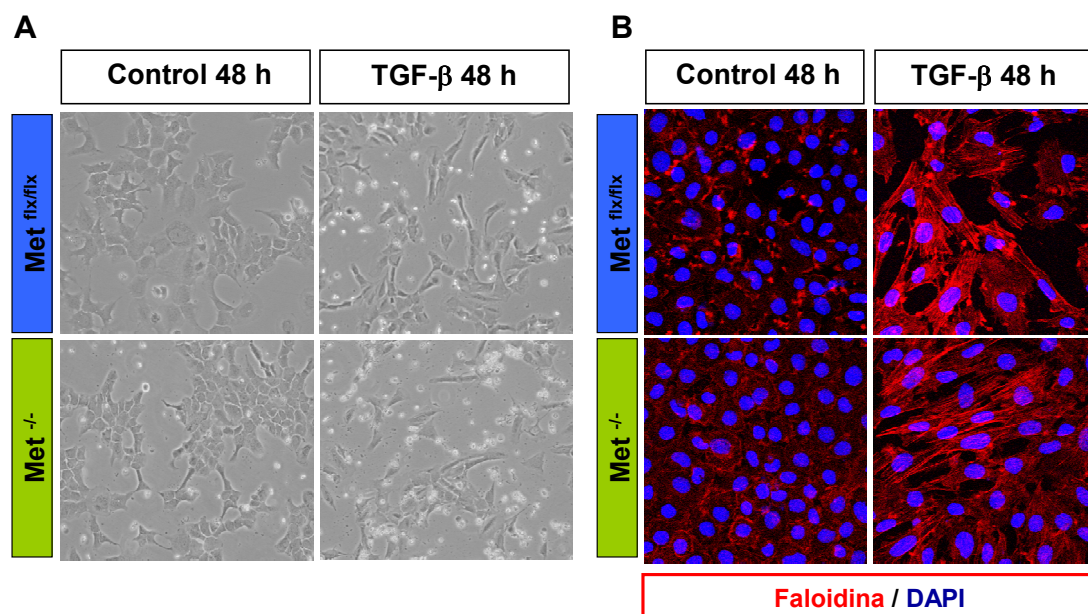
**Figura 20.** Efecto de la inhibición de PI3K en la cinética transcripcional de Bmf en respuesta a TGF- $\beta$  en células ovasales Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup>. Niveles de transcrito de Bmf analizados mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Las células ovasales se privaron de suero durante 12 horas y se pre-trataron o no con el inhibidor de PI3K LY294002 7,5 uM previamente al tratamiento con TGF- $\beta$  1 ng/ml. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

Además, como se observa en la Fig. 20, la inhibición de PI3K provoca cambios en el perfil cinético de expresión de Bmf en células  $Met^{flx/flx}$ . Para el análisis de la expresión de Bmf mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real, las células se pre-trataron durante 30 minutos con el inhibidor de PI3K LY294002 y posteriormente con TGF- $\beta$  en un intervalo de tiempo de 1 a 24 horas. Los datos obtenidos (Fig. 20) reflejan que en la combinación TGF- $\beta$  + LY aumenta los niveles de mRNA de Bmf a 12 horas, respecto al tratamiento con TGF- $\beta$ , tanto en células  $Met^{flx/flx}$  como  $Met^{-/-}$ . Este hecho es de particular importancia en las células  $Met^{flx/flx}$ , en las que el efecto de la inhibición de PI3K es retrasar la recuperación a niveles control del transcrito de Bmf, por lo que cambia su cinética de expresión, de forma que mimetiza el perfil observado en respuesta al TGF- $\beta$  en células  $Met^{-/-}$ . Por tanto, los datos de la inhibición de PI3K revelan que el tratamiento combinado con TGF- $\beta$ + LY294002 hace que las células  $Met^{flx/flx}$  mimeticen tanto la intensidad de la apoptosis como la cinética de expresión de Bmf en respuesta al TGF- $\beta$  de las  $Met^{-/-}$ , revelando que eje HGF autocrino-Met-PI3K es fundamental en la protección frente a los efectos apoptóticos del TGF- $\beta$  y que no puede ser sustituido por otras vías de señalización o por otros bucles autocrinos que puedan estar activados en estas células.

### 3. EMT inducida por TGF- $\beta$ en células ovas. Efecto de la ausencia o presencia de un receptor Met funcional.

#### 3.1. Caracterización fenotípica de la transición epitelio-mesénquima inducida por TGF- $\beta$ en células ovas $Met^{flx/flx}$ y $Met^{-/-}$ .

En el curso de nuestros estudios sobre el efecto pro-apoptótico del TGF- $\beta$ , observamos de manera consistente que la población celular que sobrevive a los efectos apoptóticos de esta citoquina sufre un llamativo cambio fenotípico, pasando de ser células poligonales y unidas entre sí formando colonias a ser células de morfología fibroblastoide y que tienden a disponerse aisladas unas de otras (Fig. 24A). Este cambio fenotípico, reminiscente de una transición epitelio-mesénquima (EMT), comienza a manifestarse a las 24 horas de tratamiento con TGF- $\beta$  y es muy evidente a las 48 horas. Además, tinciones inmunocitoquímicas de células ovas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  tratadas durante 48 horas con TGF- $\beta$  muestran un cambio en la organización del citoesqueleto de actina (Fig. 24B): en las células ovas control, la actina está principalmente concentrada en las zonas adyacentes a la membrana plasmática, siguiendo el perímetro de la célula. En cambio, en las células ovas tratadas con TGF- $\beta$  durante 48 horas, se observa que la actina se ha reorganizado formando abundantes fibras de estrés. Este cambio indica que las células están adquiriendo un fenotipo motil en respuesta al TGF- $\beta$  y refuerza la hipótesis de la existencia de una transición epitelio-mesénquima inducida por esta citoquina. Para confirmar esta hipótesis, decidimos llevar a cabo una caracterización fenotípica detallada de esta población de células ovas que sobrevive al efecto apoptótico del TGF- $\beta$



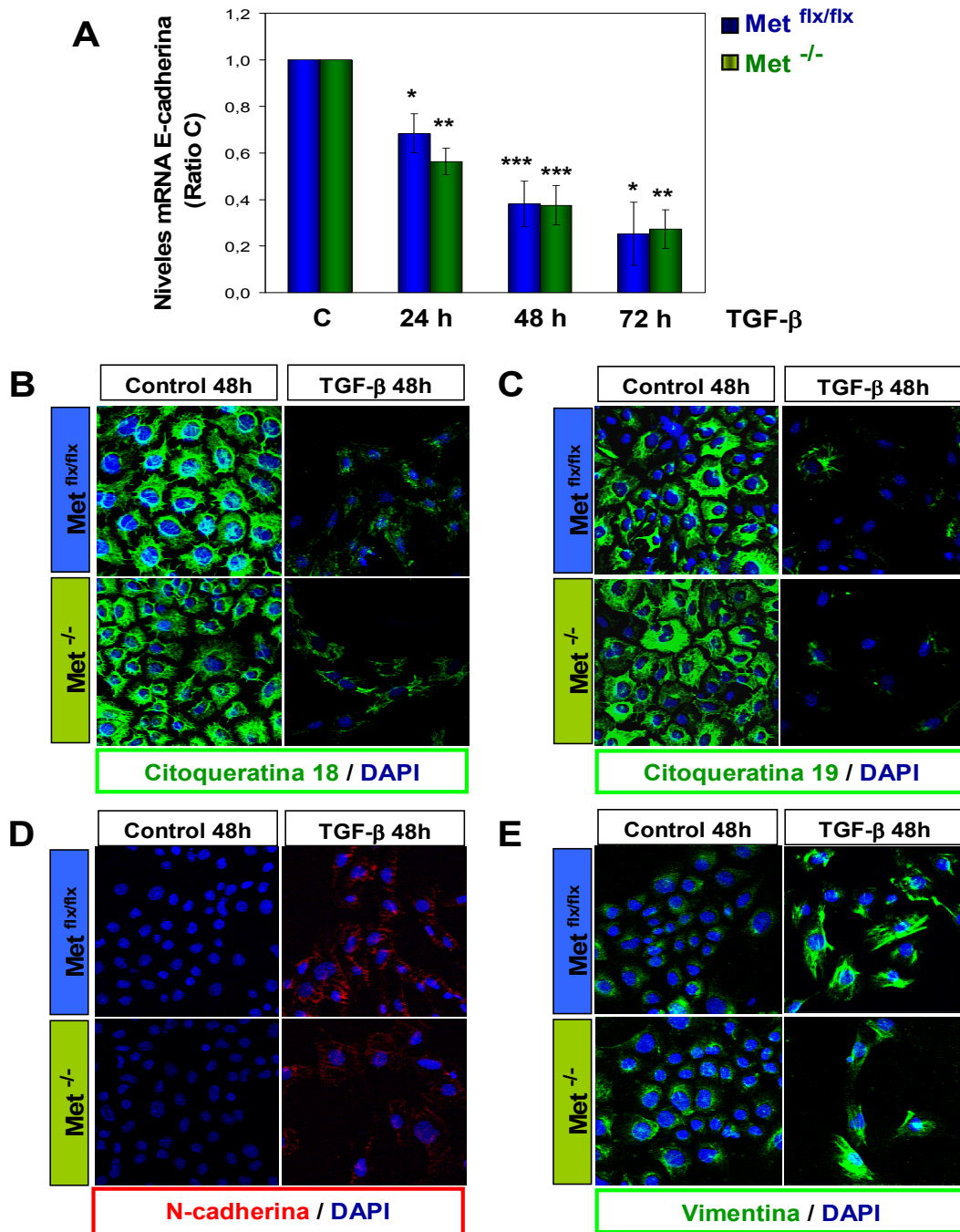
**Figura 21.** Las células ovas que sobreviven al efecto apoptótico del TGF- $\beta$  manifiestan un cambio fenotípico y presentan una reorganización de los filamentos de actina. (A) Fotografías tomadas con el microscopio de contraste de fases de células ovas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  tratadas o no con TGF- $\beta$  1 ng/ml en ausencia de suero durante 48 horas. (B) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal del citoesqueleto de actina, usando faloidina conjugada con rodamina (rojo), en células ovas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  tratadas o no con TGF- $\beta$  1 ng/ml en ausencia de suero durante 48 horas. Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

Se considera que la característica definitoria de un fenómeno de transición epitelio-mesénquima es la disminución de los niveles de expresión de la E-cadherina, proteína que forma parte de las uniones intercelulares, en concreto de las uniones adherentes, entre células epiteliales. Por tanto, analizamos en primer lugar los niveles de mRNA de E-cadherina mediante RT-PCR cuantitativa en células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  cultivadas en ausencia de suero y en presencia de TGF- $\beta$  1 ng/ml durante 24, 48 y 72 horas.

Como se observa en la [Fig. 22A](#), el tratamiento con TGF- $\beta$  induce una disminución progresiva de los niveles de transcrito de E-cadherina, alcanzándose a las 72 horas una disminución de aproximadamente un 70% respecto al control en ambas líneas celulares. Estudiamos también mediante tinción inmunocitoquímica los cambios en la expresión de otros marcadores de células epiteliales (citoqueratina 18 y 19) y mesenquimales (N-cadherina y vimentina) en células  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  cultivadas en ausencia de suero y en presencia o no de TGF- $\beta$  1 ng/ml durante 48 horas.

Como se puede ver en las [Figs. 22B y 22C](#), las células  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  control muestran una considerable expresión de citoqueratina 18 y 19, como corresponde a su naturaleza epitelial, observándose una extensa y organizada red de filamentos intermedios formada por estas citoqueratinas. En cambio, en presencia de TGF- $\beta$  la expresión de citoqueratina 18 y 19 se reduce drásticamente en ambas líneas celulares. El marcador mesenquimal N-cadherina no se expresa en células ovasales control ([Fig. 22D](#)) pero su expresión se induce en ambas líneas celulares en respuesta al TGF- $\beta$ .

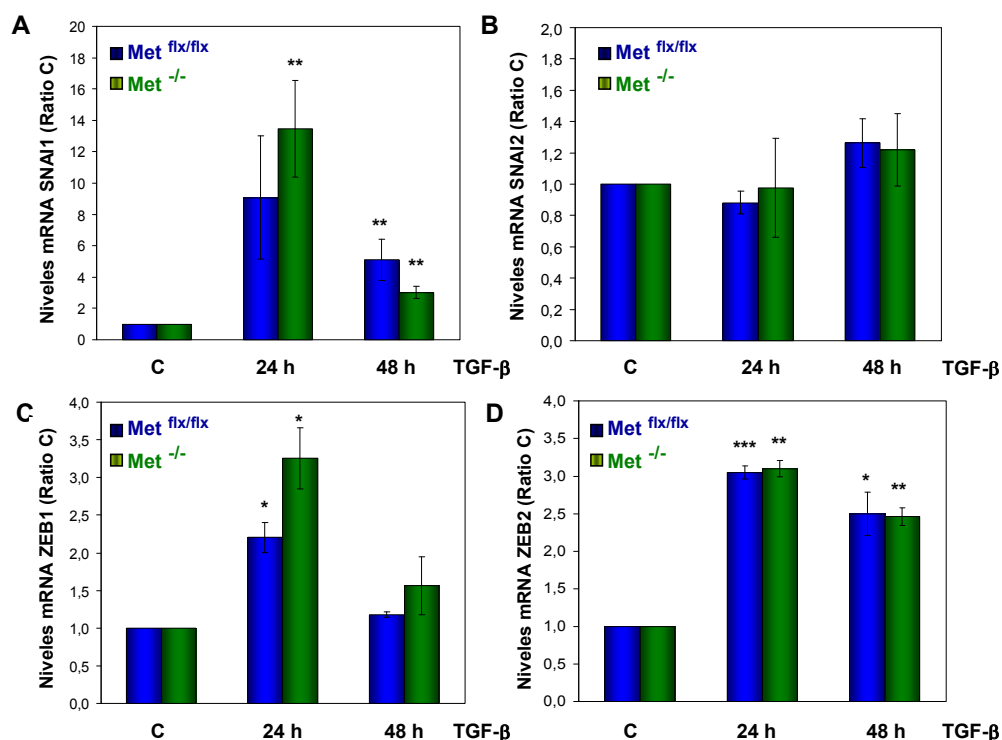
Por último, tanto en células ovasales  $Met^{flx/flx}$  como  $Met^{-/-}$  en condiciones basales se observa una expresión muy baja de vimentina, que no forma una red organizada de filamentos intermedios. El TGF- $\beta$  induce en células ovasales la expresión de vimentina, que se dispone formando filamentos. Se observa, por tanto, un reemplazamiento de los filamentos intermedios de citoqueratinas por los de vimentina en respuesta al TGF- $\beta$  en ambas líneas celulares ([Fig. 22D](#)).



**Figura 22.** El TGF-β induce en células ovas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  pérdida de marcadores epiteliales y ganancia de marcadores mesenquimales. (A) Análisis de los niveles de transcrito de E-cadherina mediante RT-PCR cuantitativa. Las células ovas se cultivaron en ausencia de FBS y se trataron con TGF-β 1 ng/ml durante los tiempos indicados. Se representa la media ± SEM de 3 experimentos independientes, realizados por triplicado. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  (B, C, D, E) Imágenes de microscopía confocal correspondientes a la expresión de los marcadores epiteliales citoqueratina-18 (B) y citoqueratina-19 (C) y de los marcadores mesenquimales N-cadherina (D) y vimentina (E), tras tinción inmunocitoquímica de células ovas en ausencia de suero y tratadas o no con TGF-β 1 ng/ml durante 48 horas. Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

### 3.2. Efecto del TGF- $\beta$ sobre la expresión de factores de transcripción implicados en la transición epitelio-mesénquima.

Para profundizar en el estudio de la transición epitelio-mesénquima, analizamos a continuación el efecto del TGF- $\beta$  sobre la expresión de distintos factores de transcripción que regulan este fenómeno. Las células ovasles  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  se cultivaron en medio libre de suero y se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante 24 y 48 h, y se procedió a determinar los niveles de expresión de SNAI1, SNAI2, ZEB1 y ZEB2 mediante RT-PCR cuantitativa. Como se puede ver en la Fig. 23A, los niveles de mRNA de SNAI1 experimentan una clara y fuerte inducción en respuesta al TGF- $\beta$ . Sin embargo, los niveles de mensajero de SNAI2 (Fig. 23B) no se ven afectados por el tratamiento con TGF- $\beta$ , en ninguna de las dos líneas. El TGF- $\beta$  también induce significativamente la expresión de los factores de transcripción ZEB1 y ZEB2 (Fig. 23C y 23D), tanto en células  $Met^{flx/flx}$  como en células  $Met^{-/-}$ . Aunque la inducción de SNAI1 y ZEB1 es mayor en las células ovasles  $Met^{-/-}$ , las diferencias entre líneas no son estadísticamente significativas.

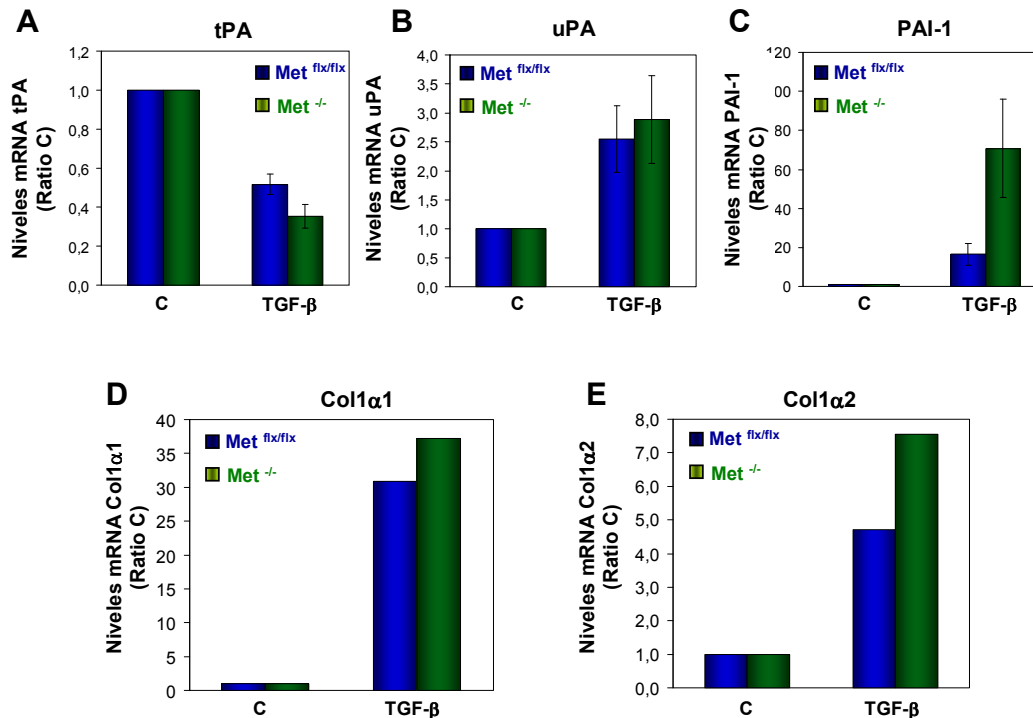


**Figura 23.** Efecto del TGF- $\beta$  sobre la expresión de factores de transcripción implicados en la transición epitelio-mesénquima en células ovasles  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$ . Análisis de los niveles de transcrito de los factores de transcripción SNAI1 (A), SNAI2 (B), ZEB1 (C) y ZEB2 (D) mediante RT-PCR cuantitativa. Las células ovasles se cultivaron en ausencia de FBS y se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. Se representan la media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes, realizados por triplicado. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$

En conjunto, los resultados mostrados en los apartados 3.1 y 3.2 demuestran con claridad que el TGF- $\beta$  induce un proceso de transición epitelio-mesénquima en células ovasles, tanto  $Met^{flx/flx}$  como  $Met^{-/-}$ , lo que indica que la presencia o ausencia de un receptor Met funcional no afecta a dicho proceso.

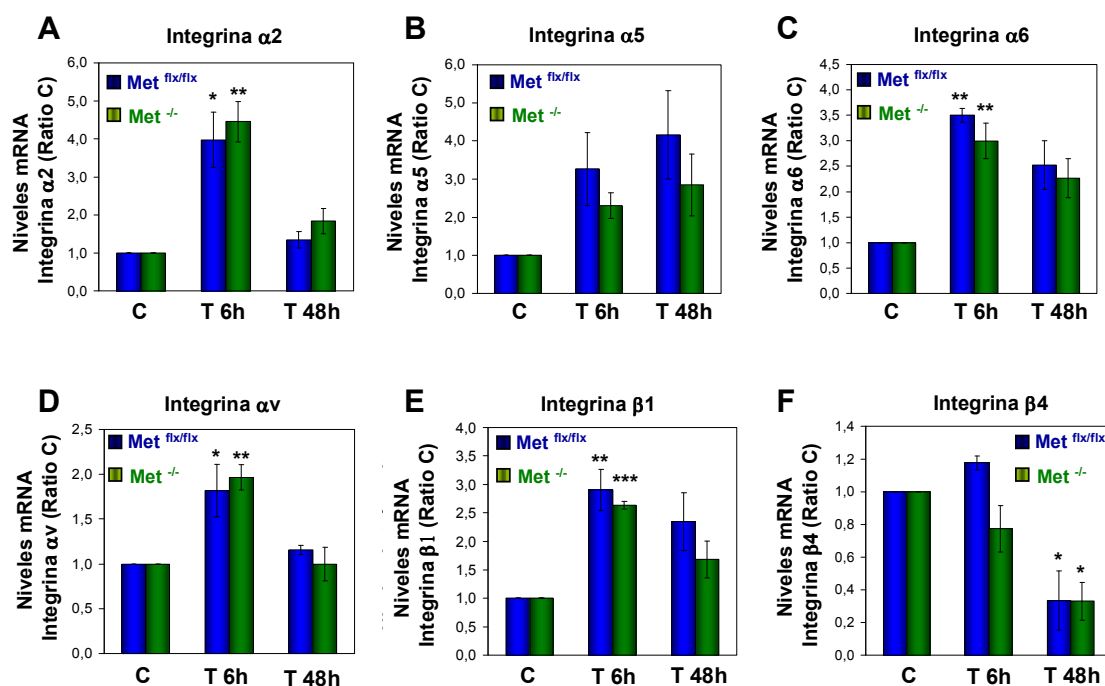
### 3.3. Efecto del TGF- $\beta$ en la expresión de proteínas de la matriz extracelular y de integrinas.

Una vez establecida con firmeza la capacidad de las células ovas de sufrir EMT en respuesta al TGF- $\beta$ , decidimos analizar los cambios que este proceso produce en relación con la matriz extracelular (ECM), ya que una de las características adquiridas por las células que han sufrido EMT es la capacidad de remodelar la matriz que las rodea, que a su vez se relaciona con un aumento de la capacidad invasiva y migratoria. La remodelación de la matriz extracelular implica la necesidad de regular proteínas implicadas en su degradación (MMPs y proteínas del sistema plasminógeno-plasmina como uPA y PAI-1) y de aumentar la expresión de proteínas formadoras de una matriz fibrilar (fibronectina, colágeno tipo I y laminina5) [Zeisberg y Neilson, 2009]. Como consecuencia, las células que han sufrido EMT pasan de estar unidas a una membrana basal a estar rodeadas de una matriz extracelular fibrilar y se produce un cambio en el perfil de expresión de distintas integrinas, reflejo de una alteración de las interacciones célula-matriz extracelular. Para estudiar si estos fenómenos podían acompañar el proceso de EMT en células ovas tratadas con TGF- $\beta$  1 ng/ml, se analizó mediante RT-PCR cuantitativa los niveles de transcritos de proteínas del sistema plasminógeno-plasmina, colágeno tipo I y distintas subunidades de las integrinas. Los resultados mostrados en la Fig. 24 demuestran que el TGF- $\beta$  altera la expresión de proteínas del sistema plasminógeno-plasmina en células ovas. Así, disminuye la expresión del activador del plasminógeno tPA (tissue type Plasminogen Activator) (Fig. 24A) e induce la expresión de PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) (Fig. 24C) y del activador de plasminógeno uPA (urokynase type Plasminogen Activator) (Fig. 24B). Así mismo, el TGF- $\beta$  induce en células ovas un aumento de la transcripción de los genes que codifican para el colágeno fibrilar tipo I: col1 $\alpha$ 1 y col1 $\alpha$ 2 (Fig. 24D y 24E).



**Figura 24.** Efecto del TGF- $\beta$  sobre la expresión génica de proteínas de la matriz extracelular en células ovas *Met<sup>flx/flx</sup>* y *Met<sup>-/-</sup>*. Análisis de los niveles de transcrito de tPA (A), uPA (B), PAI-1 (C), col1 $\alpha$ 1 (D) y col1 $\alpha$ 2 (E) mediante RT-PCR cuantitativa. Las células ovas se cultivaron en ausencia de FBS y se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante 24 horas. En (A, B, C) se representa la media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes, realizados por triplicado. En (E, F) se representa un experimento representativo de dos realizados.

Las integrinas son heterodímeros constituidos por distintas combinaciones de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  y participan en la unión de la célula con la matriz extracelular. Como se puede ver en la Fig. 25, el TGF- $\beta$  aumenta significativamente los niveles de transcrito de las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha v$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 1$ . La subunidad  $\alpha 5$  tiende a aumentar su expresión en respuesta al TGF- $\beta$ , pero en este caso las diferencias con el control no son estadísticamente significativas. Por último y a diferencia de las subunidades antes mencionadas ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$  y  $\beta 1$ ), que muestran una inducción temprana, el TGF- $\beta$  reprime de manera tardía (a 48 horas) la expresión de la subunidad  $\beta 4$ . En conjunto estos resultados indican que en células ovas el TGF- $\beta$  induce alteraciones en la expresión de proteínas implicadas en la degradación proteolítica de matriz extracelular, integrinas y proteínas de matriz, sugiriendo cambios en la capacidad de las células para remodelar la matriz y en las interacciones célula-matriz extracelular.

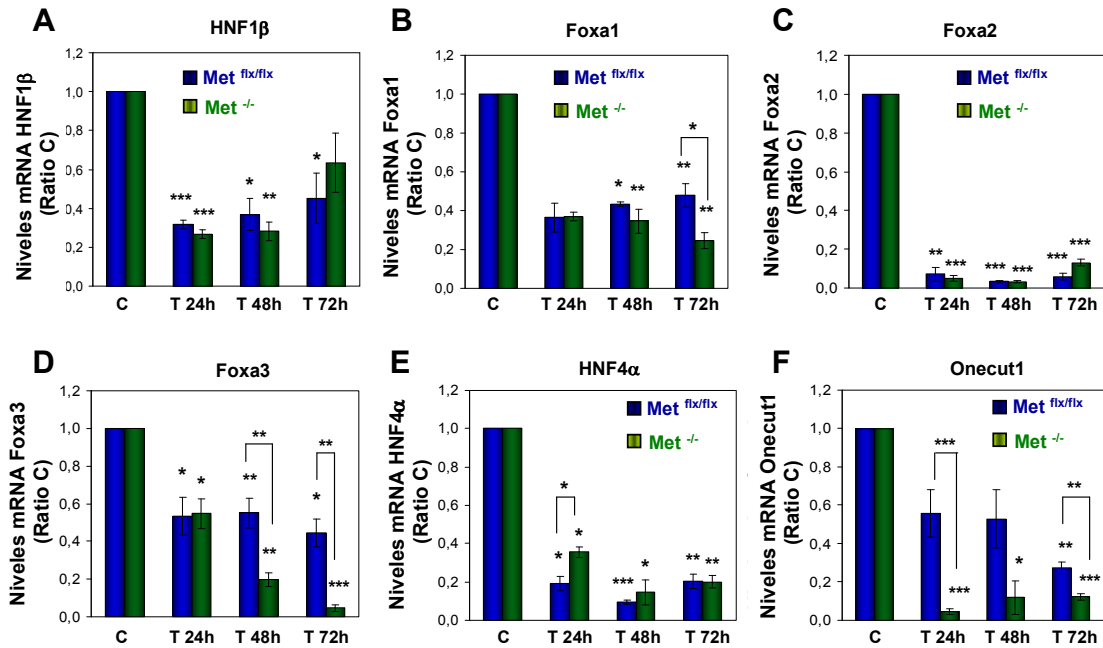


**Figura 25.** Efecto del TGF- $\beta$  sobre la expresión génica de distintas subunidades de las integrinas en células ovas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$ . Análisis de los niveles de transcrito de las subunidades  $\alpha 2$  (A),  $\alpha 5$  (B),  $\alpha 6$  (C),  $\alpha v$  (D) y  $\beta 1$  (E) y  $\beta 4$  (F) mediante RT-PCR cuantitativa. Las células ovas se cultivaron en ausencia de FBS y se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml (T) durante los tiempos indicados. Se representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, realizados por triplicado. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$

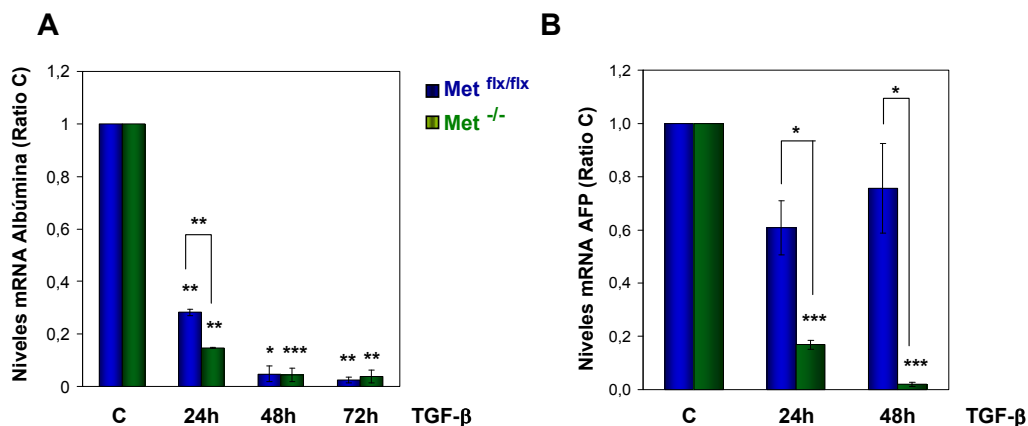
### 3.4. Efecto del TGF- $\beta$ en el estado de diferenciación de las células ovas $Met^{flx/flx}$ y $Met^{-/-}$

Resultados anteriores de nuestro grupo han demostrado que en hepatocitos fetales de rata que han sufrido EMT (línea T $\beta$ T-FH), el proceso de EMT va acompañado de una desdiferenciación, evidenciada mediante la pérdida de expresión de los factores de transcripción HNF1 $\alpha$ , HNF1 $\beta$  y HNF4, implicados en la expresión de proteínas específicas de hígado, como albúmina y alfafetoproteína (AFP) [Valdés et al., 2002]. Por tanto, nos propusimos investigar si también en células ovas la EMT inducida por TGF- $\beta$  induce un proceso de desdiferenciación y para ello estudiamos las

variaciones en la expresión de distintos factores de transcripción de la familia de los HNF en respuesta al TGF- $\beta$ , mediante RT-PCR cuantitativa. Como se puede observar en la Fig. 26, en general el TGF- $\beta$  reprime la expresión de todos los HNFs estudiados. En ambas líneas celulares, la expresión de Foxa2 se pierde casi por completo. La pérdida de expresión de Onecut-1, Foxa3 y, en menor medida Foxa1, es más intensa en células ovasales Met<sup>-/-</sup> que en Met<sup>flx/flx</sup>, revelando que el bucle autocrino de HGF impide la represión de estos tres genes llevada a cabo por el TGF- $\beta$ . En el caso de HNF4 $\alpha$ , la expresión disminuye aproximadamente un 80% en ambas líneas celulares a 72 horas, aunque la caída parece más rápida en células Met<sup>flx/flx</sup>.



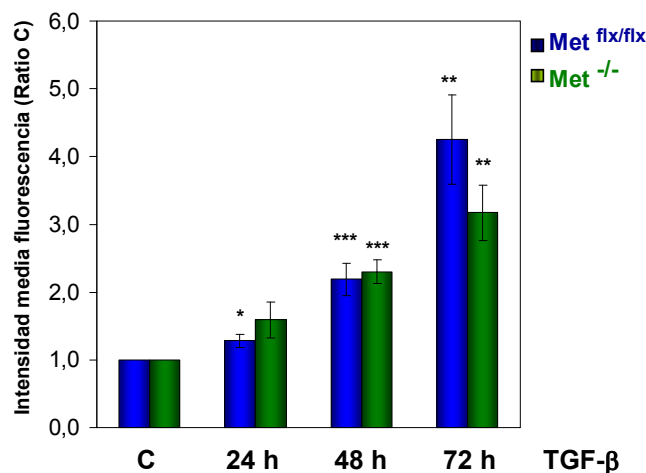
**Figura 26.** Efecto del TGF- $\beta$  sobre la expresión de distintos factores de transcripción HNF en células ovasales Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup>. Análisis de los niveles de transcrito de HNF1 $\beta$  (A), Foxa1 (B), Foxa2 (C), Foxa3 (D), HNF4 $\alpha$  (E) y Onecut-1 (F) mediante RT-PCR cuantitativa. Las células ovasales se cultivaron en ausencia de FBS y se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. Se representa la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, realizados por duplicado. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.



**Figura 27.** Efecto del TGF- $\beta$  sobre la expresión de albúmina y alfafetoproteína (AFP) en células ovasales Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup>. Análisis de los niveles de transcrito de albúmina (A) y alfafetoproteína (B) mediante RT-PCR cuantitativa. Las células ovasales se cultivaron en ausencia de FBS y se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados. Se representa la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, realizados por duplicado. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001

Para profundizar en el efecto del TGF- $\beta$  en el estado de diferenciación de células ovas, estudiamos también mediante RT-PCR cuantitativa la expresión de dos proteínas específicas de linaje hepático: albúmina y AFP. El TGF- $\beta$  disminuye casi totalmente los niveles de transcrito de albúmina en ambas líneas celulares (Fig. 27A) a 48 y 72 horas y se ven diferencias significativas entre líneas a 24 horas. En cambio, los niveles de AFP no disminuyen de manera significativa en células ovas  $Met^{flx/flx}$  por efecto del TGF- $\beta$ , mientras que sí lo hacen en células  $Met^{-/-}$  (Fig. 27B).

Los resultados de las Figs. 26 y 27 indican que el TGF- $\beta$  induce en células ovas un proceso de desdiferenciación reprimiendo la expresión de distintos HNFs y de albúmina y AFP y que el bucle autocrino de HGF se opone a estos efectos, impidiendo la represión transcripcional de *Foxa1*, *Foxa3*, *Onecut 1* y AFP disparada por el TGF- $\beta$ . Este proceso de desdiferenciación que se observa en células ovas acompañando la EMT inducida por TGF- $\beta$  sugiere que estas células podrían estar sufriendo un paso atrás en el compromiso hacia el linaje hepático, lo que las llevaría a adquirir un mayor carácter progenitor. Para comprobar esta hipótesis, estudiamos la expresión de marcadores de células madre/progenitoras, como *Nanog*, *Oct-4* y *nestina*. Mediante RT-PCR cuantitativa no se pudo detectar la expresión de *Nanog* ni de *Oct4*, ni en presencia ni en ausencia de TGF- $\beta$ . La expresión de *nestina* se determinó mediante citometría de flujo, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Como se puede ver en la Fig. 28, el TGF- $\beta$  indujo de manera significativa la expresión de *nestina* en ambos tipos celulares a 48 y 72 horas.

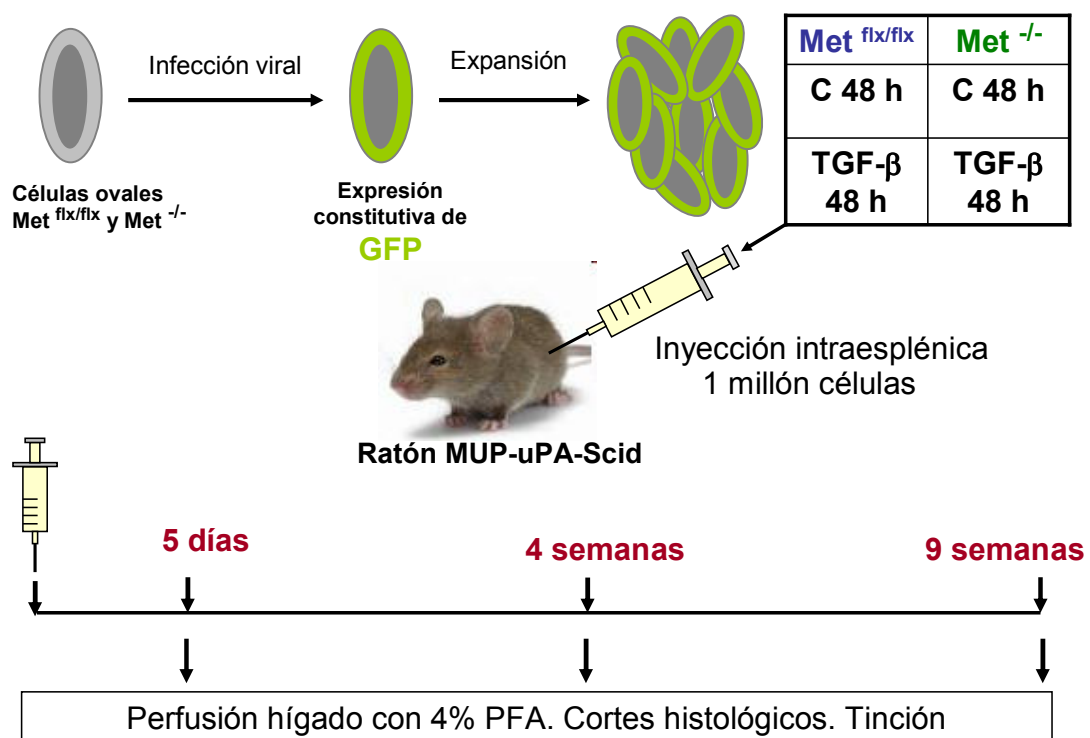


**Figura 28.** Efecto del TGF- $\beta$  sobre la expresión de *nestina* en células ovas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$ . Análisis de la expresión de *nestina* mediante citometría de flujo. Las células se trataron con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante los tiempos indicados y posteriormente se incubaron con anticuerpo primario anti-*nestina* y anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 488. La intensidad de fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo. Se representa la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, realizado por duplicado. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$

### 3.5 Efecto del TGF- $\beta$ en la integración de células ovas murinas en hígado tras trasplantes *in vivo*.

Como hemos visto hasta el momento, las células ovas  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  sufren EMT en respuesta al TGF- $\beta$  y como consecuencia de este proceso se desdiferencian y adquieren un carácter progenitor más temprano. Con el fin de analizar si este cambio

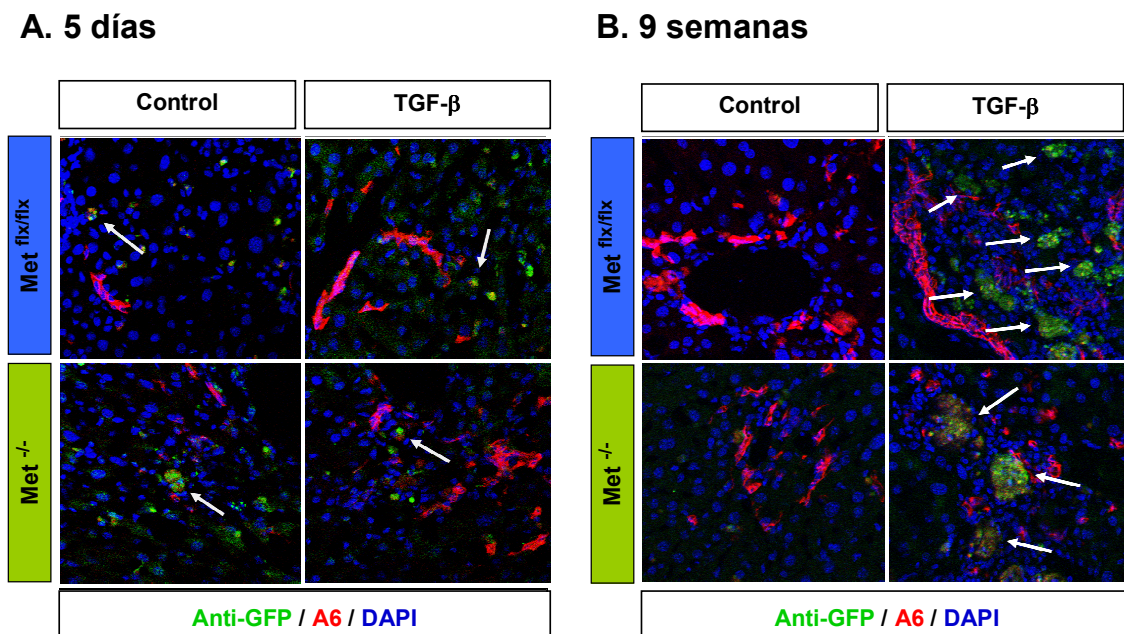
fenotípico afecta a la capacidad de las células ovales de integrarse y regenerar un hígado dañado tras ser trasplantadas *in vivo*, utilizamos el diseño experimental cuyo esquema se resume en la Fig. 29. Para poder visualizar las células y su destino después del trasplante, se generaron mediante infección viral líneas de células ovales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  que expresaban de manera constitutiva la proteína verde fluorescente GFP. Estas líneas celulares se expandieron y se dividieron en 4 grupos: (a) células  $Met^{flx/flx}$ -GFP+ sin tratar, (b) células  $Met^{flx/flx}$ -GFP+ tratadas durante 48 horas con TGF- $\beta$ , (c) células  $Met^{-/-}$ -GFP+ sin tratar y (d) células  $Met^{-/-}$ -GFP+ tratadas durante 48 horas con TGF- $\beta$ . El trasplante se realizó mediante inyección intraesplénica de 1 millón de células de cada uno de estos 4 grupos en ratones MUP-uPa-SCID (ratones inmunodeficientes aptos para trasplantes y modelo de daño hepático crónico). Los animales se sacrificaron a los 5 días, 4 semanas y 9 semanas después del trasplante, los hígados se fijaron según el protocolo descrito en Material y Métodos (apartado 7.2), y se realizaron tinciones inmunohistoquímicas con dos anticuerpos: anticuerpo A6 (que reconoce un antígeno presente tanto en células ovales como en colangiocitos) marcado en rojo y anticuerpo anti-GFP marcado en verde.



**Figura 29.** Esquema del diseño experimental de los trasplantes *in vivo* de células ovales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  tratadas o no con TGF- $\beta$ .

Como se puede ver en la Fig. 30A, 5 días después del trasplante se observa, en todos los grupos experimentales, un número bajo de células que presentan un doble marcaje rojo-verde, correspondientes a células ovales trasplantadas que han logrado integrarse en el parénquima hepático de los animales receptores. Sin embargo, las observaciones más interesantes corresponden a los cortes histológicos realizados en los hígados correspondientes a 9 semanas post-trasplante (Fig. 30B). A este tiempo, en los cortes histológicos de los hígados receptores de células control (tanto  $Met^{flx/flx}$  como  $Met^{-/-}$ ) prácticamente no se observan células con expresión de GFP (células exógenas). Sin embargo, en los animales trasplantados con células

tratadas con TGF- $\beta$ , se observan focos de células que expresan GFP, lo que sugiere la persistencia de colonias de células repobladoras a largo plazo. Estas observaciones preliminares parecen indicar que las células ovasales que han sufrido transición epitelio-mesénquima por efecto del TGF- $\beta$  presentan ventajas en la integración y repoblación del parénquima hepático sobre las células ovasales control tras ser trasplantadas *in vivo* en un modelo de daño hepático crónico. Dada la relevancia que este hecho podría tener en la regeneración hepática, estos resultados preliminares son muy prometedores y merecen una mayor exploración y un análisis más cuantitativo y detallado en el futuro.



**Figura 30.** Efecto del tratamiento de células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  con TGF- $\beta$  en la integración y repoblación del parénquima hepático tras trasplante *in vivo*. Detección mediante microscopía confocal de la localización en el parénquima hepático de células ovasales a los 5 días (A) y 9 semanas (B) posteriores a su trasplante. Células ovasales que expresan de manera constitutiva GFP se trataron o no con TGF- $\beta$  1 ng/ml durante 48 horas y se trasplantaron en ratones MUP-uPA-SCID mediante inyección intraesplénica. Para la visualización de la integración celular y repoblación del hígado, se realizaron cortes histológicos que se utilizaron para ensayos inmunohistoquímicos con anticuerpos específicos para la detección de GFP (verde) y A6 (rojo). Se muestra un experimento representativo.

**VI.**

---

**Discusión**



## 1. Relevancia de la vía de señalización EGF-EGFR en la biología de las células ovas.

La relevancia de la señalización mediada por el EGFR en el hígado es conocida desde hace tiempo, pues tanto el EGFR como sus ligandos juegan un papel importante en la respuesta proliferativa que acompaña a la regeneración hepática tras hepatectomía parcial [revisado por Michalopoulos, 2007]. En concordancia con su papel inductor de proliferación en células hepáticas *in vivo*, nuestro grupo ha demostrado previamente que el EGF induce una respuesta proliferativa en hepatocitos *in vitro* [de Juan et al., 1992]. Más recientemente, gracias a la generación de un modelo de ratón deficiente en el EGFR en hígado, se demostraba un papel esencial para la señalización mediada por el EGFR en la regeneración hepática, de forma que los ratones que carecen de EGFR muestran un retraso en la regeneración hepática debido a una reducción en la proliferación de los hepatocitos a su vez causada por una deficiencia en la progresión del ciclo celular [Natarajan et al., 2007]. Si bien la relevancia del EGFR en la proliferación de hepatocitos está bien establecida, se dispone de escasos datos en la literatura respecto a su papel en la respuesta mitogénica de las células ovas. A este respecto, el hecho de que la infusión de TGF- $\alpha$  aumente la proliferación *in vivo* de las células ovas inducida por tratamiento con 2-AAF/PH [Nagy et al., 1996] sugiere que la señalización por el EGFR es también un importante regulador de la proliferación de las células progenitoras durante la regeneración hepática. No obstante, aún se desconoce el impacto que tiene la anulación de la señalización por EGFR en la regeneración hepática mediada por células progenitoras. Mediante ensayos *in vitro*, nuestros resultados corroboran las observaciones *in vivo* y establecen que el EGFR es un importante inductor de proliferación no sólo en hepatocitos, sino también en células progenitoras de hígado adulto, pues demuestran que el EGF exógeno produce un aumento significativo de la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en células ovas (Fig. 1), observándose además que su efecto inductor de proliferación es significativamente más potente que el de otro conocido mitógeno de células hepáticas, el HGF [ver también del Castillo et al., 2008a].

Los niveles de transcrito de TGF- $\alpha$  son indetectables o muy bajos en hígado normal o hepatocitos no replicativos, pero aumentan tras una hepatectomía parcial o un daño tóxico [Mead y Fausto, 1989, Weber et al., 1993] así como en células ovas proliferantes y en focos basofílicos de hepatocitos en hígado regenerante inducido por un protocolo Solt-Farber modificado [Evarts et al., 1992]. Esta capacidad de los hepatocitos y las células ovas de aumentar la expresión de TGF- $\alpha$  tras estímulos que inducen regeneración, junto con la anteriormente mencionada capacidad del EGFR y el TGF- $\alpha$  para inducir proliferación en hepatocitos y células ovas, sugiere la existencia de una regulación autocrina del EGFR. Nuestros resultados son la primera evidencia directa de una acción autocrina de los ligandos del EGFR en células ovas no tumorigénicas. La existencia de una regulación autocrina del EGFR queda evidenciada por la expresión constitutiva de los ligandos del EGFR y la activación constitutiva del EGFR (Fig. 3), así como por la disminución de la tasa de proliferación basal y el aumento de la apoptosis tras la inhibición de la actividad quinasa del EGFR usando el inhibidor químico AG1478 (Fig. 4). Merece la pena destacar que el AG1478 inhibe casi totalmente la proliferación basal (Fig. 4A), respuesta similar a la observada en células de hepatoma [Ortiz et al., 2008]. También se han descrito resultados similares en hepatocitos adultos de rata [Scheving et al., 2002] utilizando PKI166, un inhibidor dual de EGFR/ErbB2, aunque el efecto inhibitor observado en este trabajo no es tan fuerte como el que muestran nuestros resultados en células ovas usando AG1478. Aún más importante es el hecho de que el potente efecto inhibitor del AG1478 sobre la proliferación basal de las células ovas se observa tanto en células Met $^{-/-}$  (sin actividad tirosina quinasa de Met) como en células Met $^{\text{flx/flx}}$  (con actividad

tirosina quinasa de Met), indicando que Met no es capaz de contrarrestar este efecto del AG1478. Este hecho, unido a resultados previos de nuestro grupo que demuestran que la falta de actividad tirosina quinasa de Met no afecta a la proliferación de células ovas (del Castillo et al., 2008a), sugieren un papel clave para el EGFR en la regulación de la proliferación de las células ovas.

La señalización dependiente del EGFR integra señales proliferativas y de supervivencia en hepatocitos. De hecho, trabajos de distintos grupos, entre ellos el nuestro, han demostrado que, en hepatocitos, el EGF no sólo induce proliferación [de Juan et al., 1992] sino que también tiene un efecto protector frente a varios estímulos pro-apoptóticos, como el TGF- $\beta$ , Fas y el ácido desoxicólico [Fabregat et al., 1996; Musallam et al., 2001, Qiao et al., 2001]. Además, el EGFR es activado por el TGF- $\beta$  y es necesario para la inducción por TGF- $\beta$  de señales anti-apoptóticas como Akt [Murillo et al., 2005], formando parte del mecanismo inducido por TGF- $\beta$  para conferir resistencia a la apoptosis en hepatocitos fetales tras un proceso de EMT [del Castillo et al., 2006]. En concordancia con estos datos, en este trabajo observamos que el AG1478 aumenta el índice apoptótico de células ovas tras privación de suero y tratamiento con TGF- $\beta$  (Fig. 4B y 4D). Aunque no hemos explorado en detalle el mecanismo implicado en la señalización antiapoptótica autocrina de las células ovas, datos preliminares de nuestro grupo indican un notable descenso de los niveles del mRNA de TGF- $\alpha$  tras tratamiento con AG1478 (datos no mostrados), 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. Por otra parte, los menores niveles de apoptosis mostrados por las células Met<sup>fix/fix</sup> privadas de suero en presencia de AG1478 (Fig. 4B) respecto a las células ovas Met<sup>-/-</sup> en las mismas condiciones son consistentes con una señalización pro-supervivencia dependiente de Met [del Castillo et al., 2008a], y sirven como prueba adicional de la capacidad de la señalización disparada por Met para restringir la respuesta apoptótica a la ausencia de suero en células ovas. Debe señalarse que, a diferencia del tratamiento con AG1478, el silenciamiento de EGFR no provocó una amplificación de la respuesta apoptótica de las células ovas (Fig. 10B). Este resultado no es en absoluto sorprendente, ya que nuestro grupo ha descrito recientemente que el AG1478 tiene efectos más amplios que el silenciamiento del EGFR sobre la apoptosis de células de carcinoma hepatocelular [Caja et al., 2011b]. Estas observaciones ponen de manifiesto que el AG1478 puede tener a la vez efectos dependientes e independientes de EGFR, y dejan la puerta abierta a futuros estudios para explorar dianas adicionales, incluyendo otros miembros de la familia de receptores ErbB. En conjunto, los resultados anteriores constituyen una evidencia de que tanto el HGF como los ligandos del EGF regulan la proliferación y supervivencia de las células ovas de manera autocrina. Al mismo tiempo, subrayan funciones no redundantes para la señalización autocrina del EGFR y Met en la proliferación y supervivencia. Mientras que el EGFR parece más importante para la proliferación, ambos RTKs podrían cooperar para proteger a las células contra los estímulos apoptóticos. Sin embargo, Met parece tener efectos únicos en promover la supervivencia celular, lo que podría explicar porque el EGFR no es capaz de proteger de la pérdida de Met.

Es de particular interés el hecho de que el EGF sea capaz de contrarrestar la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  tanto en células Met<sup>fix/fix</sup> como en células Met<sup>-/-</sup> (Fig. 11). Estos datos sugieren indirectamente que la señalización anti-apoptótica mediada por EGFR en las células ovas es independiente de la actividad tirosina quinasa de Met. La posibilidad de una interacción cruzada entre Met y el EGFR y las consecuencias funcionales derivadas de esta interacción han sido un tema importante de debate durante muchos años. Hasta el momento se han descrito diferentes mecanismos que median una interacción cruzada entre ambos receptores y que incluyen interacción física entre ambos receptores, transactivación de receptores mediada por ligandos o

inducción de la transcripción génica de ligandos [Lai et al., 2009]. En este estudio, hemos indagado en la posibilidad de que uno o varios de estos mecanismos operen en las células ovas. Resultados preliminares de nuestro grupo (ver Antecedentes) habían demostrado que en células ovas el EGFR es activado por EGF pero no por HGF y que Met es activado por HGF pero no por EGF, lo que indica que no se produce una transfosforilación inducida por ligando entre Met y EGFR. Además, en este trabajo demostramos que la inhibición de la actividad quinasa del EGFR mediante AG1478 o el silenciamiento del gen de EGFR utilizando siRNA no tienen efecto en la activación mediada por HGF de las moléculas de señalización dianas de Met (Fig.7 y Fig.8). Estos resultados concuerdan con datos obtenidos en hepatocitos primarios de rata que muestran que sólo el HGF pero no el EGF produce la fosforilación de Met y que la inhibición del EGFR no afecta a la activación de Met inducida por HGF [Scheving et al., 2002]. Sin embargo, a diferencia de las células ovas, tanto la inhibición de la actividad del EGFR [Scheving et al., 2002] o de la síntesis y actividad del TGF- $\alpha$  [Tomiya et al., 2000] bloquean los efectos mitogénicos del HGF en los hepatocitos. Esto, junto con resultados que indican la capacidad del HGF para inducir la transcripción del mRNA de TGF- $\alpha$  en células HepG2 [Shiota et al., 1994], sugiere que en hepatocitos normales y tumorales, el HGF podría promover la proliferación en una manera dependiente del EGFR a través de la producción de ligandos del EGFR. Una interacción cruzada similar, dependiente de la transcripción, entre Met y EGFR se ha establecido en varios tipos celulares, incluyendo células malignas y no transformadas [Spix et al., 2007, Reznik et al., 2008], siendo necesaria para la inducción de proliferación y motilidad. Nuestro trabajo demuestra que este mecanismo no opera en células ovas, ya que, a pesar de que los resultados sugieren que el eje de señalización HGF/Met regula la expresión de TGF- $\alpha$  (Fig 3A y Fig.6), se observa que ni la señalización (Fig. 7A y Fig. 8A) ni las actividades mitogénica y antiapoptótica mediadas por el eje HGF/Met necesitan del EGFR (Fig. 9 y Fig. 10). Por tanto, estos resultados descartan que el EGFR intervenga en los efectos mediados por el HGF en células ovas. En conjunto, estos hallazgos ponen de relieve que la interacción cruzada entre EGFR y Met y los mecanismos que median esta interacción son dependientes del tipo celular y del contexto, revelando una enorme plasticidad de los mecanismos de señalización celular, lo que permite a las células ajustarse a un ambiente en continuo cambio. Adicionalmente, a pesar de que la interacción cruzada entre Met y EGFR parece jugar un papel prevalente en oncogénesis, podría también ser relevante en algunos contextos particulares no tumorigénicos, como son el desarrollo embrionario, la homeostasis tisular y la regeneración, donde la interacción cruzada entre redes de señalización podría ser crucial para el control de la proliferación, supervivencia y motilidad y en último término para la ejecución exitosa de cualquiera de estos procesos. La causa por la que en células ovas el HGF no usa el EGFR como colaborador en la señalización proliferativa o antiapoptótica permanece sin esclarecer. Ciertamente, la comunicación entre estos dos receptores podría ser beneficiosa ya que proporcionaría plataformas adicionales de señalización para el control de la respuesta y el destino celular. Una posibilidad es que el EGFR tenga un papel menos central en la regulación de las células ovas del que tiene en hepatocitos y otras células epiteliales. También es posible que Met tenga, en células ovas, otras parejas preferidas, entre las múltiples proteínas de membrana con las que puede interactuar [Lai et al., 2009]. Por otra parte, el hecho de que el HGF no necesite la activación de la actividad quinasa del EGFR para promover sus acciones puede ser visto como una señal de un papel más dominante para Met en las células ovas, siendo capaz de disparar respuestas celulares sea el EGFR funcional o no.

Es posible que la interacción cruzada entre EGFR y Met pudiera adquirir relevancia en células transformadas, donde podría ser un mecanismo importante para amplificar la señalización mediada por ambos RTKs, contribuyendo a la transformación celular. De acuerdo con esto, la sobreexpresión de TGF- $\alpha$  en células epiteliales de

hígado de rata no transformadas (RLEC) y clones tumorales derivados de ellas produce la fosforilación de Met en ausencia de HGF [Presnell et al., 1997]. De manera similar, líneas celulares tumorales de hepatocarcinoma y de otros orígenes muestran una fosforilación constitutiva de Met, efecto que es inhibido mediante anticuerpos neutralizantes contra el TGF- $\alpha$  y/o EGFR o mediante tratamiento con AG1478 [Jo et al., 2000]. A diferencia de las células ovasales, la fosforilación constitutiva de Met en líneas celulares de HCC no parece estar asociada con la expresión del transcrito del HGF, sino más bien con la expresión autocrina de TGF- $\alpha$ . Éste y otros estudios establecen una relación directa entre la malignización de las células ovasales y la señalización autocrina, la interacción cruzada entre receptores y la alteración en la respuesta a factores de crecimiento. En consonancia con esta idea, se han identificado bucles autocrinos de HGF y TGF- $\alpha$  en células ovasales de rata transformadas y se ha comprobado que la presencia de estos bucles autocrinos confieren propiedades tumorigénicas [Laird et al., 1994; Isfort et al., 1998; Presnell et al., 1998]. Por el contrario, cuando en la línea de células ovasales LE6 (no tumorigénica) se moduló la expresión de Myc, TGF- $\alpha$  o la combinación de ambas, se encontró que sólo las células ovasales transfectadas con Myc y Myc/TGF- $\alpha$ , pero no las células ovasales que expresan únicamente TGF- $\alpha$ , desarrollan tumores cuando son inyectadas en ratones desnudos [Cheung et al., 2007]. Además, nuestros resultados también han demostrado que las células ovasales muestran una activación autocrina de Met y sin embargo no muestran ningún signo de transformación [del Castillo et al., 2008a]. Por tanto, parece que los bucles autocrinos de TGF- $\alpha$ /EGFR y HGF/Met no son suficientes para promover la transformación de células ovasales. Sin duda, podrían ser una característica común en células epiteliales inmaduras transformadas y contribuir al crecimiento de las células tumorales hepáticas, pero la transformación neoplásica necesita otros elementos adicionales.

En conclusión, en células ovasales los receptores EGFR y Met controlan respuestas biológicas comunes, como la mitogénesis y protección contra apoptosis. Además, nuestros resultados indican que el EGFR parece mediar la proliferación de manera más eficiente y relevante que Met, mientras Met parece tener efectos únicos y prevalentes como señal pro-supervivencia, sugiriendo que las respuestas inducidas por la activación de estos dos RTKs no son completamente solapantes. Además, aunque nuestros resultados no pueden descartar que el EGFR y Met puedan actuar de manera cooperativa y/o coordinada para promover estas actividades en contextos específicos, muestran que ninguno de los dos RTKs dependen de la actividad del otro. Quedan abiertas importantes cuestiones respecto a la posibilidad de que la interacción EGFR-Met pueda ser activada tras la transformación de las células ovasales y contribuir al desarrollo o progresión del HCC. Ciertamente, la falta de interacción entre RTKs podría constituir un mecanismo de seguridad para proteger las células ovasales de la transformación maligna.

## 2. Protección por HGF autocrino frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ en células ovas.

El TGF- $\beta$  es un conocido inductor de apoptosis en células hepáticas. Durante la regeneración hepática mediada por hepatocitos, el TGF- $\beta$  limita la respuesta regenerativa inhibiendo la proliferación de los hepatocitos pero también induciendo apoptosis [Fausto et al., 2006]. Nuestro grupo, y otros, han demostrado la capacidad del TGF- $\beta$  de inducir apoptosis *in vitro* en distintas células hepáticas, como hepatocitos fetales, adultos y regenerantes y células de hepatoma Hep3B [Oberhammer et al., 1992; de Juan et al., 1992a; Fabregat et al., 1996; Sánchez et al., 1996; Sánchez et al., 1999; Herrera et al., 2001a; Carmona-Cuenca et al., 2008]. El TGF- $\beta$  también tiene efectos inhibitorios en células progenitoras hepáticas. De hecho, la sobre-expresión de TGF- $\beta$  en hígado conduce a una disminución en la expansión de la población de células ovas inducida por la dieta DDC [Preisegger et al., 1999]. En concordancia con estas observaciones *in vivo*, nosotros hemos demostrado que el TGF- $\beta$  induce apoptosis e inhibe la proliferación en células ovas *in vitro* [del Castillo et al., 2008a], apoyando un papel citostático y citotóxico para el TGF- $\beta$  en células progenitoras hepáticas. Sin embargo, hay que mencionar que el análisis comparativo entre células progenitoras adultas hepáticas y hepatocitos ha puesto en evidencia que las células progenitoras son más resistentes a los efectos antiproliferativos y proapoptóticos inducidos por TGF- $\beta$  tanto *in vitro* como *in vivo* [Clark et al., 2005; Nguyen et al., 2007]. De hecho, se ha propuesto que estas diferencias en la sensibilidad al TGF- $\beta$  entre células progenitoras y hepatocitos maduros podrían suponer una ventaja selectiva para las células progenitoras *in vivo* en condiciones de daño hepático. Existen diferentes mecanismos que podrían explicar esta respuesta diferencial, entre ellos la posible sobre-activación de señales de supervivencia en células progenitoras como consecuencia de la producción autocrina de factores de crecimiento/supervivencia, como el HGF. En este sentido, nosotros también hemos demostrado que el HGF tiene un efecto protector frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  [del Castillo et al., 2008a]. Así, el pretratamiento con HGF exógeno disminuye significativamente la muerte inducida por TGF- $\beta$  en las células ovas. Además, las células ovas tienen un bucle autocrino de HGF, de manera que incluso en ausencia de HGF exógeno las células ovas  $Met^{flx/flx}$  presentan una mayor resistencia que las células ovas  $Met^{-/-}$  frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ .

Con objeto de estudiar con más detalle el mecanismo por el cual el eje HGF/Met protege de la muerte por TGF- $\beta$ , en primer lugar estudiamos si el HGF podría interferir o modular de alguna manera la señalización disparada por esta citoquina, ya que se había descrito que el HGF puede afectar a la señalización mediada por Smads en distintos tipos celulares y a través de distintos mecanismos. Estos mecanismos incluyen la regulación negativa de la translocación y acumulación en el núcleo de las proteínas Smad2/3 activadas [Yang, Dai y Liu, 2003a], inducción de la expresión de decorina, una proteína que puede secuestrar TGF- $\beta$  [Kobayashi et al., 2003], estabilización del co-represor transcripcional de Smads TGIF [Dai y Liu 2004] y aumento de la expresión del co-represor SnoN [Yang, Dai y Liu, 2003b]. Sin embargo, nuestros datos parecen descartar que el HGF autocrino interfiera con la señalización mediada por Smads, ya que la falta de un receptor Met activo no afecta a la fosforilación de Smad2, ni a su translocación al núcleo o su actividad transcripcional (Fig.12). Además de la señalización mediada por Smads o vía canónica, nuestros resultados demuestran la activación de las quinasas Akt, ERK1/2, JNKs y p38 en células ovas tratadas con TGF- $\beta$  (Fig.13A) constituyendo la primera evidencia de que el TGF- $\beta$  induce vías de señalización no canónicas en células progenitoras. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el patrón de activación de Akt

y ERK1/2, para las cuales se ha descrito un papel regulador negativo sobre la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en distintos sistemas celulares, incluidas células tumorales hepáticas [Park et al., 2002; Caja et al., 2009], lo que descartaría su implicación en la sensibilidad diferencial a apoptosis entre células ovasales Met<sup>fix/fix</sup> y Met<sup>-/-</sup>. En cuanto a p38 y JNK, aunque se ha demostrado que pueden jugar un papel crítico en la inducción de apoptosis por TGF- $\beta$  [Perlman et al., 2001; Hyman et al., 2002; Park et al. 2002; Schuster et al., 2002; Yu et al., 2002], su implicación parece ser dependiente del tipo celular o del contexto en particular. En células hepáticas los datos no son claros. Algunos autores han descrito que p38 y/o JNK son necesarias para la inducción de apoptosis por TGF- $\beta$  en líneas de hepatoma o hepatocitos murinos (AML12) [Yoo et al., 2003; Kim et al., 2004]. Sin embargo, resultados anteriores de nuestro grupo indican que p38, aunque es activada en hepatocitos fetales de manera dependiente de ROS, es completamente dispensable para los fenómenos apoptóticos inducidos por TGF- $\beta$  (disminución de los niveles de Bcl-x<sub>L</sub>, liberación de citocromo c al citosol y pérdida de viabilidad celular) [Herrera et al., 2001c]. Por otra parte, el EGF, que impide la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en hepatocitos fetales, no afecta a la activación de JNK por la citoquina, lo que sirve como una evidencia de que JNK tampoco es esencial para la respuesta apoptótica [Carmona-Cuenca et al., 2006]. Los resultados obtenidos en células ovasales estarían más en consonancia con estas observaciones. Así, los datos presentados en la Fig.13 demuestran que en células ovasales ni p38 ni JNK son requeridas para la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ , puesto que la inhibición química de p38 o JNKs no tuvo efecto en el aumento de la actividad caspasa-3 promovido por TGF- $\beta$ . En resumen, nuestros datos muestran que la activación de Akt, ERK1/2, p38 y JNKs disparada por TGF- $\beta$  no influyen de manera relevante en la respuesta apoptótica inducida por TGF- $\beta$  en células ovasales. Además, parecen descartar que las diferencias en la respuesta apoptótica al TGF- $\beta$  observadas entre líneas Met<sup>fix/fix</sup> y Met<sup>-/-</sup>, se deban a una activación diferencial de estas vías entre ambas líneas celulares. Es posible que estas rutas de señalización activadas por TGF- $\beta$  en células ovasales estén implicadas en otras respuestas celulares a esta citoquina. Uno de los puntos a explorar sería la implicación de las MAPKs en la EMT inducida por TGF- $\beta$ . En este sentido, hay evidencias en la literatura de que la activación de la vía Ras/ERKs [Xie et al., 2004], o p38 y JNKs [Bakin et al., 2002; Yamashita et al., 2008] es necesaria para la inducción de EMT en respuesta a TGF- $\beta$  en distintos tipos de células epiteliales. Experimentos adicionales son necesarios para determinar si esto también ocurre en células ovasales.

En este trabajo hemos realizado un estudio sobre el mecanismo que media la apoptosis desencadenada por el TGF- $\beta$  en células ovasales. Nuestros datos son la primera prueba de que la apoptosis inducida por esta citoquina en células ovasales se desarrolla por la vía mitocondrial. Así, el TGF- $\beta$  induce la despolarización de la membrana mitocondrial (Fig. 14A), la salida del citocromo c al citosol (Fig. 14B) y un aumento de la actividad caspasa-3 (Fig. 14C). Estos resultados están en consonancia con datos previos de nuestro grupo y otros, que han demostrado la implicación de la mitocondria en el proceso de apoptosis inducido por TGF- $\beta$  en distintas células hepáticas, como hepatocitos fetales y adultos de rata y células de hepatoma de rata FaO [Rodrigues et al., 1999; Freathy et al., 2000; Herrera et al., 2001b; Albright et al., 2003]. Las proteínas de la familia Bcl-2 tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad mitocondrial, por lo que su desregulación se considera también indicativa de una implicación de la mitocondria en la muerte celular. Nuestros resultados demuestran claramente que en respuesta al TGF- $\beta$  se induce la expresión de Bim y Bmf, proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, en células ovasales (Fig. 15). El aumento de la expresión de Bim y Bmf en respuesta a TGF- $\beta$  se ha observado previamente en células hepáticas no tumorales (hepatocitos primarios y hepatocitos inmortalizados AML12) y tumorales (células FaO de hepatoma de rata y células Hep3b

de hepatocarcinoma celular humano) [Ramjaun et al., 2007; Caja et al., 2011]; así como en células no hepáticas, como células epiteliales de glándula mamaria NMuMG y células epiteliales gástricas SNU16 [Ohgushi et al., 2005; Ramjaun et al., 2007]. Además, distintos abordajes y modelos experimentales, que incluyen el silenciamiento génico, ha permitido demostrar un papel fundamental para estas proteínas en la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en otros modelos, siendo necesario en algunos casos el silenciamiento de ambas para una protección total frente a la apoptosis [Wildey et al., 2003; Ohgushi et al., 2005; Ramjaun et al., 2007; Ramesh et al., 2008]. Nosotros no hemos llevado a cabo experimentos que nos permitan comprobar de una manera directa si Bim, Bmf o los dos son esenciales para el proceso apoptótico inducido en células ovas por TGF- $\beta$ . Sin embargo, el hecho de que haya una relación estrecha entre los niveles y la cinética de inducción de Bmf y el grado de sensibilidad a apoptosis, que no se observa en el caso de Bim (Fig. 15 y Fig. 19), podría servir como una evidencia de un papel más relevante para Bmf en el proceso apoptótico. Por otra parte, es importante recordar que tanto Bim como Bmf pertenecen a la subfamilia de proteínas BH3-only de la familia de Bcl-2. Esta subfamilia se subdivide a su vez en proteínas “sensibilizadoras y/o des-represoras”, que se unen únicamente a las proteínas anti-apoptóticas e incluyen a Bad, Noxa, Bik, Hrk y Bmf, y “activadores directos” (Bid y Bim), que son capaces de interactuar con las proteínas anti-apoptóticas y efectoras. Se han propuesto diferentes modelos para explicar la dinámica entre las proteínas anti-apoptóticas y las pro-apoptóticas, tanto efectoras como BH3-only, que controla la decisión final de llevar a cabo el proceso de muerte celular [Strasser et al., 2011]. Nuestros resultados indican que el TGF- $\beta$  incrementa la expresión del activador directo Bim y del sensibilizador o des-represor Bmf en células ovas. Aunque no podemos excluir otras hipótesis, estos datos también podrían sugerir que la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en células ovas se ajusta al modelo de des-represión: un activador directo (Bim) interacciona con las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-x<sub>L</sub> no es modulada por TGF- $\beta$ ) y la inducción de un “sensibilizador o des-represor” (Bmf) permite liberar este activador directo para promover la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP= Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). En base a todo esto, es evidente que nuestros resultados dejan abiertas distintas hipótesis y que se necesitan experimentos adicionales para aclarar cual es el papel concreto que juegan estas dos proteínas en la respuesta apoptótica mediada por TGF- $\beta$  en células ovas.

La influencia de los factores de crecimiento en la regulación transcripcional de Bmf es poco conocida. No obstante, se ha descrito que el EGF contrarresta la inducción de su transcripción, ya que en células epiteliales de mama humanas MCF-10A la eliminación del EGF del medio disparaba la inducción de Bmf y además la expresión ectópica de ErbB2 provocó una supresión significativa del aumento de la expresión de Bmf debida a anoikis [Schmelzle et al., 2007]. Nuestros resultados sugieren que la señalización autocrina a través de Met regula negativamente el incremento de la transcripción de Bmf inducida por TGF- $\beta$  en células ovas (Fig. 15). No hay ningún dato en la literatura sobre la posible regulación de Bmf por la vía de señalización de HGF/Met, pero sí de la regulación de otros miembros de la familia. Así, la acción antiapoptótica del HGF en células endoteliales humanas sometidas a hipoxia está asociada con la inducción de la expresión de Bcl-2 [Yamamoto et al., 2001]. En hepatocitos primarios humanos, el HGF protege frente a la apoptosis inducida por el ligando de Fas mediante la inducción de la expresión de Mcl-1 a través de la activación de la vía PI3K/Akt [Shulze-Bergkamen et al., 2004]. Estas observaciones, junto a otras no citadas aquí, han puesto de manifiesto que la acción antiapoptótica de la vía HGF/Met depende en gran medida de su capacidad para inducir la expresión de proteínas antiapoptóticas. Los resultados presentados en este trabajo constituyen la primera evidencia de que la regulación negativa de la expresión de proteínas pro-

apoptóticas, como Bmf, también podría contribuir de forma importante a la acción antiapoptótica mediada por HGF/Met.

El conocimiento de los mecanismos que regulan la inducción de Bim y Bmf por TGF- $\beta$  en células ovasales requiere una mayor investigación, aunque se ha descrito en otros modelos celulares que los ROS son necesarios, pero no suficientes, para la inducción de Bim y Bmf en respuesta a TGF- $\beta$  y varias evidencias indican que su inducción es dependiente de Smads [Willey et al., 2003; Ramjaun et al., 2007; Yu et al., 2008]. Curiosamente, la inhibición de p38 también inhibe de forma muy significativa la inducción de Bmf, y en menor medida de Bim, en hepatocitos de ratón inmortalizados (AML12) [Ramjaun et al., 2007], un modelo en el que a diferencia de lo que ocurre en hepatocitos fetales de rata [Herrera et al., 2001c] o en células ovasales de ratón (Fig. 13) la activación de p38 es necesaria para la respuesta apoptótica inducida por TGF- $\beta$ . Es por tanto, un campo abierto de investigación futura en nuestro laboratorio.

Trabajos previos de varios grupos, incluido el nuestro, han demostrado una importante función de los ROS en la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en distintos tipos celulares [Thannickal y Fanburg, 1995; Sánchez et al., 1996; Herrera et al., 2001a]. Así, en hepatocitos fetales de rata, la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  está precedida por un aumento de ROS intracelulares y es bloqueada por agentes antioxidantes [Sánchez et al., 1996]. En el presente trabajo, demostramos que en células ovasales el TGF- $\beta$  aumenta la producción de ROS, al igual que sucede en hepatocitos fetales (Fig. 16). Diferentes mecanismos han sido implicados en la generación de ROS por TGF- $\beta$  en células hepáticas. Por un lado, el TGF- $\beta$  reprime la expresión de enzimas antioxidantes. Así, en hepatocitos, el tratamiento con TGF- $\beta$  disminuye la expresión de las enzimas MnSOD, Cu/ZnSOD, catalasa [Kayanoki et al., 1994; Herrera et al., 2004] y  $\gamma$ -GCS [Franklin et al., 2003]. Además, el análisis del transcriptoma de células de hepatoma (FaO) en respuesta a TGF- $\beta$  revela una disminución de la transcripción de 9 enzimas antioxidantes, entre ellas, las dos primeras enzimas de la ruta de biosíntesis del glutatión,  $\gamma$ -GCS y glutatión sintetasa [Coyle et al., 2003]. Nuestros resultados concuerdan con todos estos estudios y muestran que el TGF- $\beta$  disminuye los niveles de mRNA y proteína de SOD2 (MnSOD) y los niveles de proteína de  $\gamma$ -GCS y catalasa (Fig. 17). Un segundo mecanismo a través del cual el TGF- $\beta$  afecta al estado redox celular es la inducción de la expresión de NADPH oxidasas, responsables de la producción de ROS extramitocondriales. De hecho, resultados previos del grupo han demostrado que NOX4 es necesaria para la inducción de apoptosis por TGF- $\beta$  en hepatocitos y células de hepatocarcinoma Hep3B, ya que su silenciamiento disminuye notablemente los efectos citotóxicos de esta citoquina [Carmona-Cuenca et al., 2008]. Los estudios realizados en células ovasales demuestran claramente que el TGF- $\beta$  induce un aumento de la transcripción de NOX4 en estas células, aunque el papel que juega NOX4 en la respuesta apoptótica inducida por TGF- $\beta$  está aún por determinar. Independientemente de cual/es son los mecanismos que median el proceso de estrés oxidativo inducido por TGF- $\beta$  en células ovasales, es importante destacar que nuestros resultados aportan evidencias sólidas de que el efecto antiapoptótico promovido por la señalización autocrina de HGF/Met se debe, al menos en parte, a su capacidad para contrarrestar este proceso de estrés oxidativo. Esta hipótesis está basada en el hecho de que todas las alteraciones provocadas por el TGF- $\beta$  a nivel del estado redox de las células ovasales están amplificadas en las células que carecen de un receptor Met funcional (células Met<sup>-/-</sup>). Así, estas células presentan: i) mayor contenido de ROS intracelulares (Fig. 16A); ii) disminución más acusada y sostenida en el contenido de glutatión (Fig. 16B), iii) disminución más potente de la expresión de las enzimas antioxidantes SOD2 y  $\gamma$ -GCS (Fig. 17B). No está claro si es el incremento exacerbado de la producción de ROS o la disminución más acusada de los niveles de  $\gamma$ -GCS, o

ambos, los que conducen a una imposibilidad de las células Met<sup>-/-</sup> para recuperar los niveles de glutatión a niveles semejantes al control, pero lo que es evidente es que estas células presentan un desbalance redox mucho más acusado. En este sentido, existen numerosas evidencias en la literatura, tanto en células hepáticas como no hepáticas, de que el HGF puede funcionar como un factor antioxidante capaz de proteger contra la muerte celular inducida por estrés oxidativo, principalmente mediante la modulación de los niveles intracelulares de glutatión y/o la expresión y actividad de enzimas antioxidantes [Tsuboi et al., 1999; Kannan et al., 2004; Santangelo et al., 2007; Arends et al., 2008; Valdés-Arzate et al., 2009], aunque también puede disminuir la actividad de enzimas generadoras de ROS, como la NADPH oxidasas [Niimura et al., 2006]. En algunos modelos, como las células mesangiales de rata sometidas a estrés oxidativo inducido por altas concentraciones de glucosa, el HGF ejerce una doble acción antioxidante, inhibiendo la inducción de enzimas productoras de ROS, como la p22(phox), un componente del sistema de las NADPH oxidasas, e impidiendo la reducción de la expresión de la GCLC ( $\gamma$ -GCS) [Li et al., 2006], es decir tanto inhibiendo la producción de ROS como favoreciendo su eliminación. Algo similar podría estar ocurriendo en células ovals tratadas con TGF- $\beta$ , ya que en ausencia de Met, no solo se observa una mayor pérdida de enzimas antioxidantes (Fig. 17B), sino también una mayor inducción de NOX4 (Fig. 18A), aunque las diferencias no alcancen la significatividad estadística. La existencia de una estrecha conexión entre Met y el control del metabolismo redox celular se ha puesto también en evidencia en un estudio comparativo de los perfiles de expresión génica de hepatocitos carentes del receptor Met y hepatocitos control en condiciones basales, realizado mediante la tecnología de los *arrays* de DNA. Este estudio muestra una mayor producción de ROS y una mayor expresión de genes antioxidantes (entre ellos  $\gamma$ -GCS) en los hepatocitos carentes del receptor Met [Kaposi-Novak et al., 2006]. Sin embargo, este aumento basal adaptativo de genes antioxidantes y enzimas detoxificantes de fase II sólo puede sostener la tolerancia al estrés oxidativo en condiciones basales, pero falla al proteger de un daño oxidativo mayor como el inducido por N-nitrosodietilamina o Jo-2, como lo demuestra el aumento del potencial hepatocarcinogénico in vivo de la N-nitrosodietilamina en ratones con delección de Met específica de hígado y de la apoptosis inducida por Jo-2 en hepatocitos deficientes en la actividad tirosina quinasa de Met *in vitro* [Takami et al., 2007, Gomez-Quiroz et al., 2008]. Es de resaltar que en la mayoría de los sistemas analizados, incluidas las células ovals, el efecto antioxidante y protector del HGF se observa sólo cuando las células se pretratan durante varias horas con HGF, mientras que trabajos de nuestro grupo han demostrado que el tratamiento simultáneo con HGF y TGF- $\beta$  no protege de los efectos apoptóticos de este último en hepatocitos fetales [Fabregat et al., 2006]. Estos datos, en conjunto, sugieren que el HGF induce la síntesis *de novo* de enzimas antioxidantes, enriqueciendo las defensas antioxidantes de la célula y preparándolas de antemano para contrarrestar el estrés oxidativo y los efectos celulares que éste produce, inducidos por distintos estímulos como el TGF- $\beta$ .

El HGF al unirse a su receptor Met dispara distintas vías de señalización intracelulares, entre ellas la vía PI3K/Akt, que ha sido ampliamente implicada en procesos de supervivencia celular. La activación de PI3K por HGF ha mostrado jugar un papel importante en la protección frente a apoptosis inducida por gran variedad de estímulos en distintos tipos celulares, incluyendo células hepáticas. Así, el HGF protege a hepatocitos primarios humanos de la apoptosis mediada por CD95 (Fas) y esta protección es revertida por el inhibidor LY294002 y por la transducción con una forma dominante negativa de Akt1 [Schulze-Bergkamen et al., 2004]. También se ha demostrado un papel central para la vía PI3K/Akt en la protección por HGF frente a la apoptosis inducida por ácidos biliares en hepatocitos [Webster y Anwer, 2001], o por agentes quimioterapéuticos en células de hepatoma [Grotegut et al., 2010], así como en el papel protector del HGF frente a daño oxidativo inducido por etanol en células

VL-17A (células de hepatoblastoma humano HepG2 transfectadas con citocromo P450 2E1 y alcohol deshidrogenasa) [Valdés-Arzate et al., 2009]. Los resultados presentados en este trabajo indican que las células ovasales  $Met^{flx/flx}$  pre-tratadas con el inhibidor de PI3K LY294002 muestran niveles de apoptosis en respuesta al TGF- $\beta$  semejantes a los que se observan en células  $Met^{-/-}$  tratadas con TGF- $\beta$  (Fig. 19). Es decir, la inhibición de PI3K en las células  $Met^{flx/flx}$  hace que éstas mimeticen a las células  $Met^{-/-}$  en cuanto a su respuesta apoptótica al TGF- $\beta$ . Estos resultados son la primera evidencia de que el eje de señalización autocrina HGF/Met/PI3K es fundamental en la protección frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en células progenitoras hepáticas. Además, el hecho de que la inhibición de la actividad PI3K conduzca a su vez a una inducción más potente y sostenida de Bmf (Fig. 20) parece implicar a la ruta PI3K en la regulación negativa de Bmf por HGF/Met y consecuentemente en la protección frente a apoptosis. Estos datos concuerdan con un papel crucial de la vía de señalización PI3K/Akt en la regulación de la expresión de Bmf, propuesto en otros modelos. Así, se ha descrito que la activación constitutiva de la vía Akt mediante la expresión de una forma mutante oncogénica activa de la subunidad catalítica de la PI3K (p110 $\alpha$ ) o de una forma de Akt1 miristoilada activa reduce significativamente la inducción de Bmf debida a anoikis en células epiteliales de mama [Schmelzle et al., 2007]. Resultados similares se han obtenido en células de melanoma WM793, en las que la expresión de una forma de Akt3 miristoilada constitutivamente activa anula el aumento de la transcripción de Bmf inducido por silenciamiento o inhibición química de B-raf [Shao y Aplin, 2010]

En conjunto, nuestros datos demuestran que en células ovasales operan mecanismos que se han demostrado fundamentales para la apoptosis por TGF- $\beta$  en células hepáticas como la producción de ROS, la disminución de la expresión de enzimas antioxidantes y la inducción de NOX4, Bim y Bmf, abriendo interesantes temas de exploración para el futuro. En esta línea sería interesante explorar la relevancia de Bim, Bmf, NOX4 y estrés oxidativo, así como la relación entre ellos, en la ruta apoptótica inducida por el TGF- $\beta$  en células ovasales. Asimismo, nuestros resultados demuestran que la señalización autocrina por HGF/Met ejerce un papel protector frente a la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  oponiéndose al estrés oxidativo y a la inducción de Bmf inducido por esta citoquina en células ovasales y que este efecto protector es dependiente de la actividad PI3K. La identificación de los intermediarios por debajo de PI3K requiere experimentos adicionales. En este sentido, evidencias en la literatura han mostrado que la vía PI3K-Akt puede activar NF $\kappa$ B y Nrf2 (NF-E2 related factor), que a su vez controlan la expresión de sistemas antioxidantes y enzimas detoxificantes de fase II [Ozes et al., 1999; Romashkova y Makarov, 1999; Osburn y Kensler 2008; Miao y Clair, 2009; Zhang et al., 2012], lo que proporciona candidatos interesantes de estudio. Por el momento y a falta de pruebas adicionales, nuestros resultados se podrían encuadrar en esta línea, proponiendo a la vía PI3K como la vía de señalización clave que utiliza el HGF para contrarrestar la desregulación del estado redox celular inducido por el TGF- $\beta$  en células ovasales.

### 3. EMT inducida por TGF- $\beta$ en células ovas. Efecto de la ausencia o presencia de un receptor Met funcional.

El conocimiento y estudio de la capacidad de las células hepáticas de sufrir un proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) y de los factores que gobiernan este proceso es de particular relevancia debido al papel que la EMT desempeña en procesos fisiológicos, como el desarrollo embrionario o la regeneración tisular, y patológicos, como la progresión tumoral o la fibrosis.

La capacidad de las células progenitoras de hígado adulto para sufrir EMT y los factores que pueden inducir este proceso en este tipo celular son ampliamente desconocidos. Las principales evidencias de dicho proceso vienen de trabajos recientes que demuestran que las células ovas de rata capaces de repoblar un hígado dañado coexpresan marcadores epiteliales y mesenquimales [Yovchev et al., 2008]. Además, la inyección subcutánea en ratones desnudos de la línea de células ovas de rata LE/6 da lugar a la formación de tumores con fenotipo mesenquimal en los que se observa una disminución en la expresión de E-cadherina y un incremento en la expresión de Snail, vimentina y N-cadherina [Dong et al., 2009]. Sin embargo, en este trabajo no se describe cuales son los factores endógenos o microambientales que impulsan el proceso de EMT en las células transplantadas. Por último, durante el proceso de fibrosis en un modelo de hígado graso no alcohólico (NAFLD) se observa la expansión de células ductulares (progenitores hepáticos) que expresan marcadores de EMT, proceso que está asociado a la activación de la vía de señalización de Hedgehog [Syn et al., 2009]. Sin duda, una de las señales inductora de EMT más potente y conocida es el TGF- $\beta$ . De hecho, trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que el TGF- $\beta$  induce EMT en hepatocitos fetales y neonatales de rata [Pagan et al., 1999; Sánchez et al., 1999; Valdés et al., 2002] y en hepatocitos fetales humanos [Caja et al., 2010]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la población de células ovas que sobreviven al efecto apoptótico del TGF- $\beta$  sufre un cambio fenotípico caracterizado por la adquisición de una morfología fibroblastoide, la pérdida de contactos intercelulares y la reorganización del citoesqueleto de actina en forma de fibras de estrés (Fig. 21). La caracterización fenotípica detallada de las células, tanto a nivel celular como molecular, demuestra que este cambio morfológico se corresponde con un proceso de EMT, evidenciado por la disminución de la expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina, citoqueratinas 18 y 19), el aumento de la expresión de marcadores mesenquimales (vimentina y N-cadherina) (Fig. 22), y el aumento de la expresión de factores de transcripción implicados en EMT (SNA1, ZEB1 y ZEB2) (Fig. 23). Nuestros resultados aportan por tanto una evidencia más de la capacidad de las células ovas, en nuestro caso de ratón, de sufrir EMT y demuestran por primera vez de forma directa que el TGF- $\beta$  es un inductor de EMT en células progenitoras de hígado, contribuyendo así a ampliar el conocimiento de los factores que gobiernan la EMT en este tipo celular.

Las células ovas responden *in vitro* al TGF- $\beta$  alterando la expresión de uPA, tPA y PAI-1 (Fig. 24A-C), componentes de uno de los sistemas de proteasas implicados en la degradación de la matriz extracelular, en particular, en la conversión de plasminógeno inactivo en plasmina activa [revisado por Dass et al., 2008]. Este efecto va a su vez acompañado de un aumento de la expresión de componentes del colágeno tipo 1, col1 $\alpha$ 1 y col1 $\alpha$ 2 (Fig. 24D-E). Estos datos, en conjunto, parecen sugerir que las células ovas adquieren en respuesta al TGF- $\beta$  la capacidad de degradar la matriz celular preexistente y sustituirla por una matriz fibrilar, pudiendo tener importantes implicaciones en el contexto de la regeneración hepática, en el que las células ovas juegan un papel importante. En procesos de regeneración, la inflamación puede activar una EMT dando lugar a la aparición de fibroblastos a partir

de células epiteliales o endoteliales, proceso que si no se resuelve puede producir fibrosis, como se ha visto en distintos tejidos (riñón, hígado, pulmón, e intestino) [Kim et al., 2006; Zeisberg et al., 2007a; Zeisberg et al., 2007b; Potenta et al., 2008]. La fibrosis hepática se debe a un aumento en la deposición de colágeno tipo I en el espacio extracelular y constituye una característica común de varias formas de daño hepático. Hasta ahora, se ha considerado a las células estrelladas activadas las principales células fibrogénicas del hígado y su papel central en la fibrosis hepática está fuera de toda duda [Reeves y Friedman, 2002]. Sin embargo, en los últimos años se ha abierto la cuestión de si los hepatocitos y otras células epiteliales del hígado pueden contribuir también a la fibrosis hepática mediante la generación de fibroblastos originados por EMT [revisado por Choi y Diehl., 2009]. En base a esto y a nuestros resultados, que demuestran que el TGF- $\beta$  promueve en células ovals una EMT y cambios importantes en la expresión de colágeno y proteínas implicadas en la remodelación de la matriz extracelular, es factible pensar que en el hígado dañado *in vivo*, la EMT mediada por TGF- $\beta$  en células ovals también podría contribuir al desarrollo y progresión de un proceso de fibrosis.

Siguiendo en esta misma línea, es importante mencionar que el HGF también es un importante regulador de la remodelación de la ECM. De hecho, se sabe que el HGF tiene un potente papel antifibrótico *in vivo* en varios tejidos, incluyendo el hígado, efecto que debe a su capacidad para inhibir tanto la apoptosis como la acumulación de ECM estimulados por TGF- $\beta$  [Matsuda et al., 1995; Matsuda et al., 1997; Ueki et al., 1999; Xue et al., 2003]. En lo referente al proceso de EMT, se ha descrito que el HGF exógeno impide la EMT inducida por TGF- $\beta$  en células epiteliales de túbulo renal HCK [Yang y Liu, 2002]. Además, en hígado, en un modelo *in vivo* de fibrosis inducida por ligadura de los conductos biliares, la administración de HGF atenúa las lesiones fibróticas, efecto asociado a una disminución de la expresión de TGF- $\beta$ . Esto, junto al hecho de que el tratamiento *in vitro* de células epiteliales biliares humanas con HGF revierte la transformación fenotípica inducida por TGF- $\beta$ , lleva a proponer que el HGF aminora la fibrosis hepática en parte regulando negativamente la EMT en células epiteliales biliares [Xia et al., 2006]. Nuestros datos demuestran que tanto las células ovals Met<sup>fix/fix</sup> como las Met<sup>-/-</sup> completan el proceso de EMT en respuesta al TGF- $\beta$  (Fig. 21, Fig. 22 y Fig. 23), lo que parece indicar que la señalización autocrina HGF/Met no es capaz de contrarrestar esta respuesta en células progenitoras de hígado adulto. Estos datos no son suficientes para poder concluir que la vía de HGF/Met no tenga ningún papel en la regulación de EMT en células ovals. Para ello, se necesitarían estudios adicionales, que incluyesen el análisis del efecto de la señalización paracrina de HGF/Met sobre este proceso. Por otra parte, a pesar de que se observa EMT en células con y sin un receptor Met funcional, es interesante destacar las diferencias observadas en la inducción de colágeno y PAI-1 por TGF- $\beta$ , que es mayor en células Met<sup>-/-</sup> (Fig. 24C-E), con respecto a las células Met<sup>fix/fix</sup>. Las diferencias son particularmente notables en el caso de PAI-1, para el cual se ha demostrado un papel esencial en la fibrosis, de forma que su deficiencia reduce significativamente la fibrosis inducida por obstrucción de los conductos biliares, efecto que está mediado por la activación de HGF y tPA [Wang et al., 2007], evidenciando una asociación negativa entre PAI-1 y los efectos antifibróticos del HGF. En base a esto, las diferencias observadas entre células Met<sup>fix/fix</sup> y Met<sup>-/-</sup> podrían apoyar un papel para la señalización autocrina HGF/Met en la regulación negativa de los efectos profibróticos inducidos por TGF- $\beta$  en células ovals, de manera que la ausencia de Met potenciaría dichos efectos. En apoyo de esta hipótesis, muy recientemente, usando ratones con una deficiencia en Met específica de hígado, se ha demostrado que la ausencia de Met resulta en una aceleración y agravamiento del proceso fibrogénico inducido *in vivo* mediante tratamiento con CCl<sub>4</sub> [Marquardt et al., 2012], aunque el papel que pudieran jugar las células ovals en este contexto está aún sin explorar.

Además de los efectos sobre la expresión de componentes de sistemas de proteasas degradativas de la ECM, las células ovas experimentan un cambio profundo en el perfil de expresión de distintas subunidades de integrinas por efecto del TGF- $\beta$  (Fig.25), lo que parece reflejar una alteración en la interacción célula-ECM, y en consecuencia un cambio en el microambiente celular. Esto no es sorprendente, ya que es bien sabido que el TGF- $\beta$  modula a diferentes niveles la actividad de las integrinas, regulando la expresión tanto de las subunidades que las componen como de sus ligandos y de otras proteínas asociadas con ellas [revisado por Margadant y Sonnenberg, 2010]. Más interesante es el hecho de que esta modulación es bidireccional, de forma que las diferentes integrinas pueden regular a su vez la acción del TGF- $\beta$ . Así, las integrinas amplifican la señalización por TGF- $\beta$ , y por tanto las respuestas celulares a esta citoquina, y lo hacen principalmente activando el TGF- $\beta$  latente acumulado en la matriz extracelular, aunque también modulando la expresión de componentes de su vía de señalización como el TGF $\beta$ RII o Smad7 [revisado por Margadant y Sonnenberg 2010]. Esta regulación cruzada tiene importantes consecuencias fisiopatológicas. De hecho, se sabe que las interacciones que se producen entre el TGF- $\beta$  y las integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  y  $\alpha v\beta 6$  son relevantes durante el desarrollo y patogénesis de la fibrosis [Kondo et al., 2004; Patsenker et al., 2008; Puthawala et al., 2008]. En este sentido, la inducción de estas integrinas agravaría el desarrollo de un proceso fibrótico. La interacción cruzada de integrinas y TGF- $\beta$  también juega un papel fundamental durante el desarrollo y progresión tumoral, contribuyendo a la inducción de EMT, la migración e invasión de las células tumorales [Nejjari et al., 2002; Lee et al., 2005; Gianelli et al., 2005; Takayama et al., 2009]. En células ovas, el TGF- $\beta$  aumenta la expresión de las integrinas  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  y disminuye la expresión de  $\beta 4$ . Teniendo en cuenta los posibles heterodímeros que pueden formar dichas subunidades, el TGF- $\beta$  conduciría en células ovas al aumento de la expresión de integrinas como  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 1$ , importantes receptores para colágeno I, fibronectina y laminina [revisado por Gilcrease, 2006], que son ligandos comúnmente activados en respuesta al TGF- $\beta$ , lo que sugiere una activación indirecta de estas integrinas. Por otra parte, dado que la subunidad  $\alpha v$  forma parte de todas las integrinas identificadas hasta el momento capaces de activar el TGF- $\beta$  latente ( $\alpha v\beta 8$ ,  $\alpha v\beta 6$ ,  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha v\beta 3$ ) [Munger et al., 1998; Munger et al., 1999; Mu et al., 2002; Asano et al., 2005; Moyano et al., 2010], es posible pensar que el aumento de la expresión de la subunidad  $\alpha v$  que observamos en nuestro modelo celular pueda conllevar un aumento de la señalización por TGF- $\beta$  al favorecer la activación del TGF- $\beta$  latente. En definitiva, todos estos datos constituyen evidencias en apoyo de la retroalimentación positiva recíproca entre las integrinas y la señalización del TGF- $\beta$ . El papel que esta posible interacción juega en la implicación de las células ovas en procesos de regeneración, fibrosis y cáncer es un campo totalmente abierto a futuros estudios.

En este trabajo hemos analizado el efecto del TGF- $\beta$  sobre la expresión de marcadores de linaje y diferenciación hepática. La diferenciación hepática es el resultado de la acción combinada y jerárquica de factores de transcripción de expresión elevada en células hepáticas denominados genéricamente LETFs (Liver Enriched Transcription Factors) y que regulan la transcripción de genes específicos de hígado como albúmina (Alb), transtirretina (TTR),  $\alpha$ -1-antitripsina (AAT) o alfafetoproteína (AFP) [revisado por Schrem et al., 2002; Costa et al., 2003]. Trabajos previos de nuestro grupo [del Castillo et al., 2008a; y resultados no publicados] han revelado que las células ovas expresan algunos LETFs miembros de las familias HNF1, Foxa, HNF4 y Onecut, aunque a distintos niveles. En el presente trabajo demostramos que el proceso de EMT inducido por TGF- $\beta$  en células ovas está acompañado por una fuerte disminución de la expresión de HNF1 $\beta$ , Foxa1, Foxa2, Foxa3, HNF4 $\alpha$  y Onecut-1 (Fig. 26), que conduce a su vez a una disminución drástica

en los niveles de albúmina y alfafoproteína (Fig. 27), lo que parece indicar que el TGF- $\beta$  induce una marcha atrás en el proceso de diferenciación de las células ovas. Estos resultados concuerdan con trabajos previos en los que hemos documentado que el proceso de EMT inducido por el TGF- $\beta$  en hepatocitos fetales de rata y humanos [Fabregat et al., 1996; Sánchez et al., 1999; Valdés et al., 2002; Caja et al., 2010], así como hepatocitos neonatales de rata [Pagán et al., 1999] está acompañado de una represión de la expresión de distintos HNFs y la consecuente disminución de la expresión de albúmina y AFP. Además, otros autores han demostrado que Snail reprime HNF4 $\alpha$  en hepatocitos [Cicchini et al., 2006], lo que refuerza la idea de que la EMT inducida por TGF- $\beta$  en células hepáticas se asocia con un proceso de desdiferenciación.

El análisis comparativo entre células Met<sup>fix/fix</sup> y células Met<sup>-/-</sup> parece indicar que el proceso de desdiferenciación es más acusado en las células Met<sup>-/-</sup>, que presentan una mayor disminución de la expresión de HNF4 $\alpha$ , Onecut1, Foxa1, Foxa3, albúmina y AFP en respuesta al TGF- $\beta$  (Fig. 26 y Fig. 27). Destacan las diferencias en la regulación negativa de la expresión de AFP, que no es estadísticamente significativa en células ovas Met<sup>fix/fix</sup>, pero sí en Met<sup>-/-</sup> (Fig. 30B). Estos resultados apuntan a que el eje autocrino HGF/Met contrarresta parcialmente la regulación negativa por TGF- $\beta$  de la expresión de genes de diferenciación hepática. Existen numerosos datos de la literatura que han demostrado la implicación de HGF en la inducción de la diferenciación de células madre/progenitoras embrionarias y adultas de distintos orígenes hacia hepatocitos [Suzuki et al., 2000; Minguet et al., 2003; Suzuki et al., 2002; Suzuki et al., 2003; revisado por Sánchez y Fabregat, 2010]. De hecho, el HGF está presente en prácticamente todas las estrategias de diferenciación *in vitro* [revisado por Snykers et al., 2009]). Además, es interesante destacar un trabajo reciente en el que se demuestra que la falta de Met en el hígado afecta negativamente a la expansión de células ovas inducida por tratamiento con DDC, efecto que se debe a una disminución de la proliferación, migración y diferenciación *in vivo* a hepatocitos [Ishikawa et al., 2012], revelando un papel crítico para Met en la diferenciación de células ovas hacia el linaje de hepatocitos. No obstante, nuestro trabajo es el primer estudio directo sobre la capacidad de la señalización autocrina de HGF/Met de modular el estado de diferenciación de las células progenitoras en respuesta al TGF- $\beta$ . Aquí, presentamos evidencias suficientes para proponer que la vía HGF/Met regula negativamente los efectos de desdiferenciación inducidos por el TGF- $\beta$  de células progenitoras de hígado adulto. En consistencia con estos datos, trabajos previos del grupo demostraban que en hepatocitos fetales de rata, el co-tratamiento con HGF impide la represión de la expresión de HNF4, albúmina y AFP inducidos por TGF- $\beta$  [Fabregat et al., 1996]. En contraposición, en células MMH (Met Murine Hepatocyte, células hepáticas inmortalizadas derivadas de un ratón transgénico que expresa una forma truncada constitutivamente activa del receptor Met humano) de fenotipo epitelial, el TGF- $\beta$  induce pérdida de la morfología epitelial, acompañada de pérdida de E-cadherina, ZO-1, HNF4 y HNF1 $\alpha$ , a pesar de la activación constitutiva de Met [Spagnoli et al., 2000], lo que sugiere que el efecto de Met sobre la EMT y la desdiferenciación asociada, inducida por TGF- $\beta$  podría depender del estado de maduración celular y estar restringido a células hepáticas inmaduras.

Es importante también resaltar que nuestros datos ponen en evidencia una vez más la asociación inversa entre la expresión de genes reguladores claves de EMT y la expresión de HNFs, apoyando la idea de que los HNFs pueden jugar un papel importante en el control del mantenimiento del fenotipo epitelial, dado que la EMT es un proceso en el que por definición se pierden las características epiteliales. En los últimos años se están acumulando evidencias en esta dirección. Un buen ejemplo lo constituye el trabajo de Santangelo y colaboradores [Santangelo et al., 2011] que

demuestra que HNF4 $\alpha$ , en cooperación con su diana HNF1 $\alpha$ , inhibe la transcripción de reguladores claves de la EMT (Snail y Slug) así como de varios marcadores mesenquimales, de forma que su silenciamiento dispara el programa mesenquimal en hepatocitos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el papel crucial de HNF4 $\alpha$  en la inducción y mantenimiento de la diferenciación hepática no solo depende de su capacidad para activar la expresión de genes de diferenciación hepática, sino también de su capacidad para reprimir de manera continuada el programa mesenquimal. En definitiva, estos datos ponen de manifiesto que la diferenciación hacia hepatocitos (células altamente especializadas y de naturaleza epitelial) es el resultado de la integración entre la morfogénesis epitelial y la expresión de genes específicos de hígado, procesos en los que los HNFs parecen jugar un papel clave.

La pérdida de expresión de marcadores del linaje hepático inducida por TGF- $\beta$  en células ovas está acompañada de un incremento de la expresión de nestina (Fig.28). La nestina es una proteína formadora de filamentos intermedios que se describió originalmente como marcador de células madre/progenitoras neurales durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso central [Lendahl et al., 1990]. Desde su identificación, la nestina se usa ampliamente como marcador de células madre neurales no sólo embrionarias sino también adultas [Lendahl et al., 1990; Gilyarov, 2008]. Sin embargo, la expresión de nestina no está limitada únicamente a células madre/progenitores del sistema nervioso central, habiéndose detectado en varios tipos de células progenitoras adultas. En el hígado adulto de ratones transgénicos en los que la expresión de GFP (Green Fluorescent Protein) está bajo el control de elementos reguladores del gen de la nestina, la expresión de GFP marca una subpoblación de células epiteliales pequeñas que proliferan en respuesta a daño hepático por CCl<sub>4</sub> y que por morfología, localización y marcadores fenotípicos fueron identificadas como células ovas [Gleiberman et al., 2005]. A falta de pruebas adicionales que aclaren el significado de la expresión de nestina en células ovas tratadas con TGF- $\beta$ , nuestra hipótesis es que es una evidencia más de un paso atrás en el compromiso de linaje de las células y de la adquisición de un fenotipo más inmaduro o temprano y probablemente con mayor potencial de diferenciación. En apoyo de esta hipótesis, progenitores pancreáticos y células madre/progenitoras de folículo piloso seleccionados en base a la expresión de nestina han demostrado comportarse como progenitores multilineaje [Zulewski et al., 2001; Amoh et al., 2005]. Además, trabajos *in vitro* de diferenciación de células madre embrionarias a través de la formación de cuerpos embrionarios, mostraron que tras la diferenciación espontánea o inducida hacia linajes neurales, pancreáticos o hepáticos, se observa una co-expresión transitoria de nestina con marcadores específicos de linaje, como GFAP (glial fibrillary acidic protein, marcador de células neurogliales), péptido-C (marcador de células pancreáticas) y albúmina (marcador de linaje hepático), únicamente en puntos temporales que definen el comienzo del compromiso a linaje perdiéndose la expresión al progresar la diferenciación [revisado por Wiese et al., 2004]. Por otra parte, hay que mencionar que resultados previos habían establecido una asociación entre la inducción de EMT por TGF- $\beta$  y la adquisición de un fenotipo de célula madre/progenitora. Así, los hepatocitos fetales de rata adquieren la expresión de OV-6 (antígeno expresado en células ovas) tras la EMT inducida por TGF- $\beta$  [Valdés et al., 2002], lo que está asociado a su vez a la adquisición de un fenotipo inmaduro bipotencial, con capacidad de diferenciarse tanto a colangiocitos como a hepatocitos [del Castillo et al., 2008b]. Algo similar ocurre en hepatocitos fetales humanos que sufren EMT y adquieren carácter de célula progenitora cuando son tratados con TGF- $\beta$ , como se infiere del aumento de la expresión de Thy-1 (CD90) [Caja et al., 2010]. En el caso de las células ovas, el proceso de EMT inducido por TGF- $\beta$  no estaría asociado con la adquisición de un fenotipo de célula progenitora en sí, que ya este es propio de la célula oval, pero sí con un paso atrás en el proceso de diferenciación y compromiso de linaje de las células.

En conjunto, nuestros resultados muestran que el TGF- $\beta$  induce en células ovas un proceso de EMT que se acompaña de la disminución en la expresión de factores de transcripción HNFs claves para el mantenimiento del fenotipo hepático y epitelial, y marcadores hepáticos como albúmina o AFP; así como del aumento en la expresión de nestina, marcador de células progenitoras multipotentes. Todo esto es indicativo de que el TGF- $\beta$  induce un paso atrás en su compromiso a linaje hepático y promueve su transformación en células progenitoras más inmaduras y posiblemente con mayor capacidad de auto-renovación y de supervivencia. Estos resultados podrían tener relevancia en regeneración y terapia celular. Uno de los problemas más habituales de la terapia celular regenerativa mediante trasplante de células madre/progenitoras es que la eficiencia de integración y repoblación es muy limitada. Este problema se ha observado también en la terapia celular para regeneración hepática utilizando células progenitoras extraídas de hígado adulto. En un estudio reciente comparativo entre la capacidad regenerativa y de integración entre hepatocitos maduros y células progenitoras hepáticas adultas se ha demostrado que estas últimas pueden diferenciarse a hepatocitos en el hígado receptor y que su crecimiento es más rápido que el de los hepatocitos maduros durante las primeras semanas. Sin embargo, su capacidad de repoblación a largo plazo es menor que la de hepatocitos maduros, de forma que a los dos meses del trasplante la mayoría de los focos derivados de células progenitoras han desaparecido [Ichinohe et al., 2012]. Los datos presentados en esta memoria, junto a otros datos de la literatura que demuestran que la expresión de Snail o inducción de EMT no sólo reprime la expresión de proteínas de fenotipo epitelial sino que induce un aumento de la supervivencia a distintos tipos de estímulos apoptóticos y mantiene o confiere propiedades de célula madre/progenitora [Valdés et al., 2002; Vega et al., 2004, revisado por Ocaña y Nieto, 2010; Wu y Zhou, 2010], sugieren que la EMT a través de estos efectos podría conferir una ventaja *in vivo* frente a células progenitoras que no han sufrido un proceso de EMT, ayudando a aumentar la permanencia de las células progenitoras transplantadas en el tejido receptor y conduciendo por tanto, al aumento de su capacidad de repoblación y en último término a una mayor tasa de éxito en los trasplantes. En este trabajo, presentamos resultados preliminares que apuntan en esa dirección. Los experimentos realizados de trasplante *in vivo* en un modelo murino de daño hepático utilizando células ovas normales (pre-EMT) y células ovas que han sufrido una EMT por efecto del TGF- $\beta$  (post-EMT) (Fig. 30) muestran una mayor permanencia en el hígado a largo plazo para las células ovas post-EMT. Estos resultados apoyan la idea de que la EMT favorece la integración estable de las células ovas en el parénquima hepático y por tanto su capacidad regenerativa y sin duda merecen una profundización en el futuro que permita esclarecer los mecanismos implicados en dichos efectos.

#### 4. Discusión final.

Las células ovals son células progenitoras de hígado adulto que llevan a cabo la regeneración hepática en condiciones que impiden la regeneración mediada por hepatocitos. Debido fundamentalmente a su potencial regenerativo pero también a su posible relación con el desarrollo del HCC es fundamental conocer los factores que controlan la biología de las células ovals, que hasta el momento no son bien conocidos. En este sentido, los resultados de este trabajo contribuyen notablemente al conocimiento de los mecanismos de señalización y las respuestas mediadas por los ligandos del EGFR, el HGF y el TGF- $\beta$  en células ovals mediante aproximaciones *in vitro*. Así, los datos presentados aquí, conjuntamente con un trabajo previo de nuestro grupo [del Castillo et al., 2008a], han permitido evidenciar la existencia de bucles autocrinos mediados por EGFR y Met que juegan un papel fundamental en la regulación de la proliferación y supervivencia de las células ovals frente a estímulos apoptóticos. Además, hemos demostrado la ausencia de interacciones funcionales entre el EGFR y Met en células ovals para la inducción de dichos procesos. Estos datos pueden tener importantes implicaciones prácticas en la regeneración hepática mediada por células progenitoras de hígado adulto, ya que conocer cuales son los factores que impulsan la proliferación y/o supervivencia de células ovals es fundamental para su posible expansión *in vitro* con vistas a un posterior trasplante o para modular y ayudar al éxito de la respuesta regenerativa *in vivo*. Asimismo, dado el papel prevalente que la interacción cruzada entre estas rutas de señalización tienen en contextos tumorigénicos, su ausencia puede constituir uno de los posibles mecanismos intrínsecos de resistencia a la transformación neoplásica en estas células, y una evidencia en apoyo de que estas células son candidatas seguras para la terapia celular.

La existencia de los bucles autocrinos mediados por el EGFR y Met en células ovals podría tener un papel en contrarrestar los efectos de señales inhibitoras que se producen en un hígado dañado, ayudándoles a completar con éxito el proceso de regeneración hepática. Esta hipótesis nos llevó a profundizar en el estudio de los efectos que la señalización autocrina de HGF tiene en las respuestas de las células ovals al TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  es una citoquina con un papel dual. Por una parte, en células epiteliales no transformadas inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis, efectos que contribuyen a regular negativamente la transformación celular en las etapas tempranas de la progresión tumoral, a la vez que actúan como freno en procesos de regeneración hepática. Por el contrario, en etapas tardías de la oncogénesis, el TGF- $\beta$  puede promover la progresión tumoral debido entre otros motivos, a su capacidad de inducir EMT, proceso que confiere una mayor capacidad invasiva y metastásica a las células tumorales [Massagué, 2008; Meulmeester y Ten Dijke, 2011]. En este trabajo hemos analizado el efecto del TGF- $\beta$  sobre las células ovals, demostrando que esta citoquina induce su apoptosis a través de la vía mitocondrial. Además, presentamos las primeras evidencias de que la respuesta apoptótica mediada por el TGF- $\beta$  es parcialmente contrarrestada por la señalización autocrina de HGF/Met a través de la activación de PI3K que ayuda a frenar la disminución de la expresión de enzimas antioxidantes y la inducción de Bmf por TGF- $\beta$ . Existe, sin embargo, una población de células que sobreviven a este efecto apoptótico y que sufren un proceso de EMT en respuesta al TGF- $\beta$ , proceso que va acompañado de un paso atrás en el proceso de diferenciación hacia el linaje de hepatocitos y la adquisición de un fenotipo más inmaduro caracterizado por la expresión de marcadores de células progenitoras multipotentes, como nestina. Esta transformación celular conlleva una ventaja para la integración celular en un hígado

dañado y la repoblación del mismo. La capacidad del TGF- $\beta$  de inducir apoptosis y EMT en células ovas y el papel del HGF autocrino sobre estas respuestas podrían tener enorme relevancia *in vivo*. Hay que recordar que las células ovas llevan a cabo la regeneración hepática en hígados que han sufrido daños crónicos de diversa etiología y que, por otra parte, las células ovas también han sido relacionadas con la aparición de procesos tumorales en el hígado, que se producen mayoritariamente en hígados cirróticos. La expresión de TGF- $\beta$  aumenta en hígados de pacientes con hepatitis crónica o cirrosis [Castilla et al., 1991], por lo que tanto la regeneración hepática mediada por células progenitoras como la aparición de HCC se producen en un contexto en el que las células hepáticas están expuestas a la acción del TGF- $\beta$ . En este escenario, en base a nuestros datos, una subpoblación de células ovas morirá por apoptosis pero otra subpoblación sobrevivirá y sufrirá un proceso de EMT, lo que favorecerá su expansión en el parénquima hepático y el proceso de regeneración. La protección por la señalización autocrina de HGF/Met frente a los efectos apoptóticos del TGF- $\beta$  podría contribuir al éxito de estas células progenitoras en la regeneración hepática *in vivo* aumentando su supervivencia, pero por otra parte esto aumentaría el número de células ovas susceptibles de sufrir EMT, efecto que el HGF autocrino no es capaz de contrarrestar. Aunque es posible que la EMT tenga una vertiente positiva al mejorar la integración y capacidad regenerativa de las células en el parénquima hepático a largo plazo, como sugieren nuestros resultados preliminares, no hay que olvidar que la EMT parece contribuir también a la patogénesis de la fibrosis hepática al conferir la capacidad de alterar la composición de la matriz extracelular y tener un efecto promotor sobre la progresión tumoral debido a la adquisición de mayor capacidad móvil e invasiva, por lo que si estas células ovas, originalmente no transformadas y que han sufrido EMT en respuesta al TGF- $\beta$ , sufrieran una mutación oncogénica podrían dar lugar a tumores agresivos, invasivos y metastáticos.

**VII.**

---

**Conclusiones**



1. Las células ovas presentan una regulación autocrina del EGFR que promueve su proliferación y tiene un efecto de supervivencia frente a la apoptosis disparada por diferentes estímulos como la ausencia de suero y el tratamiento con TGF- $\beta$ .
2. Las actividades mitogénica y antiapoptótica inducidas por EGFR y Met en células ovas no son redundantes. Mientras que el EGFR parece ser un regulador clave de la proliferación, Met podría tener efectos más relevantes en promover la supervivencia celular.
3. En células ovas no existe una interacción cruzada entre Met y el EGFR. No se ha detectado una interacción física entre ambos receptores ni una transactivación directa o indirecta de los mismos. Además, los efectos proliferativos y de supervivencia disparados por Met y EGFR son independientes entre sí.
4. El TGF- $\beta$  dispara la activación tanto de la vía canónica de las Smads como de las vías no canónicas Akt, ERK1/2, p38 y JNKs en células ovas Met<sup>fix/fix</sup> y Met<sup>-/-</sup>, no observándose diferencias significativas entre ambas líneas. Las vías de ERK1/2, p38 y JNKs no están implicadas en la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  ya que su inhibición química no impide la activación de caspasa-3 disparada por TGF- $\beta$ .
5. La apoptosis inducida por TGF- $\beta$  en células ovas está asociada a una disfunción mitocondrial y a la inducción de la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bim y Bmf, demostrando un papel relevante para la mitocondria en el proceso apoptótico. Las alteraciones mitocondriales y la inducción de Bmf están amplificadas en células Met<sup>-/-</sup>.
6. El TGF- $\beta$  induce un proceso de estrés oxidativo, que es mayor en células Met<sup>-/-</sup> asociado con una disminución en la expresión de enzimas antioxidantes (SOD2, catalasa y  $\gamma$ -GCS) y una inducción de la expresión de enzimas generadoras de ROS (NOX4).
7. La inhibición de la actividad PI3K en células ovas Met<sup>fix/fix</sup> incrementa el índice apoptótico y prolonga la inducción de Bmf en respuesta al TGF- $\beta$ , imitando la respuesta observada en células Met<sup>-/-</sup>, lo que demuestra que la PI3K es necesaria para la actividad antiapoptótica de la señalización autocrina dependiente de Met en células ovas.
8. El TGF- $\beta$  induce un proceso de EMT en las células ovas independientemente de la presencia o no de un receptor Met funcional.
9. El proceso de EMT inducido por TGF- $\beta$  en células ovas está acompañado de alteraciones en la expresión de integrinas, proteínas de matriz extracelular y proteínas implicadas en la degradación proteolítica de la matriz, sugiriendo cambios en las interacciones célula-matriz y en la capacidad de las células para remodelar la matriz extracelular.
10. El proceso de EMT inducido por TGF- $\beta$  en células ovas conlleva la adquisición de un fenotipo progenitor más inmaduro, proceso que es al menos parcialmente frenado por la señalización autocrina dependiente de Met, ya que la pérdida de expresión de marcadores de diferenciación hacia el linaje de hepatocitos es más acusada en células Met<sup>-/-</sup>.



**VIII.**

---

**Bibliografía**



- Accornero P, Martignani E, Mirett S, Cucuzza S, Baratta M.** Epidermal growth factor and hepatocyte growth factor receptors collaborate to induce multiple biological responses in bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 2009 92 :3667–3675
- Adams JC.** Molecular organisation of cell-matrix contacts: essential multiprotein assemblies in cell and tissue function. *Expert Rev Mol Med.* 2002 Feb 11;4(1):1-24
- Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, et al.** The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 2007; 26:6979-88 #
- Albright CD, Salganik RI, Craciunescu CN, Mar MH, Zeisel SH.** Mitochondrial and microsomal derived reactive oxygen species mediate apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in immortalized rat hepatocytes. *J Cell Biochem.* 2003 May 15;89(2):254-61.
- Alcorn JF, Guala AS, van der Velden J, McElhinney B, Irvin CG, Davis RJ, Janssen-Heininger YM:** Jun N-terminal kinase 1 regulates epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- $\beta$ 1. *J Cell Sci* 2008, 121:1036-1045.
- Alison MR, Lovell MJ .** Liver cancer: the role of stem cells. *Cell Prolif* 2005 38:407 – 421
- Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Anilkumar TV, Jagoe R, Sarraf CE.** Expression of hepatocyte growth factor mRNA during oval cell activation in the rat liver. *J Pathol* 1993; 171: 291-299
- Alison MR, Islam S, and Lim S** Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly *J Pathol.* 2009 Jan;217(2):282-98
- Allen KJ, Soriano HE.** Liver cell transplantation: the road to clinical application. *J Lab Clin Med* 2001;138:298–312.
- Amoh Y, Li L, Katsuoaka K, Penman S, Hoffman RM.** Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 12;102(15):5530-4
- Anderson ME:** Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact* 1998, 111–112:1-14
- Andres, J. L., Ronnstrand, L., Cheifetz, S., and Massague, J.** *J. Biol. Chem.* 1991 266, 23282-23287
- Andrews NC y Faller DV** (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 9. 2499
- Annoni G, Weiner FR, Zern MA.** Increased transforming growth factor-beta 1 gene expression in human liver disease. *J Hepatol.* 1992 Mar;14(2-3):259-64
- Arends B, Slump E, Spee B, Rothuizen J, Penning LC.** Hepatocyte growth factor improves viability after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity in bile duct epithelial cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2008 Apr;147(3):324-30
- Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K.** Increased expression of integrin  $\alpha$ (v) $\beta$ 3 contributes to the establishment of autocrine TGF- $\beta$  signaling in scleroderma fibroblasts. *J Immunol.* 2005 Dec 1;175(11):7708-18.
- Avraham R, Sas-Chen A, Manor O, Steinfeld I, Shalgi R, Tarcic G, Bossel N, Zeisel A, Amit I, Zwang Y, Enerly E, Russnes HG, Biagioni F, Mottolese M, Strano S, Blandino G, Børresen-Dale AL, Pilpel Y, Yakhini Z, Segal E, Yarden Y.** EGF decreases the abundance of microRNAs that restrain oncogenic transcription factors. *Sci Signal.* 2010 Jun 1;3(124):ra43
- Bache KG, Slagsvold T, Stenmark H.** Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *EMBO J.* 2004 Jul 21;23(14):2707-12
- Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL.** Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 2000;275:36803–36810.
- Bakin AV, Rinehart C, Tomlinson AK, Arteaga CL.** p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGF $\beta$ -mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci* 2002;115:3193– 3206.
- Ballif BA and Blenis J.** Molecular Mechanisms Mediating Mammalian Mitogen activated Protein Kinase (MAPK) Kinase (MEK)-MAPK Cell Survival Signals *1 Cell Growth & Differentiation* Vol. 12, 397–408, August 2001
- Bardelli, A., C. Ponzetto, and P. M. Comoglio.** Identification of functional domains in the hepatocyte growth factor and its receptor by molecular engineering. *J Biotechnol* 1994 37 (2):109-122.
- Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al.** The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2:84-9.
- Baulida J, Kraus M H, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G.** All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J. Biol. Chem.* 271, 5251–5257 (1996).#
- Benvenuti, S., and P. M. Comoglio.** The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J Cell Physiol* 2007 213 (2):316-325.

- Berasain C, Garcia-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Lee DC, Prieto J, Avila MA.** Amphiregulin: An early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* 2005; 128: 424–432.
- Berasain C, Castillo J, Prieto J, Avila MA.** New molecular targets for hepatocellular carcinoma: the ErbB1 signaling system. *Liver Int* 2007 27(2):174-85.
- Berasain C, Perugorria MJ, Latasa MU, Castillo J, Goñi S, Santamaría M, Prieto J, Avila MA.** The epidermal growth factor receptor: a link between inflammation and liver cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009 Jul;234(7):713-25
- Bergström JD, Westermark B, Heldin NE.** Epidermal growth factor receptor signaling activates met in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 2000 Aug 25;259(1):293-9
- Bernard DJ, Chapman SC, Woodruff TK.** An emerging role for co-receptors in inhibin signal transduction. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Jun 30;180(1-2):55-62.
- Bertotti, A., and P. M. Comoglio.** Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the HGF receptor. *Trends Biochem Sci* 2003 28 (10):527-533.
- Bertran E, Caja L , Navarro E, Sancho P, Mainez J, Murillo MM , Vinyals A , Fabra A, Fabregat I.** Role of CXCR4/SDF-1 $\alpha$  in the migratory phenotype of hepatoma cells that have undergone epithelial–mesenchymal transition in response to the transforming growth factor- $\beta$ . *Cellular Signalling* 2009; 21: 1595–1606
- Bhowmick NA, Zent R, Ghiassi M, McDonnell M, Moses HL.** Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J Biol Chem* 2001;276:46707–46713.
- Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C.A., Engel, M.E., Arteaga, C.L., and Moses, H.L.** Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* 2001;12, 27–36.
- Bierie B, Moses HL.** Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jul;6(7):506-20.
- Birchmeier, C., and E. Gherardi.** Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 1998; 8 (10):404-410.
- Birchmeier, C., W. Birchmeier, E. Gherardi, and G. F. Vande Woude.** Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4 (12):915-925.
- Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH, Parsons SJ.** c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem*. 1999 Mar 19;274(12):8335-43
- Bissell DM, Roulot D, and George J.** Transforming growth factor  $\beta$  and the liver. *Hepatology* 34: 859–867, 2001
- Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, Böttinger EP.** A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev*. 2000 Jan 15;14(2):187-97.
- Black, D., et al.,** Transforming growth factor beta mediates hepatocyte apoptosis through Smad3 generation of reactive oxygen species. *Biochimie*, 2007. 89(12): p. 1464-73.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C.** Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 1995; 376: 768–71.
- Blanquaert, F., D. Barritault, and J. P. Caruelle.** Effects of heparan-like polymers associated with growth factors on osteoblast proliferation and phenotype expression. *J Biomed Mater Res* 1999; 44 (1):63- 72.
- Blobe GC , Schiemann WP, Lodish HF.** Role of transforming growth factor beta in human disease, *N. Engl. J. Med*. 2000; 342: 1350–1358
- Blobe GC, X. Liu, S.J. Fang, T. How, H.F. Lodish,** A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC, *J. Biol. Chem*. 2001; 276: 39608–39617
- Blüthgen N, Legewie S, Kielbasa SM, Schramme A, Tchernitsa O, Keil J, Solf A, Vingron M, Schäfer R, Herzog H, Sers C.** A systems biological approach suggests that transcriptional feedback regulation by dual-specificity phosphatase 6 shapes extracellular signal-related kinase activity in RAS-transformed fibroblasts. *FEBS J*. 2009 Feb;276(4):1024-35
- Boccaccio, C., G. Gaudino, G. Gambarotta, F. Galimi, and P. M. Comoglio.** Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF. *J Biol Chem* 1994; 269 (17):12846-12851.
- Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, and Ruoslahti E.** Natural inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 360: 361–364, 1992.

- Borowiak M, Garratt AN, Wüstefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C.** Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10608-10613
- Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Brown KA, Aakre ME, Gorska AE, Price JO, Eltom SE, Pietenpol JA, et al.** Induction by transforming growth factor-beta1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event in vitro. *Breast Cancer Res* 2004; 6:215-31.
- Browne G, Sayan AE, Tulchinsky E.** ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer. *Cell Cycle* 2010; 9: 886–891
- Burns WC, Twigg SM, Forbes JM, Pete J, Tikellis C, Thallas-Bonke V, Thomas MC, Cooper ME, Kantharidis P:** Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: Implications for diabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 2484–2494, 2006
- Cain K, Inayat-Hussain SH, Couet C, Cohen GM.** A cleavage-site-directed inhibitor of interleukin-1 – beta-converting enzyme-like proteases inhibits apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* 1996; 314:27-32.
- Caja L, Ortiz C, Bertran E, Murillo MM, Miró-Obradors MJ, Palacios E, Fabregat I.** Differential intracellular signalling induced by TGF- $\beta$  in rat adult hepatocytes and hepatoma cells: Implications in liver carcinogenesis. *Cellular Signalling* 2007; 19: 683–694
- Caja L, Sancho P, Bertran E, Iglesias-Serret D, Gil J, Fabregat I.** Overactivation of the MEK/ERK pathway in liver tumor cells confers resistance to TGF- $\beta$ -induced cell death through impairing up-regulation of the NADPH oxidase NOX4. *Cancer Res.* 2009 Oct 1;69(19):7595-602.
- Caja L, Bertran E, Campbell J, Fausto N, Fabregat I.** The transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) mediates acquisition of a mesenchymal stem cell-like phenotype in human liver cells. *J Cell Physiol.* 2010 May;226(5):1214-23
- Caja L., Sancho P, Bertran E, Fabregat I.** Dissecting the effect of targeting the epidermal growth factor receptor on TGF-b-induced-apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells *J Hepatol.* 2011 Aug;55(2):351-8.
- Caja L, Sancho P, Bertran E, Ortiz C, Campbell JS, Fausto N, Fabregat I.** The tyrosinase AG1478 inhibits proliferation and induces death of liver tumor cells through EGF receptor-dependent and independent mechanisms. *Biochem Pharmacol.* 2011b Dec 1;82(11):1583-92
- Cano A., Pérez-Moreno M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., Del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A.** The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2: 76–83.
- Cano A, Nieto MA.** Non-coding RNAs take centre stage in epithelial-to-mesenchymal transition. *Trends Cell Biol.* 2008; 18, 357{359
- Carmona-Cuenca I, Herrera B, Ventura JJ, Roncero C, Fernández M, Fabregat I.** EGF blocks NADPH oxidase activation by TGF-beta in fetal rat hepatocytes, impairing oxidative stress, and cell death. *J Cell Physiol* 2006; 207: 322-30.
- Carmona-Cuenca I, Roncero C, Sancho P, Caja L, Fausto N, Fernández M, Fabregat I.** Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-b in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. *J Hepatol* 2008;49:965–76.
- Carpenter, G.** Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signalling pathways. *J. Cell Biol.* 1999; 146, 697–702.
- Carr BI, Huang TH, Itakura K, Noël M, Marceau N.** TGF beta gene transcription in normal and neoplastic liver growth. *J Cell Biochem.* 1989 Apr;39(4):477-87
- Castilla A., J. Prieto & N. Fausto:** Transforming growth factors-beta1 and alfa in chronic liver disease: effects of interferon alfa therapy. *N Engl J Med* 1991; 324, 933- 940
- Chea, H.K., Wright, C.V., and Swalla, B.J.** Nodal signaling and the evolution of deuterostome gastrulation. *Dev. Dyn.* 2005; 234:269–278.
- Chen, X., Rubock, M. J. & Whitman, M.** A transcriptional partner of MAD proteins in TGF- $\beta$  signalling. *Nature* 1996; 383, 691–696
- Chen YG, F. Liu, J. Massague,** Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12, *EMBO J.* 1997;16:3866–3876
- Chen RH, Su YH, Chuang RL, Chang TY.** Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene* 1998;17:1959–1968.
- Chen K, Vita JA, Berk BC, Keaney JF Jr.** c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* 2001; 276(19):16045-50

- Chen H, Ma N, Xia J, Liu J y Xu Z.**  $\beta$ 2-Adrenergic receptor-induced transactivation of epidermal growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor via Src kinase promotes rat cardiomyocyte survival. *Cell Biology International* 2012; 36, 237–244
- Cheung RS, Brooling JT, Johnson MM, Riehle KJ, Campbell JS, Fausto N.** Interactions between MYC and transforming growth factor alpha alter the growth and tumorigenicity of liver progenitor cells. *Carcinogenesis* 2007; 28: 2624-2631
- Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A. B., Ebb, R. G., Gallo, G. J., Elangovan, B., Chinnadurai, G. and Lutz, R.J.** A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* 1995;14, 5589-5596
- Chiu CC, Huang GT, Chou SH, Chien CT, Chiou LL, Chang MH, et al.** Characterization of cytokeratin 19-positive hepatocyte foci in the regenerating rat liver after 2-AAF/CCl4 injury. *Histochem Cell Biol* 2007;128:217–226.
- Choi KS, Lim IK, Brady JN, Kim S-J.** ICE-like protease (caspase) is involved in transforming growth factor beta-1-mediated apoptosis in FaO rat hepatoma cell line. *Hepatology* 1998;27:415-421.
- Choi SS, Diehl AM.** Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Choi SS, Diehl AM. Hepatology.* 2009 Dec;50(6):2007-13
- Christensen, J. G., Gonzales, A. J., Cattley, R. C., and Goldsworthy, T. L.** Regulation of apoptosis in mouse hepatocytes and alteration of apoptosis by nongenotoxic carcinogens. *Cell Growth Differ.* 1998; 9, 815–825
- Cicchini C, Filippini D, Coen S, Marchetti A, Cavallari C, Laudadio I, Spagnoli FM, Alonzi T, Tripodi M.** Snail controls differentiation of hepatocytes by repressing HNF4alpha expression. *J Cell Physiol.* 2006 Oct;209(1):230-8.
- Cicchini C, Laudadio I, Citarella F, Corazzari M, Steindler C, Conigliaro A, Fantoni A, Amicone L, Tripodi M:** TGFb-induced EMT requires focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Exp Cell Res* 2008, 314:143-152.
- Citri A., Yarden Y.** EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 505-16.
- Clague, MJ, Urbe S.** Endocytosis: the DUB version. *Trends Cell Biol.* 2006; 16, 551–559
- Clark JB, Rice L, Sadiq T, Brittain E, Song L, Wang J, Gerber DA.** Hepatic progenitor cell resistance to TGF-beta1's proliferative and apoptotic effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 337-344
- Clotman, F., Lannoy, V. J., Reber, M., Cereghini, S., Cassiman, D., Jacquemin, P., Roskams, T., Rousseau, G. G. and Lemaigre, F. P.** (2002) The Onecut transcription factor HNF-6 is required for normal development of the biliary tract. *Development* 129, 1819±1828
- Collignon, J., Varlet, I., and Robertson, E.J.** Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature* 1996;381:155–158.
- Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschuere K, van Grunsvan L, Bruyneel E, et al.** The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 2001; 7:1267-78.#
- Comoglio PM.** Structure, biosynthesis and biochemical properties of the HGF receptor in normal and malignant cells. *EXS* 1993; 65:131-165
- Comoglio PM.** Pathway specificity for Met signalling. *Nat Cell Biol* 2001; 3 (7):E161-162.
- Comoglio PM, Trusolino L.** Invasive growth: from development to metastasis. *J Clin Invest* 2002;109 (7):857-862.
- Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM Jr, Ko TC, Luo K:** Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-b induced apoptosis. *Nat Cell Biol* 2004, 6:366-372
- Costa RH, Kalinichenko VV, Holterman AXL, Wang X1.** Transcription Factors in Liver Development, Differentiation, and Regeneration *Hepatology.* 2003 Dec;38(6):1331-47.
- Coyle B, Freathy C, Gant TW, Roberts RA, Cain K.** Characterization of the transforming growth factor-beta 1-induced apoptotic transcriptome in FaO hepatoma cells. *J Biol Chem* 2003 278:5920–5928.
- Dabeva MD, Alpini G, Hurston E, Shafritz DA.** Models for hepatic progenitor cell activation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993;204:242–252
- Dabeva MD, Hurston E, Shafritz DA.** Transcription factor and liver specific messenger RNA expression in facultative epithelial progenitor cells of liver and pancreas. *Am J Pathol* 1995; 147:1633– 1648
- Dahlke MH, Popp FC, Bahlmann FH, Aselmann H, Jager MD, Neipp M, et al.** Liver regeneration in a retrorsine/CCl4-induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute? *J Hepatol* 2003;39:365–373.
- Dai C, Liu Y.** Hepatocyte growth factor antagonizes the profibrotic action of TGF-b1 in mesangial cells by stabilizing Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15:1402-1412
- Daly AC, Randall RA, Hill CS.** Transforming growth factor b-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol* 2008, 28:6889-6902.

- Danial NN, Korsmeyer SJ.** Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116, 205-219.
- Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH** Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev.* 2008 Apr;34(2):122-36
- Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, Müller D.** Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol.* 2004 Dec 6;167(5):935-44. Epub 2004 Nov 29.
- Davies M, Robinson M, Smith E, et al.** Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. *J Cell Biochem* 2005;95:918-931
- De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A.** Transforming growth factor beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997; 26: 886-893.
- de Caestecker MP, Parks WT, Frank CJ, Castagnino P, Bottaro DP, Roberts AB, Lechleider RJ:** Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev* 1998, 12:1587-1592 #
- De Craene B, Gilbert B, Stove C, Bruyneel E, van Roy F, Berx G.** The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res* 2005; 65:6237-44.
- De Craene B, van Roy F, Berx G.** Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal.* 2005 May;17(5):535-47
- de Juan C, Benito M, Alvarez A, Fabregat I.** Differential proliferative response of cultured fetal and regenerating hepatocytes to growth factors and hormones. *Exp Cell Res* 1992a; 202: 495-500
- de Juan C, Benito M, Fabregat I.** Regulation of albumin expression in fetal rat hepatocytes cultured under proliferative conditions: role of epidermal growth factor and hormones. *J Cell Physiol* 1992b; 152: 95-101
- De Vos R, Desmet V.** Ultrastructural characteristics of novel epithelial cell types identified in human pathologic liver specimens with chronic ductular reaction. *Am J Pathol* 1992 Jun;140(6):1441-50.
- del Castillo G, Murillo MM, Alvarez-Barrientos A, Bertran E, Fernández M, Sánchez A, Fabregat I.** Autocrine production of TGF-beta confers resistance to apoptosis after an epithelial-mesenchymal transition process in hepatocytes: Role of EGF receptor ligands. *Exp Cell Res.* 2006 Sep 10;312(15):2860-71.
- del Castillo G, Factor VM, Fernández M, Alvarez-Barrientos A, Fabregat I, Thorgeirsson SS, Sánchez A.** Deletion of the Met tyrosine kinase in liver progenitor oval cells increases sensitivity to apoptosis in vitro. *Am J Pathol* 2008a; 172: 1238-1247
- del Castillo G, Alvarez-Barrientos A, Carmona-Cuenca I, Fernández M, Sánchez A, Fabregat I.** Isolation and characterization of a putative liver progenitor population after treatment of fetal rat hepatocytes with TGF-beta. *J Cell Physiol* 2008b; 215: 846-855
- Delgado JP, Vanneaux V, Branger J, Touboul T, Sentilhes L, Mainot S, Lainas P, Leclerc P, Uzan G, Mahieu-Caputo D, Weber A.** The role of HGF on invasive properties and repopulation potential of human fetal hepatic progenitor cells. *Exp Cell Res* 2009; 315: 3396-3405
- Derynck R, Zhang YE.** Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003 Oct 9;425(6958):577-84
- Derynck, R.J. Akhurst, A. Balmain,** TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression, *Nat. Genet.* 2001; 29: 117-129.
- Dezso K, Jelnes P, Laszlo V, Baghy K, Bodor C, Paku S, et al.** Thy-1 is expressed in hepatic myofibroblasts and not oval cells in stem cell mediated liver regeneration. *Am J Pathol* 2007;171:1529-1537.
- Dicker P, Rozengurt E.** Phorbol esters and vasopressin stimulate DNA synthesis by a common mechanism. *Nature* 1980; 287: 607-612.
- Dickson RB, Lippman ME.** Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocrin. Rev.* 1987; 8, 29-43
- Dikic I.** Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:1178-1181
- Dollé L, Best J, Mei J, Al Battah F, Reynaert H, van Grunsven LA, Geerts A.** The quest for liver progenitor cells: a practical point of view. *J Hepatol.* 2010 Jan;52(1):117-29.
- Dong H-H, Xiang S, Chen X-P, Liang H-F, Zhang W, Jing K, Zhang W, Zhang W-G, Chen L.** The Epithelial-Mesenchymal Transition Promotes Transdifferentiation of Subcutaneously Implanted Hepatic Oval Cells Into Mesenchymal Tumor Tissue *STEM CELLS AND DEVELOPMENT* Volume 18, Number 9, 2009, 1293-1298
- Dooley S, Streckert M., Delvoux B., Gressner AM.** Expression of Smad during in vivo transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblasts *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 283, 554-562

- Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, et al.** Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001; 502: 4–10.
- Dooley S, Hamzavi J, Ciucian L, Godoy P, Ilkavets I, Ehnert S, et al.** Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF- $\beta$ - mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology*.2008;135(2):642 – 59.
- Draghi E, Armato U, Andreis PG, Mengato L.** 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. *J Cell Physiol* 1980; 103: 129-147
- Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R,** Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase, *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 10618–10624.
- Dubreux-Daloz L, Dupoux A, Cartier J.** IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle.* 2008 Apr 15;7(8):1036-46.
- Dudas J, Mansuroglu T, Batusic D, Saile B, Ramadori G.** Thy-1 is an in vivo and in vitro marker of liver myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 2007;329:503–514.
- Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, and Quail EA.** Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; 23 (3):435-445.
- Duncan AW, Dorrel C., Grompe M.** Stem Cells and Liver Regeneration. *Gastroenterology.* 2009 August ; 137(2): 466–481.
- Earp HS, O'Keefe EJ.** Epidermal growth factor receptor number decreases during rat liver regeneration. *J Clin Invest.* 1981;67(5):1580-3
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K.** Smurf1 interacts with transforming growth factor-b type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 2001, 276:12477-12480.
- Edlund S, Bu S, Schuster N, et al.** Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Mol Biol Cell* 2003;14:529–544
- Eger A, Stockinger A, Park J, Langkopf E, Mikula M, Gotzmann J, et al.** beta-Catenin and TGF-beta signalling cooperate to maintain a mesenchymal phenotype after FosER-induced epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* 2004; 23:2672-80.
- Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, et al.** DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005; 24:2375-85. #
- Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL.** Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem* 1999;274:37413–37420
- Engelhardt NV, Baranov VN, Lazareva MN, Goussev AI.** Ultrastructural localisation of alpha-fetoprotein (AFP) in regenerating mouse liver poisoned with CCL4. 1. Reexpression of AFP in differentiated hepatocytes. *Histochemistry* 1984;80:401–407.
- Engelhardt NV, Factor VM, Yasova AK, Poltoranina VS, Baranov VN, Lasareva MN.** Common antigens of mouse oval and biliary epithelial cells. Expression on newly formed hepatocytes. *Differentiation* 1990;45:29–37.
- Erker L, Grompe M.** Signaling networks in hepatic oval cell activation. *Stem Cell Res* 2007;1:90–102.
- Evarts RP, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson SS.** In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res* 1989; 49:1541 – 1547
- Evarts RP, Nakatsukasa H, Marsden ER, Hu Z, Thorgeirsson SS.** Expression of transforming growth factor-alpha in regenerating liver and during hepatic differentiation. *Mol Carcinog* 1992; 5: 25-31
- Evarts RP, Hu Z, Fujio K, Marsden ER, Thorgeirsson SS.** Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor alpha, hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation. *Cell Growth Differ* 1993; 4: 555-561
- Fabregat I.** Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells *World J Gastroenterol* 2009 February 7; 15(5): 513-520
- Fabregat I, Sánchez A, Alvarez AM, Nakamura T, Benito M.** Epidermal growth factor, but not hepatocyte growth factor, suppresses the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocytes in primary culture. *FEBS Lett* 1996; 384: 14-18
- Fabregat I, Herrera B, Fernández M, Alvarez AM, Sánchez A, Roncero C, Ventura JJ, Valverde AM, Benito M.** Epidermal growth factor impairs the cytochrome C/caspase-3 apoptotic pathway induced by transforming growth

factor beta in rat fetal hepatocytes via a phosphoinositide 3-kinase-dependent pathway. *Hepatology* 2000; 32(3):528-35

**Factor VM, Radaeva SA, Thorgeirsson SS.** Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol* 1994;145:409-422.

**Faktor VM, Engel'gardt NV, Iazova AK, Lazareva MN, Poltoranina VS, Rudinskaia TD.** Common antigens of oval cells and cholangiocytes in the mouse. Their detection by using monoclonal antibodies. *Ontogenez*. 1990 Nov-Dec;21(6):625-32

**Falkowski O, An HJ, Ianus IA, Chiriboga L, Yee H, West AB, et al.** Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intrabiliary stem cells. *J Hepatol* 2003;39:357-364.

**Fan JH, Shen H, Dai QM, Minuk GY, Burzynski FJ, Gong YW.** Bone morphogenetic protein-4 induced rat hepatic progenitor cell (WB-F344 cell) differentiation toward hepatocyte lineage. *J Cell Physiol* 2009; 220:72-81

**Fausto N, Campbell JS.** The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003; 120: 117-130.

**Fausto N, Mead JE, Gruppuso PA, Braun L.** TGF-beta in liver development, regeneration, and carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;593:231-42

**Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ.** Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43:S45 - 53

**Feng XH, Derynck R.** Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005; 21, 659-693.

**Ferracini R, Longati P, Naldini L, Vigna E, Comoglio PM.** Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1991; 266 (29):19558-19564.

**Fiegel HC, Gluer S, Roth B, Rischewski J, von Schweinitz D, Ure B, et al.** Stem-like cells in human hepatoblastoma. *J Histochem Cytochem* 2004;52:1495-1501.

**Fodde R, Brabletz T.** Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:150-158 #

**Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkent inPI, et al.** Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998;338:1422-1426.

**Franke WW.** Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Sep;1(3):a003061

**Franklin CC, Rosenfeld-Franklin ME, White C, Kavanagh TJ, Fausto N.** TGFbeta1-induced suppression of glutathione antioxidant defenses in hepatocytes: caspase-dependent post-translational and caspase-independent transcriptional regulatory mechanisms. *FASEB J* 2003;17:1535-1537.

**Freathy C, Brown DG, Roberts RA, Cain K.** Transforming growth factor-beta1 induces apoptosis in rat FaO hepatoma cells via cytochrome c release and oligomerization of Apaf-1 to form a 700-kd apoptosome caspase-processing complex. *Hepatology* 2000;32:750-760.

**Frey RS, Mulder KM.** Involvement of extracellular signal-regulated kinase 2 and stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase activation by transforming growth factor beta in the negative growth control of breast cancer cells. *Cancer Res* 1997;57:628-633.

**Frey RS, Mulder KM.** TGFbeta regulation of mitogen-activated protein kinases in human breast cancer cells. *Cancer Lett* 1997;117:41-50.

**Fujio K, Evarts RP, Hu Z, Marsden ER, Thorgeirsson SS.** Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab Invest* 1994;70:511-516.

**Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF.** Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 2000; 19 (49):5582-5589.

**Fuxe J, Vincent T, Garcia de Herrerros A.** Transcriptional crosstalk between TGF-beta and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle*. 2010 Jun 15;9(12):2363-74

**Gadella TW, Jovin TM.** Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J. Cell Biol.* 1995; 129, 1543-1558.

**Gallier-Beckley AJ, Schiemann WP:** Grb2 binding to Tyr284 in Tbr-II is essential for mammary tumor growth and metastasis stimulated by TGF-b. *Carcinogenesis* 2008, 29:244-251 #

**Gao CF, Vande Woude GF.** HGF/SF-Met signaling in tumor progression. *Cell Res* 2005 15 (1):49-51.

**Gaudino G, Follenzi A, Naldini L, Collesi C, Santoro M, Gallo KA, Godowski PJ, Comoglio PM.** RON is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP. *EMBO J*. 1994 Aug 1;13(15):3524-32.

- Germain S, Howell M, Esslemont GM, Hill CS.** Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated SMADs to distinct promoter elements via a common SMAD interaction motif. *Genes Dev.* 2000;14, 435–451
- Gherardi E, Gonzalez Manzano R, Cottage A, Hawker K, Aparicio S.** Evolution of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). *Ciba Found Symp.* 1997;212:24–35; discussion 35–41, 42–5
- Giannelli G, Bergamini C, Fransvea E, Sgarra C, Antonaci S.** Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2005 Nov;129(5):1375–83.
- Gilcrease MZ.** Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett.* 2007 Mar 8;247(1):1–25
- Gilyarov AV.** Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol* 2008;38:165–169.
- Gleiberman AS, Encinas JM, Mignone JL, Michurina T, Rosenfeld MG, Enikolopov G.** Expression of nestin-green fluorescent protein transgene marks oval cells in the adult liver. *Dev Dyn.* 2005 Oct;234(2):413–21.
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J.** NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(11):1493–505
- Gohda E, Matsunaga T, Kataoka H, Takebe T, Yamamoto I.** Induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts by epidermal growth factor, platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor. *Cytokine* 1994; 6 (6):633–640.
- Gómez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS.** Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2008 May 23;283(21):14581–9.
- Gomis RR, Alarcon C, He W, et al.** A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12747–12752
- Gordon KJ, Blobe GC.** Role of transforming growth factor- $\beta$  superfamily signaling pathways in human disease *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1782:197–228
- Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW.** Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* 2000;156:607–619.
- Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S, ten Dijke P.** Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGF $\beta$ /ALK5 signaling. *Mol Cell* 2003, 12:817–828.
- Grasl-Kraupp B, Rossmannith W, Ruttkay-Nedecky B, Müllauer L, Kammerer B, Bursch W, Schulte-Hermann R** Levels of transforming growth factor beta and transforming growth factor beta receptors in rat liver during growth, regression by apoptosis and neoplasia. *Hepatology.* 1998 Sep;28(3):717–26
- Green KJ, Getsios S, Troyanovsky S, Godsel LM.** Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Feb;2(2):a000125
- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ.** The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008 May;10(5):593–601.
- Griffith, O.W.** Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 1980; 106: 207–212.
- Grompe M.** The Origin of Hepatocytes. *Gastroenterology* 2005; 128: 2158–2160.
- Grotegut S, Kappler R, Tarimoradi S, Lehembre F, Christofori G, Von Schweinitz D.** Hepatocyte growth factor protects hepatoblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis by AKT activation. *Int J Oncol.* 2010 May;36(5):1261–7.
- Gruenberg J, Stenmark H.** The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:317–323
- Grunert S, Jechlinger M, Beug H.** Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nature reviews* 2003; 4:657–65.
- Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A.** The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004 4(5):361–70
- Guaïta S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, Sancho E, Dedhar S, De Herreros AG, Baulida J.** Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39209–16
- Guerrero J, Santibañez JF, González A, y Martínez J.** EGF receptor transactivation by urokinase receptor stimulus through a mechanism involving Src and matrix metalloproteinases *Experimental Cell Research* 2004; 292: 201–208

- Guo A, Villén J, Kornhauser J, Lee KA, Stokes MP, Rikova K, Possemato A, Nardone J, Innocenti G, Wetzel R, Wang Y, MacNeill J, Mitchell J, Gygi SP, Rush J, Polakiewicz RD, Comb MJ.** Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jan 15;105(2):692-7
- Guo X, Ramirez A, Waddell DS, Li Z, Liu X, Wang XF.** Axin and GSK3- control Smad3 protein stability and modulate TGF- $\beta$  signaling. *Genes Dev* 2008a, 22:106-120.
- Guo X, Waddell DS, Wang W, Wang Z, Liberati NT, Yong S, Liu X, Wang XF:** Ligand-dependent ubiquitination of Smad3 is regulated by casein kinase 1  $\gamma$  2, an inhibitor of TGF- $\beta$  signaling. *Oncogene* 2008b, 27:7235-7247.
- Gur G, Rubin C, Katz M, Amit I, Citri A, Nilsson J, Amariglio N, Henriksson R, Rechavi G, Hedman H, Wides R, Yarden Y.** LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *EMBO J.* 2004; 23, 3270–3281.
- Hacker HJ, Steinberg P, Toshkov I, Oesch F, Bannasch P.** Persistence of the cholangiocellular and hepatocellular lesions observed in rats fed a choline-deficient/ DL-ethioninesupplemented diet. *Carcinogenesis* 1992; 13:271 – 276
- Hammond DE, Urbe S, Vande Woude GF, Clague MJ.** Down-regulation of MET, the receptor for hepatocyte growth factor. *Oncogene* 2001; 20 (22):2761-2770
- Hanada N, Lo HW, Day CP, Pan Y, Nakajima Y, Hung MC.** Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcinog* 2006;45: 10–7 #
- Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, et al.** Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor- $\beta$ -induced gene expression. *J Biol Chem* 1999;274:27161–27167
- Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Nishida E.** Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signaling pathway. *Nature Cell Biol.* 2002; 4, 850–858.
- Hartmann G, Prospero T, Brinkmann V, Ozelik C, Winter G, Hepple J, Batley S, Bladt F, Sachs, Birchmeier MC, Birchmeier W, Gherardi E.** Engineered mutants of HGF/SF with reduced binding to heparan sulphate proteoglycans, decreased clearance and enhanced activity in vivo. *Curr Biol* 1998; 8 (3):125-134.
- Hartwell KA, Muir B, Reinhardt F, Carpenter AE, Sgroi DC, Weinberg RA.** The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis *PNAS* December 12, 2006 vol. 103 no. 50 18969-18974
- Hatch HM, Zheng D, Jorgensen ML, Petersen BE.** SDF-1 $\alpha$ /CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells* 2002;4:339–351.
- Hay ED.** An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel).*1995 154:8–20.
- Hay ED, Zuk A.** Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am. J. Kidney Dis.* 1995 26:678–690.
- He XY, Smith GJ, Enno A, Nicholson RC.** Short-term diethylnitrosamineinduced oval cell responses in three strains of mice. *Pathology* 1994;26:154–160
- He ZP, Tan WQ, Tang YF, Feng MF.** Differentiation of putative hepatic stem cells derived from adult rats into mature hepatocytes in the presence of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor. *Differentiation* 71:281-290
- Heldin CH, Landström, Moustakas A.** Mechanism of TGF- $\beta$  signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial–mesenchymal transition. *Current Opinion in Cell Biology* 2009, 21:166–176
- Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M.** The metastasis associated protein S100A4: Role in tumour progression and metastasis. *Br. J. Cancer.* 2005;92:1955
- Herrera B, Alvarez AM, Sánchez A, Fernández M, Roncero C, Benito M, Fabregat I.** Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J.* 2001a Mar;15(3):741-51.
- Herrera B, Fernández M, Alvarez AM, Roncero C, Benito M, Gil J, Fabregat I.** Activation of caspases occurs downstream from radical oxygen species production, Bcl-xL down-regulation, and early cytochrome C release in apoptosis induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes. *Hepatology* 2001b ;34:548–556.
- Herrera B, Fernández M, Roncero C, Ventura JJ, Porrás A, Valladares A, Benito M, Fabregat I.** Activation of p38MAPK by TGF- $\beta$  in fetal rat hepatocytes requires radical oxygen production, but is dispensable for cell death. *FEBS Lett.* 2001c Jun 22;499(3):225-9
- Herrera B, Fernández M, Benito M, Fabregat I.** cIAP-1, but not XIAP, is cleaved by caspases during the apoptosis induced by TGF- $\beta$  in fetal rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 2002 Jun 5;520(1-3):93-6.
- Herrera B, Murillo MM, Alvarez-Barrientos A, Beltrán J, Fernández M, Fabregat I.** Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor- $\beta$  in fetal rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med.* 2004a Jan 1;36(1):16-26.
- Herrera B, Alvarez AM, Beltrán J, Valdés F, Fabregat I, Fernández M.** Resistance to TGF- $\beta$ -induced apoptosis in regenerating hepatocytes. *J Cell Physiol.* 2004b Dec;201(3):385-92.

- Higgins GM, Anderson RM** . Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol Lab Med* 1931;12:186–202.
- Ho J, Cocolakis E, Dumas VM, Posner BI, Laporte SA, Lebrun JJ**. The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction. *Embo J*. 2005 ; Sep 21;24(18):3247-58
- Hocevar BA, Brown TL, Howe PH**. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun Nterminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* 1999;18:1345–1356
- Hogan BL, Kolodziej PA**. Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 2002; 3:513–523.
- Holic N, Suzuki T, Corlu A, Couchie D, Chobert MN, Guguen- Guillouzo C, Laperche Y**. Differential expression of the rat gamma-glutamyl transpeptidase gene promoters along with differentiation of hepatoblasts into biliary or hepatocytic lineage. *Am J Pathol* 2000; 157:537 – 548
- Holt MP, Cheng L, Ju C**. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. *J Leukoc Biol* 2008;84:1410–1421
- Horiguchi N, Takayama H, Toyoda M, Otsuka T, Fukusato T, Merlino G, Takagi H, Mori M**. Hepatocyte growth factor promotes hepatocarcinogenesis through c-Met autocrine activation and enhanced angiogenesis in transgenic mice treated with diethylnitrosamine. *Oncogene*. 2002 Mar 14;21(12):1791-9.
- Hu Z, Evarts RP, Fujio K, Marsden ER, Thorgerisson SS**. Expression of hepatocyte growth factor and c-met genes during hepatic differentiation and liver development in the rat. *Am J Pathol* 1993; 142: 1823-1830
- Huff JL, Jelinek MA, Borgman CA, Lansing TJ, Parsons JT**. The protooncogene c-sea encodes a transmembrane protein-tyrosine kinase related to the Met/hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (13):6140-6144.
- Hughes RD, Mistry RR, Dhawan A**. Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation*. 2012 Feb 27;93(4):342-7
- Hugo HJ, Kokkinos MI, Blick T, Ackland ML, Thompson EW, Newgreen DF**. Defining the E-Cadherin Repressor Interactome in Epithelial-Mesenchymal Transition: The PMC42 Model as a Case Study. *Cells Tissues Organs* 2011;193:23-40
- Huh CG, Factor VM, Sánchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgerisson SS**. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4477-4482
- Hyman KM, Seghezzi G, Pintucci G, Stellari G, Kim JH, Grossi EA, Galloway AC, Mignatti P**. Transforming growth factor-beta1 induces apoptosis in vascular endothelial cells by activation of mitogen-activated protein kinase. *Surgery*. 2002 Aug;132(2):173-9.
- Ichinohe N, Kon J, Sasaki K, Nakamura Y, Ooe H, Tanimizu N, Mitaka T**. Growth ability and repopulation efficiency of transplanted hepatic stem cells, progenitor cells, and mature hepatocytes in retrorsine-treated rat livers. *Cell Transplant*. 2012;21(1):11-22.
- Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S.J**. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *Cell Sci*. 2003 May 15;116(Pt 10):1959-67
- Inayat-Hussain SH, Couet C, Cohen GM, Cain K**. Processing/activation of CPP32-like proteases is involved in transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 1997;25:1516–1526.
- Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS**. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity, *Mol. Cell* 2002;10: 283–294.
- Isfort RJ, Cody DB, Richards WG, Yoder BK, Wilkinson JE, Woychik RP**. Characterization of growth factor responsiveness and alterations in growth factor homeostasis involved in the tumorigenic conversion of mouse oval cells. *Growth Factors* 1998; 15: 81-94
- Ishikawa T, Factor VM, Marquardt JU, Raggi C, Seo D, Kitade M, Conner EA, Thorgerisson SS**. Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice. *Hepatology*. 2012 Apr;55(4):1215-26. doi: 10.1002/hep.24796
- Itoh S, ten Dijke P**. Negative regulation of TGF-b receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 2007, 19:176-184.
- Itoh S, Thorikay M, Kowanetz M, et al**. Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses. *J Biol Chem* 2003;278:3751–3761
- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T. M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E. G**. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Investig.* 2002; 110, 341–350

- Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, et al.** Ras and TGF- $\beta$  cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 2002;156:299-313.
- Jechlinger M, Grunert S, Beug H.** Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2002; 7:415-432
- Jeffers M, Rao MS, Rulong S, Reddy JK, Subbarao V, Hudson E, Vande Woude GF, Resau JH.** Hepatocyte growth factor/ scatter factor-Met signaling induces proliferation, migration, and morphogenesis of pancreatic oval cells. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 1805-1813
- Jeffers M, Taylor GA, Weidner KM, Omura S, Vande Woude GF. Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol*. 1997 Feb;17(2):799-808.
- Jelnes P, Santoni-Rugiu E, Rasmussen M, Friis SL, Nielsen JH, Tygstrup N, Bisgaard HC.** Remarkable heterogeneity displayed by oval cells in rat and mouse models of stem cell-mediated liver regeneration. *Hepatology* 2007; 45: 1462-1470.
- Jo M, Stolz DB, Esplen JE, Dorko K, Michalopoulos GK, Strom SC.** Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J Biol Chem* 2000; 275, 8806-8811
- Johnson M, Koukoulis G, Matsumoto K, Nakamura T, Iyer A.** Hepatocyte growth factor induces proliferation and morphogenesis in nonparenchymal epithelial liver cells. *Hepatology* 1993; 17: 1052-1061
- Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW.** Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 2003; 284(1):31-53.
- Jozic D, Cárdenes N, Deribe YL, Moncalián G, Hoeller D, Groemping Y, Dikic I, Rittinger K, Bravo J.** Cbl promotes clustering of endocytic adaptor proteins. *Nature Struct. Mol. Biol.* 2005; 12, 972-979
- Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E, Koteish A.** Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 2007; 282:22089- 101 #
- Kalluri R., Neilson EG.** Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2003 12:1776-1784.
- Kalluri R , Weinberg RA.** The basics of epithelial-mesenchymal transition *J. Clin. Invest.* 2009; 119:1420-1428
- Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A.** Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 2001; 492: 90-94
- Kamiya A, Gonzalez FJ, Nakauchi H.** Identification and differentiation of hepatic stem cells during liver development. *Frontiers in Bioscience* 2006; 11: 1302-10.
- Kanda D, Takagi H, Toyoda M, Horiguchi N, Nakajima H, Otsuka T, Mori M.** Transforming growth factor alpha protects against Fas-mediated liver apoptosis in mice. *FEBS Lett.* 2002; 519(1-3):11-5
- Kang JS, Saunier EF, Akhurst RJ, Derynck R.** The type I TGF- $\beta$  receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. *Nat Cell Biol* 2008, 10:654-664.
- Kannan R, Jin M, Gamulescu M-A, Hinton D.** Role of catalase in ceramide-induced apoptosis and its protection by hepatocyte growth factor *Free Radical Biology and Medicine* 2004;37:166-175. [PubMed: 15203188]
- Kantari C, Walczak H.** Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Apr;1813(4):558-63
- Kaposi-Novak P, Lee JS, Gomez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS.** Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest* 2006;116:1582-95.
- Karafiat V, Dvorakova M, Pajer P, Cermak V, Dvorak M.** Melanocyte fate in neural crest is triggered by Myb proteins through activation of c-kit. *Cell Mol. Life Sci.* 2007; 64:2975-2984.
- Karantza V.** Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene.* 2011 Jan 13;30(2):127-38
- Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, et al.** Hedgehog signalling in primate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 2004; 431:707-12.
- Karihaloo A., Nickel C, Cantley LG.** Signals which build a tubule. *Nephron Exp Nephrol* 2005; 100 (1):e40-45.
- Kario E, Marmor MD, Adamsky K, Citri A, Amit I, Amariglio N, Rechavi G, Yarden Y.** Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 2005; 280, 7038-7048
- Kato M, Yoshimura S, Kokuzawa J, Kitajima H, Kaku Y, Iwama T, Shinoda J, Kunisada T, Sakai N.** Hepatocyte growth factor promotes neuronal differentiation of neural stem cells derived from embryonic stem cells. *Neuroreport.* 2004; 15(1): 5-8.
- Kato H, Shimomura T, Murai R, Gonda K, Ishii K, Yoshida Y, Kanbe T, Hashiguchi K, Sakabe T, Takubo K, Okano J, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Shiota G.** Regulation of hepatic oval cell proliferation by

- adenoviral mediated hepatocyte growth factor gene transfer and signal transduction inhibitors. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 821-825
- Kaufmann T, Tai L, Ekert PG, Huang DC, Norris F, Lindemann RK, Johnstone RW, Dixit VM, Strasser A.** The BH3-only protein bid is dispensable for DNA damage- and replicative stress-induced apoptosis or cell-cycle arrest. *Cell* 2007; 129: 423–433
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL:** Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF $\beta$  receptor for degradation. *Mol Cell* 2000, 6:1365-1375.
- Kayanoki Y, Fujii J, Suzuki K, Kawata S, Matsuzawa Y, Taniguchi N.** Suppression of antioxidative enzyme expression by transforming growth factor-beta 1 in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1994; 269:15488–15492.
- Kenny PA.** Tackling EGFR signalling with TACE antagonists: a rational target for metalloprotease inhibitors in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11:1287–1298
- Kermorgant, S, Parker PJ.** c-Met signalling: spatio-temporal decisions. *Cell Cycle* 2005; 4 (3):352-355.
- Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris HA 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ.** Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25, 3230–3237
- Kim HG, Kassis J, Souto JC, Turner T, Wells, A.** EGF receptor signaling in prostate morphogenesis and tumorigenesis. *Histol. Histopathol.* 1999; 14, 1175–1182
- Kim BC, Mamura M, Choi KS, Calabretta B, Kim SJ.** Transforming growth factor beta 1 induces apoptosis through cleavage of BAD in a Smad3-dependent mechanism in FaO hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 2002; 22:1369–1378.
- Kim KY, Kim BC, Xu Z, Kim SJ.** Mixed lineage kinase 3 (MLK3)-activated p38 MAP kinase mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in hepatoma cells. *J Biol Chem.* 2004 Jul 9;279(28):29478-84
- Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA.** Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 29;103(35):13180-5
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME.** Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)—associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14: 5579–5588
- 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.** Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy. *Gastroenterology* 2003; 124: 701-707.
- Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, Yarden Y.** The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999; 96, 4995–5000
- Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T, Abraham LJ, Yu C, Rhim JA, Fausto N.** Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J Exp Med* 2000; 192:1809 – 1818  
**Knight B, Matthews VB, Olynyk JK, Yeoh GC.** Jekyll and Hyde: evolving perspectives on the function and potential of the adult liver progenitor (oval) cell. *BioEssays* 2005; 27: 1192-1202.
- Knight B, Tirnitz-Parker JE, Olynyk JK.** C-kit inhibition by imatinib mesylate attenuates progenitor cell expansion and inhibits liver tumor formation in mice. *Gastroenterology.* 2008 Sep;135(3):969-79, 979.e1.
- Knittel T, Aurisch S, Neubauer K, Eichhorst S, Ramadori G.** Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1996;149:449–462.
- Kobayashi E, Sasamura H, Mifune M, Shimizu-Hirota R, Kuroda M, Hayashi M, and Saruta T.** Hepatocyte growth factor regulates proteoglycan synthesis in interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 2003; 64: 1179–1188
- Kobayashi M, Yamamoto M,** Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme Regul.* 2006; 46 113–140.
- Kofman AV, Morgan G, Kirschenbaum A, Osbeck J, Hussain M, Swenson S, et al.** Dose- and time-dependent oval cell reaction in acetaminophen-induced murine liver injury. *Hepatology* 2005;41:1252–1261.
- Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K.** Snail is required for TGF $\beta$ -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Sci.* 2008 Oct 15;121(Pt 20):3317-24
- Kondo S, Kagami S, Urushihara M, Kitamura A, Shimizu M, Strutz F, Müller GA, Kuroda Y.** Transforming growth factor-beta1 stimulates collagen matrix remodeling through increased adhesive and contractive potential by human renal fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Aug 23;1693(2):91-100

- Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H, Nakamura T.** Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology* 1999; 30: 151-159
- Kosai KI, Finegold MJ, Thi-Huynh BT, Tewson M, Ou CN, Bowles N, Woo SL, Schwall RH, Darlington GJ.** Retrovirus mediated in vivo gene transfer in the replicating liver using recombinant hepatocyte growth factor without liver injury or partial hepatectomy. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1293-1301
- Kretzschmar M, Doody J, Massagué J.** Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* 1997;389:618-622
- Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massagué J.** A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 1999;13:804-816
- Kuwahara R, Kofman AV, Landis CS, Swenson ES, Barendsward E, Theise ND.** The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 2008;47:1994-2002.
- Laconi E, Sarma DS, Pani P.** Transplantation of normal hepatocytes modulates the development of chronic liver lesions induced by a pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine. *Carcinogenesis* 1995;16:139-142
- Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, et al.** Longterm, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998;153:319-329.
- Laederich MB, Funes-Duran M, Yen L, Ingalla E, Wu X, Carraway KL 3rd, Sweeney C.** The leucine-rich repeat protein LRIG1 is a negative regulator of ErbB family receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 2004; 279, 47050-47056.
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, (1970)
- Lahuna O, Rastegar M, Maiter D, Thissen JP, Lemaigre FP, Rousseau GG.** Involvement of STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) and HNF-4 (Hepatocyte Nuclear Factor-4) in the transcriptional control of the hnf-6 gene by growth hormone. *Mol. Endocrinol.* 2000; 14, 285-294
- Lai AZ, Abella JV, Park M.** Crosstalk in Met receptor oncogenesis *Trends in Cell Biology* 2009; Vol.19 No.10, 542-551
- Laird AD, Brown PI, Fausto N.** Inhibition of tumor growth in liver epithelial cells transfected with a transforming growth factor alpha antisense gene. *Cancer Res.* 1994 Aug 1;54(15):4224-32.
- Lamouille S, Derynck R:** Cell size and invasion in TGF-b-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol* 2007, 178:437-451.
- Landry C, Clotman F, Hioki T, OdaH, Picard JJ, Lemaigre FP, Rousseau GG** HNF-6 is expressed in endoderm derivatives and nervous system of the mouse embryo and participates to the cross-regulatory network of liver enriched transcription factors. *Dev. Biol.* 1997; 192, 247-257
- Laping NJ, Olson BA, Ho T, Ziyadeh FN, Albrightson CR.** Hepatocyte growth factor: a regulator of extracellular matrix genes in mouse mesangial cells. *Biochem Pharmacol.* 2000 Apr 1;59(7):847-53.
- Laszlo V, Dezso K, Baghy K, Papp V, Kovalszky I, Safrany G, Thorgeirsson SS, Nagy P, Paku S** Triiodothyronine accelerates differentiation of rat liver progenitor cells into hepatocytes. *Histochem Cell Biol* 2008; 130:1005-1014
- Lazarevich NL, Cheremnova OA, Varga EV, Ovchinnikov DA, Kudrjavitseva EI, Morozova OV, Fleishman DI, Engelhardt NV, Duncan SA.** Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors. *Hepatology.* 2004 Apr;39(4):1038-47
- Lazaro CA, Rhim JA, Yamada Y, Fausto N.** Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture. *Cancer Res* 1998; 58:5514 - 5522
- LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N.** Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003; 299: 890-893
- Lee JH, Ilic Z, Sell S.** Cell kinetics of repair after allyl alcohol-induced liver necrosis in mice. *Int J Exp Pathol* 1996;77:63-72.
- Lee MS, Kim TY, Kim YB, Lee SY, Ko SG, Jong HS, Kim TY, Bang YJ, Lee JW.** The signaling network of transforming growth factor beta1, protein kinase Cdelta, and integrin underlies the spreading and invasiveness of gastric carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 2005 Aug;25(16):6921-36.
- Lee NY, Blobel GC.** The interaction of endoglin with beta-arrestin2 regulates transforming growth factor-beta-mediated ERK activation and migration in endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 2007; 282 21507-21517
- Lemire JM, Shiojiri N, Fausto N.** Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* 1991;139:535-552.

- Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, Engelman DM, Schlessinger J.** Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J.* 1997 Jan 15;16(2):281-94.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD.** CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60: 585-595
- Letai, A., Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ.** Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002 2, 183-192.
- Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B, Yarden Y.** c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* 1998 Dec 1;12(23):3663-74.
- Li S, Plowman GD, Buckley SD, Shipley GD.** Heparin inhibition of autonomous growth implicates amphiregulin as an autocrine growth factor for normal human mammary epithelial cells. *J. Cell Physiol.* 1992; 153, 103–111.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J.** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998 Aug 21;94(4):491-501.
- Li H, Jiang T, Lin Y, Zhao Z, Zhang N.** HGF protects rat mesangial cells from high-glucose-mediated oxidative stress. *Am J Nephrol.* 2006;26(5):519-30
- Liao JH, Chen JS, Chai MQ, Zhao S, Song JG.** The involvement of p38 MAPK in transforming growth factor beta1-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Cell Res* 2001;11:89–94.
- Libbrecht L, Roskams T.** Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:389–396.
- Libbrecht L, Roskams T.** Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:389–396.
- Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T.** Deep intralobular extension of human hepatic “progenitor cells” correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can “progenitor cells” migrate? *J Pathol* 2000; 192:373 – 378
- Liem KF Jr., Jessell TM, Briscoe J.** Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development* 2000; 127:4855–4866.
- Linggi B, Carpenter G.** ErbB-4 s80 intracellular domain abrogates ETO2-dependent transcriptional repression. *J Biol Chem* 2006;281: 25373–80 #
- Lipschutz JH.** Molecular development of the kidney: a review of the results of gene disruption studies. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 31:383–397.
- Liu Y.** New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Feb;21(2):212-22.
- Liu ML, Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK.** Collagenase pretreatment and the mitogenic effects of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-alpha in adult rat liver. *Hepatology* 1994; 19: 1521-1527
- Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, Albrecht U, Behringer RR, Bradley A.** Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet.* 1999 Aug;22(4):361-5.
- Lo RS, Massagué J.** Ubiquitin-dependent degradation of TGF- $\beta$ -activated SMAD2. *Nature Cell Biol.* 1999; 1, 472–478 (1999).
- Lo RS, Wotton D, and Massague J.** Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. *EMBO J* 20: 128–136, 2001.
- Loguercio C, Federico A.** Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 34:1-10.
- Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM.** Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene.* 1994 Jan;9(1):49-57.
- Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK.** Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* 1999;154:537–541.
- Luetkeke NC, Qiu TH, Fenton SE, Troyer KL, Riedel RF, Chang A, Lee DC.** Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development.* 1999 Jun;126(12):2739-50.
- Luo K, Stroschein SL, Wang W, Chen D, Martens E, Zhou S, Zhou Q.** The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF $\beta$  signaling. *Genes Dev.* 1999 Sep 1;13(17):2196-206
- Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL.** Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell Biol.* 1998; 106 1659–1665.
- Mailleux AA, Overholtzer M, Schmelzle T, Bouillet P, Strasser A, Brugge JS.** BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Dev Cell.* 2007 Feb;12(2):221-34

- Maina F, Hilton MC, Andres R, Wyatt S, Klein R, Davies AM.** Multiple roles for hepatocyte growth factor in sympathetic neuron development. *Neuron*. 1998 May;20(5):835-46
- Maina F, Panté G, Helmbacher F, Andres R, Porthin A, Davies AM, Ponzetto C, Klein R.** Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes. *Mol Cell*. 2001 Jun;7(6):1293-306.
- Mall FP.** A study of the structural unit of the liver. *Am J Anat*. 1906; 5:227-308.
- Mandache E, Vidulescu C, Gherghiceanu M, Dragomir P, Popescu LM.** Neoductular progenitor cells regenerate hepatocytes in severely damaged liver: a comparative ultrastructural study. *J Cell Mol Med* 2002; 6:59 – 73
- Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwaninger G, Zhou A, Miura N, Kutok JL, Hartwell K, Richardson AL, Weinberg RA.** Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007b Jun 12;104(24):10069-74
- Mann GB, Fowler KJ, Gabriel A, Nice EC, Williams RL, Dunn AR.** Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell*. 1993 Apr 23;73(2):249-61.
- Marcos A, Fisher RA, Ham JM, Shiffman ML, Sanyal AJ, Luketic VA, et al.** Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation* 2000;69:1375-1379.
- Margadant C, Sonnenberg A.** Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep*. 2010 Feb;11(2):97-105.
- Marquardt JU, Seo D, Gómez-Quiroz LE, Uchida K, Gillen MC, Kitade M, Kaposi-Novak P, Conner EA, Factor VM, Thorgeirsson SS.** Loss of c-Met accelerates development of liver fibrosis in response to CCl(4) exposure through deregulation of multiple molecular pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jun;1822(6):942-51
- Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK.** Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 143 1993; (3):949-958.
- Marshall A, Rushbrook S, Davies SE, Morris LS, Scott IS, Vowler SL, Coleman N, Alexander G.** Relation between hepatocyte G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2005; 128:33 – 42
- Martínez-Estrada OM, Cullerés A, Soriano FX, Peinado H, Bolós V, Martínez FO, Reina M, Cano A, Fabre M, Vilaró S.** The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J*. 2006 Mar 1;394(Pt 2):449-57.
- Massagué J.** TGFβ signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 1998 ; 67, 753-791
- Massagué J.** How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Dec;1(3):169-78
- Massagué J.** TGF β in Cancer Cell 2008; 134, July 25, 215-230
- Massagué J, Wotton D.** Transcriptional control by the TGF-β/SMAD signaling system. *EMBO J*. 2000 ; 19, 1745-1754
- Massague J, Blain SW, Lo RS.** TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders, *Cell* 200; 103 295-309.
- Massagué J, Seoane J, Wotton D.** Smad transcription factors. *Genes Dev*. 2005; 19, 2783-2810
- Matsuda Y, Matsumoto K, Ichida T, Nakamura T.** Hepatocyte growth factor suppresses the onset of liver cirrhosis and abrogates lethal hepatic dysfunction in rats. *J Biochem* 1995; 118: 643-649.
- Matsuda Y, Matsumoto K, Yamada A, Ichida T, Asakura H, et al.** Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology* 1997; 26: 81-89.
- Matsumoto K, Nakamura T.** Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. *Int J Cancer* 2006; 119 (3):477-483.
- Matsumoto K, Tajima H, Okazaki H, Nakamura T.** Negative regulation of hepatocyte growth factor gene expression in human lung fibroblasts and leukemic cells by transforming growth factor-beta 1 and glucocorticoids. *J Biol Chem*. 1992 Dec 15;267(35):24917-20.
- Matsumoto K., Tajima H, Okazaki H, Nakamura T.** Heparin as an inducer of hepatocyte growth factor. *J Biochem* 1993; 114 (6):820-826.
- Matsumoto K, Fujii H, Michalopoulos G, Fung JJ, Demetris AJ.** Human biliary epithelial cells secrete and respond to cytokines and hepatocyte growth factors in vitro: interleukin-6, hepatocyte growth factor and epidermal growth factor promote DNA synthesis in vitro. *Hepatology* 1994; 20: 376-382
- Matsumoto K, Okazaki H, Nakamura T.** Novel function of prostaglandins as inducers of gene expression of HGF and putative mediators of tissue regeneration. *J Biochem* 1995; 117 (2):458-464.

- Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F.** Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* 2004;430:226–231
- Matsuura I, Wang G, He D, Liu F.** Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3. *Biochemistry* 2005;44:12546–12553. #
- McGowan JA, Strain AJ, Bucher NL.** DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP. *J Cell Physiol* 1981; 108: 353-363
- Mead JE, Fausto N.** Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Mar;86(5):1558-62.
- Medici D, Hay ED, Olsen BR.** Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factorbeta3. *Mol. Biol. Cell.* 2008; 19:4875–4887.
- Merlin S, Pietronave S, Locarno D, Valente G, Follenzi A, Prat M.** Deletion of the ectodomain unleashes the transforming, invasive, and tumorigenic potential of the MET oncogene. *Cancer Sci.* 2009 Apr;100(4):633-8
- Meulmeester E, ten Dijke P.** The dynamic roles of TGF- $\beta$  in cancer *J Pathol* 2011; 223: 205–218
- Miao L, St Clair DK.** Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009 Aug 15;47(4):344-56
- Michalopoulos GK.** Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007; 213(2): 286-300
- Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R.** Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature.* 1995 Jul 27;376(6538):337-41.
- Minguet S, Cortegano I, Gonzalo P, Martínez-Marin JA, de Andrés B, Salas C, Melero D, Gaspar ML, Marcos MA.** A population of c-Kit(low)(CD45/TER119)- hepatic cell progenitors of 11-day postcoitus mouse embryo liver reconstitutes cell depleted liver organoids. *J Clin Invest* 2003; 112: 1152-1163
- Mitchell C, Nivison M, Jackson LF, Fox R, Lee DC, Campbell JS, Fausto N.** Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem* 2005; 280: 2562-2568.
- Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A, Kondo J, Morimoto Y, Kitamura N.** Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J Biol Chem* 1993; 268 (14):10024-10028
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T.** BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16 251–263
- Mizuno K., Nakamura T.** Molecular characteristics of HGF and the gene, and its biochemical aspects. *EXS* 1993; 65:1-29.
- Moghul A , Lin L, Beedle A, Kanbour-Shakir A, DeFrances MC, Liu Y, Zarnegar R.** Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones: evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. *Oncogene* 1994; 9 (7):2045-2052.
- Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L.** Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 1991; 67: 901-908
- Monvoisin A, Neaud V, De Lédinghen V, Dubuisson L, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmoulière A, Rosenbaum J.** Direct evidence that hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells is mediated by urokinase. *J Hepatol.* 1999 Mar;30(3):511-8
- Moumen A, Ieraci A, Patané S, Solé C, Comella JX, Dono R, Maina F.** Met signals hepatocyte survival by preventing Fas-triggered FLIP degradation in a PI3k-Akt-dependent manner. *Hepatology* 2007; 45: 1210-1217
- Moustakas A, Heldin CH.** Non-Smad TGF- $\beta$  signals. *J Cell Sci* 2005, 118:3573-3584.
- Moyano JV, Greciano PG, Buschmann MM, Koch M, Matlin KS. Autocrine transforming growth factor- $\beta$ 1 activation mediated by integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 regulates transcriptional expression of laminin-332 in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 2010 Nov 1;21(21):3654-68
- Mu D, Cambier S, Fjellbirkeland L, Baron JL, Munger JS, Kawakatsu H, Sheppard D, Broaddus VC, Nishimura SL.** The integrin  $\alpha$ v $\beta$ 8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- $\beta$ 1. *J. Cell Biol.* 2002; 157: 493–507.
- Munger JS, Harpel JG, Giancotti FG, Rifkin DB.** Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 1. *Mol Biol Cell.* 1998 Sep;9(9):2627-38.
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D.** The integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 binds and activates latent TGF  $\beta$  1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999; 96 319–328.

- Murillo MM, Carmona-Cuenca I, Del Castillo G, Ortiz C, Roncero C, Sánchez A, Fernández M, Fabregat I.** Activation of NADPH oxidase by transforming growth factor-beta in hepatocytes mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor ligands through a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Biochem J.* 2007 Jul 15;405(2):251-9
- Murillo MM, del Castillo G, Sanchez A, Fernandez M, Fabregat I.** Involvement of EGF receptor and c-Src in the survival signals induced by TGF- $\beta$ 1 in hepatocytes. *Oncogene.* 2005;24(28):4580 – 7.
- Musallam L, Ethier C, Haddad PS, Bilodeau M.** Role of EGF receptor tyrosine kinase activity in antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1360-G1369
- Muthuswamy SK., Gilman M, Brugge J.** Controlled dimerization of ErbB receptors provide evidence for differential signalling by homo- and heterodimers. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19, 6845–6857.
- Nagy P, Bisgaard HC, Thorgeirsson SS.** Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. *J Cell Biol* 1994; 126:223-233
- Nagy PH, C. Bisgaard C, Santoni-Rugiu E, Thorgeirsson SS.** 1996. In vivo infusion of growth factors enhances the mitogenic response of rat hepatic ductal (oval) cells after administration of 2- acetylaminofluorene. *Hepatology* 1996; 23 (1):71-79.
- Nakamura T, Nawa K, Ichihara A.** Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122 (3):1450-1459.
- Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K.** Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2011; 26 Suppl. 1; 188–202
- Nakano K, Vousden, KH.** PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 2001; 7, 683-694
- Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, et al.** Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* 1991 Oct;10(10):2867-78
- Naldini, L., E. Vigna, R. Ferracini, P. Longati, L. Gandino, M. Prat, and P. M. Comoglio.** 1991a. The tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene is activated by autophosphorylation. *Mol Cell Biol* 11 (4):1793-1803
- Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM.** Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* 1992 Dec;11(13):4825-33.
- Natarajan A, Wagner B, Sibilina M.** The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 17081-17086
- Nath D, Williamson NJ, Jarvis R, Murphy G.** Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci.* 2001 Mar;114(Pt 6):1213-20.
- Nawshad A, Lagamba D, Polad A, Hay ED.** Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs* 2005; 179:11-23.
- Neilson EG.** Mechanisms of disease: fibroblasts — a new look at an old problem. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 2006; 2:101–108.
- Nejjari M, Hafdi Z, Gouysse G, Fiorentino M, Béatrix O, Dumortier J, Pourreyron C, Barozzi C, D'errico A, Grigioni WF, Scoazec JY.** Expression, regulation, and function of alpha V integrins in hepatocellular carcinoma: an in vivo and in vitro study. *Hepatology.* 2002 Aug;36(2):418-26.
- Nelson WJ, Nusse R.** Convergence of Wnt, betacatenin and cadherin pathways. *Science (New York, NY)* 2004; 303:1483-7.
- Nguyen LN, Furuya MH, Wolfrain LA, Nguyen AP, Holdren MS, Campbell JS, Knight B, Yeoh GC, Fausto N, Parks WT.** Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. *Hepatology.* 2007 Jan;45(1):31-41.
- Niessen K, Fu Y, Chang L, Hoodless PA, McFadden D, Karsan A.** Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J Cell Biol.* 2008 Jul 28;182(2):315-25
- Niimura M, Takagi N, Takagi K, Mizutani R, Tanonaka K, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S.** The protective effect of hepatocyte growth factor against cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia is related to the improvement of apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 level and inhibition of NADPH oxidase activity. *Neurosci Lett.* 2006 Oct 23;407(2):136-40
- Nitta T, Kim JS, Mohuczy D, Behrns KE.** Murine cirrhosis induces hepatocyte epithelial mesenchymal transition and alterations in survival signaling pathways. *Hepatology* 2008;48:909– 919 #

- Normanno N, Bianco C, De Luca A, Salomon DS.** The role of EGF-related peptides in tumor growth. *Front Biosci* 2001; 6:D685– D707
- Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, Caponigro F, Salomon DS.** The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr Drug Targets* 2005; 6:243–257
- Oberhammer FA, Pavelka M, Sharma S, Tiefenbacher R, Purchio AF, Bursch W, Schulte-Hermann R.** Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jun 5;89(12):5408-12
- Ocaña OH, Nieto MA.** Epithelial plasticity, stemness and pluripotency. *Cell Res.* 2010 Oct;20(10):1086-8.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N.** Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000 May 12;288(5468):1053-8.
- Oertel M, Shafritz DA.** Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Feb;1782(2):61-74
- Oft M, Heider KH, Beug H.** TGF-beta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* 1998; 8:1243-52.
- Ogasawara, J., R. Watanabe-Fukunaga, M. Adachi, A. Matsuzawa, T. Kasugai, Y. Kitamura, N. Itoh, T. Suda, and S. Nagata.** Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993; 364 (6440):806-809.
- Ohgushi M, Kuroki S, Fukamachi H, O'Reilly LA, Kuida K, Strasser A, and Yonehara S.** Transforming Growth Factor  $\beta$ -Dependent Sequential Activation of Smad, Bim, and Caspase-9 Mediates Physiological Apoptosis in Gastric Epithelial Cells. *Mol Cell Biol.* 2005 November; 25(22): 10017–10028
- Ohsato T, Ishihara N, Muta T, Umeda S, Ikeda S, Mihara K, Hamasaki N, Kang D.** Mammalian mitochondrial endonuclease G digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *Eur J Biochem* 2002; 269:5765–5770
- Ohtsu H, Dempsey PJ, Eguchi S.** ADAMs as mediators of EFR receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291:C1—C10
- Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, et al.** Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 2009;136:1951–1960 #
- Okada H, Ban S, Nagao S, Takahashi H, Suzuki H, Neilson EG.** Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. *Kidney Int.* 2000 Aug;58(2):587-97.
- Okano J, Shiota G, Matsumoto K, Yasui S, Kurimasa A, Hisatome I, Steinberg P, Murawaki Y.** Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 298-304
- Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Satake M, Kim Y, Terada K, Sugiyama T, Takemura M, Fujimoto J, Terada N, Miyajima A, Tsujimura T.** Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am J Pathol* 2005; 166:709–719
- Ola MS, Mohd. Nawaz, Haseeb Ahsan.** Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis Haseeb Ahsan. *Mol Cell Biochem* 2011: 351:41–58
- Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE.** ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol.* 1998 Sep;18(9):5042-51.
- Ortiz C, Caja L, Sancho P, Bertran E, Fabregat I.** Inhibition of the EGF receptor blocks autocrine growth and increases the cytotoxic effects of doxorubicin in rat hepatoma cells: role of reactive oxygen species production and glutathione depletion. *Biochem Pharmacol.* 2008 May 15;75(10):1935-45. Epub 2008 Feb 19
- Osburn WO, Kensler TW,** Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults, *Mutat. Res.* 659 (2008) 31–39.
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. and Donner, D. B.** NF- $\kappa$ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine–threonine kinase. *Nature* 1999; 401, 82–85 118
- Pack R, Heck R, Dienes HP, Oesch F, Steinberg P.** Isolation, biochemical characterization, long-term culture, and phenotype modulation of oval cells from carcinogen-fed rats. *Exp Cell Res.* 1993 Feb;204(2):198-209.
- Pagan R, Martín I, Llobera M, Vilaró S.** Growth and differentiation factors inhibit the migratory phenotype of cultured neonatal rat hepatocytes induced by HGF/SF. *Exp Cell Res* 1997; 235: 170-179
- Pagan R, Sánchez A, Martín I, Llobera M, Fabregat I, Vilaró S.** Effects of growth and differentiation factors on the epithelial mesenchymal transition in cultured neonatal rat hepatocytes. *J Hepatol* 1999; 31: 895-904
- Pai R, Nakamura T, Moon WS, Tarnawski AS.** Prostaglandins promote colon cancer cell invasion; signaling by cross-talk between two distinct growth factor receptors. *FASEB J.* 2003 Sep;17(12):1640-7.

- Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS.** Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am J Pathol* 2001; 158:1313 – 1323
- Panico L, D'Antonio A, Salvatore G, Mezza E, Tortora G, De Laurentiis M, De Placido S, Giordano T, Merino M, Salomon DS, Mullick WJ, Pettinato G, Schnitt SJ, Bianco AR, Ciardiello F.** Differential immunohistochemical detection of transforming growth factor alpha, amphiregulin and CRIPTO in human normal and malignant breast tissues. *Int J Cancer*. 1996 Jan 3;65(1):51-6
- Paranjpe S, Bowen WC, Bell AW, Nejak-Bowen K, Luo JH, Michalopoulos GK.** Cell cycle effects resulting from inhibition of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in regenerating rat livers by RNA interference. *Hepatology* 2007; 45: 1471-1477
- Pardali K, Moustakas A.** Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775:21-62.
- Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di CG, Liu XM, Shao Y, Ma BF, Lee JH, Ha KS, Walton N, Lahn BT.** Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells*. 2010 Dec;28(12):2162-71.
- Park, H. J., B. C. Kim, S. J. Kim, and K. S. Choi.** Role of MAP kinases and their cross-talk in TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis in FaO rat hepatoma cell line. *Hepatology* 2002; 35:1360-1371
- Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Jonczyk A, Goodman SL, Schuppan D** Inhibition of integrin alphavbeta6 on cholangiocytes blocks transforming growth factor-beta activation and retards biliary fibrosis progression. *Gastroenterology*. 2008 Aug;135(2):660-70.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A.** Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007; 7:415-28.
- Pelletier L, Rebouissou S, Vignjevic D, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J.** HNF1 $\alpha$  inhibition triggers epithelial-mesenchymal transition in human liver cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2011 Oct 5;11:427.
- Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, et al.** A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 2001;276:27424-31.
- Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA.** TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol*. 2001 Aug;3(8):708-14.
- Peruzzi B, Bottaro DP.** Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (12):3657-3660.
- Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY, Park M.** Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell*. 2001 Nov;8(5):995-1004.
- Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK.** Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology* 1998;27:1030–1038.
- Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, Comoglio PM, Migone N, Giordano S.** The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature*. 2002 Mar 14;416(6877):187-90.
- Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, Iliopoulos D, Pilozzi E, Liu C-G, Negrini M et al.:** E2F1- regulated microRNAs impair TGF $\beta$ -dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 2008, 13:272-286.
- Phaneuf D, Chen SJ, Wilson JM.** Intravenous injection of an adenovirus encoding hepatocyte growth factor results in liver growth and has a protective effect against apoptosis. *Mol Med* 2000; 6: 96-103
- Phaneuf D, Moscioni AD, LeClair C, Raper SE, Wilson JM.** Generation of a mouse expressing a conditional knockout of the hepatocyte growth factor gene: demonstration of impaired liver regeneration. *DNA Cell Biol* 2004; 23: 592-603
- Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P.** TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* 1999; 112:4557-68.
- Piepkorn M, Pittelkow MR, Cook PW.** Autocrine regulation of keratinocytes: the emerging role of heparin-binding, epidermal growth factor-related growth factors. *J Invest Dermatol*. 1998 Nov;111(5):715-21
- Poncelet AC, Schnaper HW.** Sp1 and Smad proteins cooperate to mediate transforming growth factor-beta 1-induced alpha 2(I) collagen expression in human glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 2001; 276:6983-92 #
- Potentia S, Zeisberg E, Kalluri R.** The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer*. 2008 Nov 4;99(9):1375-9.
- Potten CS, Booth C, Pritchard DM.** The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* 1997; 78:219 – 243

- Prat M, Narsimhan RP, Crepaldi T, Nicotra MR, Natali PG, Comoglio PM.** The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors. *Int J Cancer* 1991; 49: 323-328
- Preisegger KH, Factor VM, Fuchsbichler A, Stumptner C, Denk H, and Thorgeirsson SS.** 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. *Lab. Invest.* 1999; 79: 103-109.
- Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A.** EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature.* 1999 Dec 23-30;402(6764):884-8.
- Presnell SC, Stolz DB, Mars WM, Jo M, Michalopoulos GK, Strom SC.** Modifications of the hepatocyte growth factor/c-met pathway by constitutive expression of transforming growth factor-alpha in rat liver epithelial cells. *Mol Carcinog.* 1997 Apr;18(4):244-55.
- Presnell SC, Hooth MJ, Borchert KM, Coleman WB, Grisham JW, Smith GJ.** Establishment of a functional HGF/C-MET autocrine loop in spontaneous transformants of WB-F344 rat liver stem-like cells. *Hepatology.* 1998 Nov;28(5):1253-9.
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A.** The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* 1999 Mar;3(3):287-96.
- Puthawala K, Hadjiangelis N, Jacoby SC, Bayongan E, Zhao Z, Yang Z, Devitt ML, Horan GS, Weinreb PH, Lukashv ME, Violette SM, Grant KS, Colarossi C, Formenti SC, Munger JS.** Inhibition of integrin alpha(v)beta6, an activator of latent transforming growth factor-beta, prevents radiation-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Jan 1;177(1):82-90.
- Qiao B, Johnson NW, Gao J.** Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma triggered by transforming growth factor-beta1 is Snail family-dependent and correlates with matrix metalloproteinase-2 and -9 expressions. *Int J Oncol.* 2010 Sep;37(3):663-8
- Qiao L, Studer E, Leach K, McKinstry R, Gupta S, Decker R, Kukreja R, Valerie K, Nagarkatti P, El Deiry W, Molkenin J, Schmidt-Ullrich R, Fisher PB, Grant S, Hylemon PB, Dent P.** Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis. *Mol Biol Cell.* 2001 Sep;12(9):2629-45.
- Qiu Y, Ravi L. & Kung HJ.** Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells. *Nature* 1998; 393, 83–85
- Ramadori G, Neubauer K, Odenthal M, Nakamura T, Knittel T, Schwögler S, Meyer zum Büschenfelde KH.** The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells of rat liver and is downregulated during cell growth and by transforming growth factor-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183: 739-742
- Ramesh S, Qi XJ, Wildey GM, Robinson J, Molkenin J, Letterio J, Howe PH:** TGFb-mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2. *EMBO Rep* 2008, 9:990-997.
- Ramjaun AR, Tomlinson S, Eddaoudi A, Downward J.** Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGFh-induced apoptosis. *Oncogene* 2007; 26:70–981.
- Rausa, F., Samadani, U., Ye, H., Lim, L., Fletcher, C. F., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. and Costa, R. H.** The cut-homeodomain transcriptional activator HNF-6 is coexpressed with its target gene HNF-3b in the developing murine liver and pancreas. *Dev. Biol.* 1997; 192, 228-246
- Reeves, H. L., and Friedman, S. L.** Activation of hepatic stellate cells- a key issue in liver fibrosis. *Front. Biosci.* 2002; 7, D808–D826
- Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS.** Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol.* 2003 Aug;5(8):733-40
- Reginato MJ, Mills KR, Becker EB, Lynch DK, Bonni A, Muthuswamy SK, Brugge JS.** Bim regulation of lumen formation in cultured mammary epithelial acini is targeted by oncogenes. *Mol Cell Biol.* 2005 Jun;25(11):4591-601.
- Reich A., Sapir A., Shilo B.** Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development* 1999 126, 4139–4147
- Remy I, Montmarquette A, Michnick SW.** PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol* 2004;6:358–365.
- Reznik TE, Sang Y, Ma Y, Abounader R, Rosen EM, Xia S, Laterra J.** Transcription-dependent epidermal growth factor receptor activation by hepatocyte growth factor. *Mol Cancer Res.* 2008 Jan;6(1):139-50
- Riedl SJ, Salvesen GS.** The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 405–413

- Rodrigues CM., Ma X., Linehan-Stieers C., Fan G, Kren BT, Steer CJ.** Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ.* 1999; 6, 842–854
- Roepstorff K, Grøvdal L., Grandal M., Lerdrup M., van Deurs B.** Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer *Histochem Cell Biol* (2008) 129:563–578 #
- Romashkova, J. A. and Makarov, S. S.** NF- $\kappa$ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999; 401, 86–90
- Ronsin C, F. Muscatelli F, Mattei MG, Breathnach R.** A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family. *Oncogene* 1993; 8 (5):1195-1202.
- Rosario, M., and W. Birchmeier.** 2003. How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 13 (6):328-335.
- Rosario M, Birchmeier W.** Making tubes: step by step. *Dev Cell* 2004; 7 (1):3-5.
- Rosenberg D, Ilic Z, Yin L, Sell S.** Proliferation of hepatic lineage cells of normal C57BL and interleukin-6 knockout mice after cocaine-induced periportal injury. *Hepatology* 2000;31:948–955.
- Roskams T, De Vos R, Oord JJ van den, Desmet V.** Cells with neuroendocrine features in regenerating human liver. *APMIS* 1991; Suppl 23:32 – 39
- Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, Achten R, Verslype C, Diehl AM.** Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol* 2003a; 163:1301 – 1311
- Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ.** Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 2003b; 23:385 – 396
- Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V, Finegold MJ, Geller SA, Gouw ASH, Hytiroglou P, Knisely, S, Kojiro M, Letkowitch JH, Nakanuma Y, Olynyk JK, Park YN, Portmann B, Saxena R, Scheuer PJ, Strain AJ, Thung SN, Wanless IR, West AB.** Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: Canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 2004; 39:1739 – 1745
- Roskams T, Cassiman D, De Vos R, Libbrecht L.** Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;280:910–923
- Roskams T.** Liver stemcells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* 2006; 25:3818 – 3822
- Rothenpieler UW, Dressler GR.** Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development. *Development*.1993; 119:711–720.
- Rubin C, Litvak V, Medvedovsky H, Zwang Y, Lev S, Yarden Y.** Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. *Curr Biol.* 2003 Feb 18;13(4):297-307.
- Ruck P, Xiao JC, Kaiserling E.** Small epithelial cells and the histogenesis of hepatoblastoma. Electron microscopic, immunoelectron microscopic, and immunohistochemical findings. *Am J Pathol* 1996;148:321–329.
- Ruck P, Xiao JC, Pietsch T, Von Schweinitz D, Kaiserling E.** Hepatic stem-like cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7, albumin and oval cell associated antigens detected by OV-1 and OV-6. *Histopathology* 1997;31:324–329.
- Russell WE, Kaufmann WK, Sitaric S, Luetkeke NC, Lee DC.** Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor- $\alpha$ -targeted mice. *Mol Carcinog* 1996; 15: 183-189.
- Russell WE, McGowan JA, Bucher NL.** Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. *J Cell Physiol* 1984; 119 (2):183-192.
- Sako Y, Minoghchi S, Yanagida T.** Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nature Cell Biol.* 2000; 2, 168–172
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T.** *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, USA.
- Sanchez A, Fabregat.** Genetically modified animal models recapitulating molecular events altered in human hepatocarcinogenesis. *Clin Transl Oncol* 2009; 11 (4):208-214.
- Sánchez A, Fabregat I.** Growth factor- and cytokine-driven pathways governing liver stemness and differentiation *World J Gastroenterol* 2010 November 7; 16(41): 5148-5161
- Sanchez A, Alvarez AM, Benito M, Fabregat I.** Transforming growth factor beta modulates growth and differentiation of fetal hepatocytes in primary culture. *J Cell Physiol* 1995; 165: 398-405

- Sanchez A, Alvarez AM, Benito M, Fabregat I.** Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 1996;271:7416–7422.
- Sánchez A, Pagan R, Alvarez AM, Roncero C, Vilaró S, Benito M, Fabregat I.** Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and EGF promote cord-like structures that indicate terminal differentiation of fetal hepatocytes in primary culture. *Exp Cell Res* 1998; 242: 27-37
- Sánchez A, Álvarez AM, López Pedrosa JM, Roncero C, Benito M and Fabregat I.** Apoptotic Response to TGF-b in Fetal Hepatocytes Depends upon Their State of Differentiation. *Experimental Cell Research* 1999; 252, 281–291
- Sanchez-Capelo A.** Dual role of TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 15–34.
- Sanchez-Tillo E, Lazaro A, Torrent R, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, Engel P, Postigo A.** ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* 2010; 29: 3490–3500
- Sancho P, Bertran E, Caja L, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Fabregat I.** The inhibition of the epidermal growth factor (EGF) pathway enhances TGF-beta-induced apoptosis in rat hepatoma cells through inducing oxidative stress coincident with a change in the expression pattern of the NADPH oxidases (NOX) isoforms. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Feb;1793(2):253-63
- Sandhu JS, Petkov PM, Dabeva MD, Shafritz DA.** Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells. *Am J Pathol* 2001;159:1323–1334.
- Sano Y, Harada J, Tashiro S, et al.** ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 1999;274:8949–8957
- Santangelo C, Matarrese P, Masella R, Di Carlo MC, Di Lillo A, Scazzocchio B, Vecci E, Malorni W, Perfetti R, Anastasi E.** Hepatocyte growth factor protects rat RINm5F cell line against free fatty acid-induced apoptosis by counteracting oxidative stress. *J Mol Endocrinol*. 2007 Feb;38(1-2):147-58.
- Santangelo L, Marchetti A, Cicchini C, Conigliaro A, Conti B, Mancone C, Bonzo JA, Gonzalez FJ, Alonzi T, Amicone L, Tripodi M** The stable repression of mesenchymal program is required for hepatocyte identity: a novel role for hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ . *Hepatology*. 2011 Jun;53(6):2063-74.
- Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L, Bernabeu C.** Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol*. 2007 Feb;210(2):456-68.
- Santibañez JF, Quintanilla M y Bernabeu C.** TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions *Clinical Science* 2011; 121, 233–251
- Santoni-Rugiu E, Jelnes P, Thorgeirsson SS, Bisgaard HC.** Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *APMIS* 2005;113:876–902.
- Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A.** Targeted disruption of TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling protects against renal tubulo interstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest*. 2003;112(10):1486 – 94.
- Sato Y, Kato J, Takimoto R, Takada K, Kawano Y, Miyanishi K, Kobune M, Sato Y, Takayama T, Matunaga T, Niitsu Y.** Hepatitis C virus core protein promotes proliferation of human hepatoma cells through enhancement of transforming growth factor alpha expression via activation of nuclear factor-kappaB. *Gut* 2006; 55,1801-1808.
- Sawada N, Lee GH, Mochizuki Y, Ishikawa T.** Active proliferation of mouse hepatocytes in primary culture under defined conditions as compared to rat hepatocytes. *Jpn J Cancer Res* 1988; 79: 983-988
- Saxena R, Theise ND, Crawford JM.** Microanatomy of the human liver-exploring the hidden interfaces. *Hepatology* 1999; 30:1339 – 1346
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin K-M, Krammer PH, Peter ME.** Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; 17: 1675–1687
- Scheving LA, Stevenson MC, Taylormoore JM, Traxler P, and Russell WE** Integral Role of the EGF Receptor in HGF-Mediated Hepatocyte Proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 290, 197–203
- Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE.** Hepatocyte growth factor/hepatopietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* 1992; 15: 5-11
- Schmelzle T, Maillieux AA, Overholtzer M, et al.** Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:3787–92.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschieche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C.** Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*. 1995 Feb 23;373(6516):699-702

- Schmierer B, Tournier AL, Bates PA, Hill CS:** Mathematical modeling identifies Smad nucleocytoplasmic shuttling as a dynamic signal-interpreting system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:6608-6613.
- Schrem H, Klempnauer J, and Borlak J.** Liver-Enriched Transcription Factors in Liver Function and Development. Part I: The Hepatocyte Nuclear Factor Network and Liver-Specific Gene Expression *Pharmacol Rev* 54:129–158, 2002
- Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA and Benvenisty N.** From the cover: effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 11307-12.
- Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE,** Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism, *J. Cell Biol.* 1993; 122: 923–932.
- Schulze WX., Deng L, Mann M.** Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol. Syst. Biol.* 2005; 1, 42–54
- Schulze-Bergkamen H, Brenner D, Krueger A, Suess D, Fas SC, Frey CR, Dax A, Zink D, Büchler P, Müller M, Krammer PH.** Hepatocyte growth factor induces Mcl-1 in primary human hepatocytes and inhibits CD95-mediated apoptosis via Akt. *Hepatology.* 2004 Mar;39(3):645-54.
- Schwarz M, Buchmann A, Wiesbeck G, Kunz W.** Effect of ethanol on early stages in nitrosamine carcinogenesis in rat liver. *Cancer Lett* 1983;20:305–312.
- Sell S.** Comparison of oval cells induced in rat liver by feeding N-2- fluorenylacetamide in a choline-devoid diet and bile duct cells induced by feeding 4,40-diaminodiphenylmethane. *Cancer Res* 1983;43:1761–1767.
- Sell S.** Mouse models to study the interaction of risk factors for human liver cancer. *Cancer Res* 2003;63:7553–7562
- Sells MA, Katyal SL, Shinozuka H, Estes LW, Sell S, Lombardi B.** Isolation of oval cells and transitional cells from the livers of rats fed the carcinogen DLethionine. *J Natl Cancer Inst* 1981;66:355–362.
- Seoane J.** Escaping from the TGF $\beta$  anti-proliferative control. *Carcinogenesis* 2006; vol.27 no.11 pp.2148–2156
- Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massagué J.** Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 2004;117:211–223
- Seton-Rogers SE, Lu Y, Hines LM, Koundinya M, LaBaer J, Muthuswamy SK, et al.** Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:1257-62.
- Shafritz DA, Oertel M.** Model systems and experimental conditions that lead to effective repopulation of the liver by transplanted cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Feb;43(2):198-213
- Shafritz DA, Oertel M, Menthena A, Nierhoff D, Dabeva MD.** Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells. *Hepatology.* 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S89-98
- .Shah SB, Skromne I, Hume CR, Kessler DS, Lee KJ, Stern CD, Dodd J.** Misexpression of chick Vg1 in the marginal zone induces primitive streak formation. *Development.* 1997 Dec;124(24):5127-38.
- Shao Y and Aplin AE.** Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells *Cancer Res.* 2010 August 15; 70(16): 6670–6681
- Sheng Q, Liu X, Fleming E, Yuan K, Piao H, Chen J, Moustafa Z, Thomas RK, Greulich H, Schinzel A, Zaghlul S, Batt D, Ettenberg S, Meyerson M, Schoeberl B, Kung AL, Hahn WC, Drapkin R, Livingston DM, Liu JF.** An activated ErbB3/NRG1 autocrine loop supports in vivo proliferation in ovarian cancer cells. *Cancer Cell.* 2010 Mar 16;17(3):298-310
- Shi Y, Hata A, Lo RS, Massagué J, Pavletich NP.** A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature.* 1997 Jul 3;388(6637):87-93.
- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massagué J, Pavletich NP.** Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell.* 1998 Sep 4;94(5):585-94.
- Shi Y, Massagué J.** Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003 Jun 13;113(6):685-700.
- Shim JH, Xiao C, Paschal AE, et al.** TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* 2005;19:2668–2681
- Shima Y, Nakao K, Nakashima T, Kawakami A, Nakata K, Hamasaki K, Kato Y, Eguchi, K. and Ishii, N .** Activation of caspase-8 in transforming growth factor beta-induced apoptosis of human hepatoma cells. *Hepatology* 1999;30:1215-1222.
- Shimomura T, Kondo J, Ochiai M, Naka D, Miyazawa K, Morimoto Y, Kitamura N.** Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin. *J Biol Chem.* 1993 Oct 25;268(30):22927-32.

- Shin I, Bakin AV, Rodeck U, Brunet A, Arteaga CL.** Transforming growth factor beta enhances epithelial cell survival via Akt-dependent regulation of FKHRL1. *Mol Biol Cell* 2001;12:3328–3339
- Shinozuka H, Lombardi B, Sell S, Iammarino RM.** Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline deficient diet. *Cancer Res* 1978a;38:1092–1098.
- Shinozuka H, Lombardi B, Sell S, Iammarino RM.** Enhancement of DL ethionine-induced liver carcinogenesis in rats fed a choline-devoid diet. *J Natl Cancer Inst* 1978b;61:813–817.
- 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.** In vivo transfer of hepatocyte growth factor gene accelerates proliferation of hepatic oval cells in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *FEBS Lett.* 2000 Mar 31;470(3):325-30.
- Shiota G, Nakamura T, Schmidt EV.** Hepatocyte growth factor regulates transforming growth factor alpha in HepG2 hepatic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Apr 29;200(2):1099-104.
- Sibilia M, Wagner EF.** Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 1995; 269, 234–238
- Sibilia M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF.** A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J.* 1998 Feb 2;17(3):719-31.
- Sicklick JK, Li YX, Melhem A, Schmelzer E, Zdanowicz M, Huang J, et al.** Hedgehog signaling maintains resident hepatic progenitors throughout life. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G859–870 #
- Siegel PM, Massague J.** Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer, *Nat. Rev., Cancer* 2003; 3 807–821.
- Siegel PM, Shu W, Cardiff RD, Muller WJ, Massague J.** Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100:8430-5.
- Singh AB, Harris RC.** Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* 2005; 17(10):1183-93
- Singh AB, Tsukada T, Zent R, Harris RC.** Membrane-associated HB-EGF modulates HGF induced cellular responses in MDCK cells. *Journal of Cell Science* 2004; 117 (8) 1365-1379
- Skromne I, Stern CD.** A hierarchy of gene expression accompanying induction of the primitive streak by Vg1 in the chick embryo. *Mech. Dev.* 2002; 114:115–118.
- Skromne I, Stern CD.** Interactions between Wnt and Vg1 signalling pathways initiate primitive streak formation in the chick embryo. *Development.* 2001; 128:2915–2927.
- Snykers S, De Kock J, Rogiers V, Vanhaecke T.** In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells* 2009; 27: 577-605
- Sokal EM, Smets F, Bourgois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, et al.** Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* 2003;76:735–738.
- Soltoff, S. P. & Cantley, L. C.** p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J. Biol. Chem.* 271, 563–567 (1996)
- Song K, Wang H, Krebs TL, Danielpour D:** Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF-b/ALK5-mediated Smad3 activation. *EMBO J* 2006, 25:58-69
- Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C.** Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol.* 1993 Oct;123(1):223-35
- Spagnoli FM, Cicchini C, Tripodi M, Weiss MC.** Inhibition of MMH (Met murine hepatocyte) cell differentiation by TGF(beta) is abrogated by pre-treatment with the heritable differentiation effector FGF1. *J Cell Sci.* 2000 Oct;113 ( Pt 20):3639-47
- Späth GF, Weiss MC** Hepatocyte Nuclear Factor 4 Provokes Expression of Epithelial Marker Genes, Acting As a Morphogen in Dedifferentiated Hepatoma Cells. *The Journal of Cell Biology*, Volume 140, Number 4, February 23, 1998 935–946
- Spix JK, Chay EY, Block ER, Klarlund JK.** Hepatocyte growth factor induces epithelial cell motility through transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Exp Cell Res.* 2007 Sep 10;313(15):3319-25
- Stahl M, Dijkers PF, Kops GJPL, et al.** The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol.* 2002; 168:5024–31.

- Stöcker E, Heine WD.** Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Beitr Pathol* 1971;144:400–408.
- Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J.** Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*. 1987 May 21-27;327(6119):239-42.
- Strasser A., Suzanne Cory, and Jerry M Adams.** Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *The EMBO Journal* 2011; 30, 3667–3683
- Strick-Marchand H, Masse GX, Weiss MC, Di Santo JP.** Lymphocytes support oval cell-dependent liver regeneration *J Immunol* 2008;181:2764–2771.
- Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Müller GA, Neilson EG.** Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* 2002 May;61(5):1714-28
- Stuart KA, Riordan SM, Lidder S, Crostella L, Williams R, Skouteris GG.** Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signalling. *Int J Exp Pathol.* 2000 Feb;81(1):17-30.
- Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H.** Differentiation of mouse hepatic progenitor cells induced by hepatocyte nuclear factor-4 and cell transplantation in mice with liver fibrosis. *Transplantation* 2008; 86:1178–1186
- Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF, Weinberg RA.** SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Oct 26;96(22):12442-7.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G.** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397:441–446
- Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, Kusakabe M, Takada Y, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H.** Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 2000; 32: 1230-1239
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R.** A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 2001; 8:613–621
- Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, Onodera M, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H.** Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 2002; 156: 173-184
- Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H.** Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 2003; 130: 2513-2524
- Swenson ES, Kuwahara R, Krause DS, Theise ND.** Physiological variations of stem cell factor and stromal-derived factor-1 in murine models of liver injury and regeneration. *Liver Int* 2008;28:308–318.
- Syn WK, Jung Y, Omenetti A, Abdelmalek M, Guy CD, Yang L, Wang J, Witek RP, Fearing CM, Pereira TA, Teaberry V, Choi SS, Conde-Vancells J, Karaca GF, Diehl AM.** Hedgehog-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and fibrogenic repair in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2009 Oct;137(4):1478-1488
- Takami T, Kaposi-Novak P, Uchida K, E. Gomez-Quiroz LE, Conner EA, Factor VM, and Snorri S. Thorgeirsson SS.** Loss of Hepatocyte Growth Factor/c-Met Signaling Pathway Accelerates Early Stages of N-nitrosodiethylamine-Induced Hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2007; 67: (20). October 15, 2007
- Takayama S, Hatori M, Kurihara Y, Kinugasa Y, Shiota T, Shintani S.** Inhibition of TGF-beta1 suppresses motility and invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via modulation of integrins and down-regulation of matrix-metalloproteinases. *Oncol Rep.* 2009 Jan;21(1):205-10.
- Tanaka M., Itoh T., Tanimizu N, Miyajima A.** Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms *J. Biochem.* 2011;149(3):231–239
- Tanimizu N, Tsujimura T, Takahide K, Kodama T, Nakamura K, Miyajima A.** Expression of Dlk/Pref-1 defines a subpopulation in the oval cell compartment of rat liver. *Gene Expr Patterns* 2004;5:209–218.
- Taylor MA, Parvani JG, Schiemann WP.** The Pathophysiology of Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor- $\beta$  in Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15:169 – 190
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ.** Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Mar;9(3):231-41
- ten Dijke P, Arthur HM.** Extracellular control of TGF $\beta$  signalling in vascular development and disease *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; 8, 857-869
- ten Dijke P, Heldin C-H (Eds):** Smad Signal Transduction. Smads in Proliferation, Differentiation and Disease. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2006.

- ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH.** Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF- $\beta$  signaling. *Trends Biochem. Sci.* 2000, 25, 64–70
- Thannickal VJ, Fanburg BL.** Activation of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem* 1995 270:30334–30338.
- Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM.** The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999; 30:1425 – 1433
- Theise ND, Yao JL, Harada K, Hytiroglou P, Portmann B, Thung SN, et al.** Hepatic 'stem cell' malignancies in adults: four cases. *Histopathology* 2003;43:263–271
- Thiery JP.** Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2:442–454.
- Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, et al.** Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science.* 1995 Jul 14;269(5221):230-4.
- Tomiya T, Ogata I, Yamaoka M, Yanase M, Inoue Y, Fujiwara K.** The mitogenic activity of hepatocyte growth factor on rat hepatocytes is dependent upon endogenous transforming growth factor-alpha. *Am J Pathol.* 2000 Nov;157(5):1693-701.
- Troyer KL, Luetke NC, Saxon ML, Qiu TH, Xian CJ, Lee DC.** Growth retardation, duodenal lesions, and aberrant ileum architecture in triple null mice lacking EGF, amphiregulin, and TGF-alpha. *Gastroenterology.* 2001 Jul;121(1):68-78.
- Trusolino L, Comoglio PM.** Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer.* 2002 Apr;2(4):289-300
- Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM.** MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Dec;11(12):834-48.
- Tsuboi S.** Elevation of glutathione level in rat hepatocytes by hepatocyte growth factor via induction of gamma-glutamylcysteine synthetase *J Biochem (Tokyo)* 1999;126:815–820. [PubMed: 10544272]
- Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL.** SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell.* 1998 Dec 11;95(6):779-91.
- Tucker RP.** Neural crest cells: a model for invasive behavior. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Feb;36(2):173-7
- Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C, Puchois E, Moumen A, Maina F, Mehlen P, Fafeur V.** Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol.* 2004 Dec;24(23):10328-39.
- Tulasne D, Foveau B.** The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ.* 2008 Mar;15(3):427-34
- Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y.** A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol.* 1996 Oct;16(10):5276-87.
- Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G.** FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Nov;1813(11):1938-45. #
- Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N.** Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature.* 1995 Feb 23;373(6516):702-5.
- Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi H, Okamoto E, Fujimoto J.** Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999; 5: 226-230
- Ulloa L, Doody J, Massagué J.** Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature.* 1999 Feb 25;397(6721):710-3.
- Urbich C, Knau A, Fichtlscherer S, Walter DH, Brühl T, Potente M, Hofmann WK, de Vos S, Zeiher AM, Dimmeler S.** FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells. *FASEB J.* 2005 Jun;19(8):974-6.
- Uttamsingh S, Bao X, Nguyen KT, Bhanot M, Gong J, Chan JL, et al.** Synergistic effect between EGF and TGF- $\beta$ 1 in inducing oncogenic properties of intestinal epithelial cells. *Oncogene.* 2008;27(18):2626 – 34.
- Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, Heldin CH, Moustakas A.** TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell* 2005; 16:1987-2002
- Valdés F, Álvarez AM, Locascio A, Vega S, Herrera B, Fernández M, Benito M, Nieto MA, Fabregat I.** The Epithelial Mesenchymal Transition Confers Resistance to the Apoptotic Effects of Transforming Growth Factor B in Fetal Rat Hepatocytes. *Molecular Cancer Research* 2002; Vol. 1, 68–78

- Valdés F, Murillo MM, Valverde AM, Herrera B, Sánchez A, Benito M, Fernández M, Fabregat I.** Transforming growth factor-beta activates both pro-apoptotic and survival signals in fetal rat hepatocytes. *Exp Cell Res.* 2004 Jan 1;292(1):209-18.
- Valdés-Arzate A, Luna A, Bucio L, Licona C, Clemens DL, Souza V, Hernandez E, Kershenobich D, Gutiérrez-Ruiz MC, Gómez-Quiroz LE.** Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med.* 2009 Aug 15;47(4):424-30.
- Van Hul NK, Abarca-Quinones J, Sempoux C, Horsmans Y, Leclercq IA.** Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a CDE-induced murine model of chronic liver injury. *Hepatology* 2009;49:1625–1635.
- van Loo G, Schotte P, van Gorp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P.** Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* 2001; 8:1136–1142
- Vande Woude GF, Jeffers M, Cortner J, Alvord G, Tsarfaty I, Resau J.** Met-HGF/SF: tumorigenesis, invasion and metastasis. *Ciba Found Symp.* 1997;212:119-30; discussion 130-2, 148-54
- Vandewalle C, Van Roy F, Berx G.** The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 773–787
- Varlet I, Collignon J, Robertson EJ.** nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development.* 1997 Mar;124(5):1033-44.
- Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA.** Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 2004 May 15;18(10):1131-43.
- Verrecchia F, Vindevoghel L, Lechleider RJ, Uitto J, Roberts AB, Mauviel A.** Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGF-beta in a promoter-specific manner. *Oncogene* 2001; 20:3332-40 #
- Vicovac, L., and Aplin, J.D.** Epithelial mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anat. (Basel).* 1996; 156:202–216.
- Villanueva S, Glavic A, Ruiz P, Mayor R.** Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Dev. Biol.* 2002; 241:289–301.
- Vincent T, Neve EP, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, et al.** A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2009;11:943-50 #
- Viñals F, Pouyssegur J.** Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling. *Mol Cell Biol* 2001;21:7218–7230
- Wandzioch E, Zaret KS.** Dynamic Signaling Network for the Specification of Embryonic Pancreas and Liver Progenitors. *Science* 324, 1707 (2009)
- Wang H, Zhang Y, Heuckeroth RO.** PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA. *FEBS Lett.* 2007 Jun 26;581(16):3098-104
- Wang SW, Pan SL, Peng CY, Huang DY, Tsai AC, Chang YL, Guh JH, Kuo SC, Lee KH, Teng CM.** CHM-1 inhibits hepatocyte growth factor-induced invasion of SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells by suppressing matrix metalloproteinase-9 expression. *Cancer Lett.* 2007 Nov 8;257(1):87-96.
- Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M.** The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11881–11888.
- Wang X, Zheng M, Liu G, Xia W, McKeown-Longo PJ, Hung MC, et al.** Kruppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res* 2007; 67:7184-93.
- Webber EM, FitzGerald MJ, Brown PI, Bartlett MH, Fausto N.** Transforming growth factor-alpha expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor-alpha and hepatocyte growth factor. *Hepatology.* 1993 Dec;18(6):1422-31.
- Webster CR, Anwer MS.** Phosphoinositide 3-kinase, but not mitogenactivated protein kinase, pathway is involved in hepatocyte growth factor mediated protection against bile acid-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 2001;33:608–615.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ.** Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001 Apr 27;292(5517):727-30.
- Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, Fonatsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y, et al.** Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 15;88(16):7001-5.
- Wicks SJ, Lui S, Abdel-Wahab N, Mason RM, Chantry A.** Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol Cell Biol* 2000;20:8103–8111.

- Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT.** Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase. I. *J Biol Chem* 2001; 276:48404–48409
- Wiemann SU, Satyanarayana A, Tshuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL.** Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* 2002; 16:935 – 942
- Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM.** Nestin expression—a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci.* 2004 Oct;61(19-20):2510-22
- Wiesen JF, Young P, Werb Z, Cunha GR.** Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development.* 1999 Jan;126(2):335-44.
- Wilkes MC, Mitchell H, Penheiter SG, et al.** Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res* 2005;65:10431–10440
- Williams JR, Little JB, Shipley WU.** Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature* 1974; 252, 754–755
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC.** Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 2007, 315: 856–859
- Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z.** Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2005 166, 1321–1332
- Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B.** Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 1;89(7):2965-9.
- Wotton D, Lo RS, Lee S, Massagué J.** A Smad transcriptional corepressor. *Cell.* 1999 Apr 2;97(1):29-39.
- Wu Y, Zhou BP.** Snail: More than EMT. *Cell Adh Migr.* 2010 Apr-Jun;4(2):199-203.
- Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y.** Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol.* 2006 May;168(5):1500-12.
- Xiao JC, Ruck P, Adam A, Wang TX, Kaiserling E.** Small epithelial cells in human liver cirrhosis exhibit features of hepatic stem-like cells: immunohistochemical, electron microscopic and immunoelectron microscopic findings. *Histopathology* 2003;42:141–149.
- Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL.** Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia (New York, NY)* 2004; 6:603-10.
- Xu L.** Regulation of Smad Activities. *Biochim Biophys Acta.* 2006 ; 1759(11-12): 503–513.
- Xu KP, Yu FS.** Cross talk between c-Met and epidermal growth factor receptor during retinal pigment epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48, 2242–2248
- Xu L, Chen YG, Massagué J.** The nuclear import function of SMAD2 is masked by SARA and unmasked by TGFβ-dependent phosphorylation. *Nature Cell Biol.* 2000; 2, 559–562
- Xue F, Takahara T, Yata Y, Kuwabara Y, Shinno E, Nonome K, Minemura M, Takahara S, Li X, Yamato E, Watanabe A.** Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy. *Gut.* 2003 May;52(5):694-700.
- Yamamoto K, Morishita R, Hayashi S, Matsushita H, Nakagami H, Moriguchi A, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T.** Contribution of Bcl-2, but not Bcl-xL and Bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension.* 2001 May;37(5):1341-8.
- Yamamoto M, Fukuda K, Miura N, Suzuki R, Kido T, Komatsu Y.** Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology.* 1998 Apr;27(4):959-66.
- Yamashita M, Fatyol K, Jin C, Wang X, Liu Z, Zhang YE:** TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-β. *Mol Cell* 2008, 31:918-924.
- Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, Tamemoto H, Sekine N, Wada M, Honjo M, Takahashi M, Takahashi T, Hirai H, Tushima T, Akanuma Y, Fujita T, Komuro I, Yazaki Y, Kadowaki T.** Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature.* 1997 Nov 6;390(6655):91-6.
- Yamauchi T, Yamauchi N., Ueki K, Sugiyama T, Waki H, Miki H., Tobe K., Matsuda S., Tsushima T., Yamamoto T., Fujita T., Taketani Y., Fukayama M., Kimura S., Yazaki Y., Nagai R., Kadowaki T.** Constitutive tyrosine phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by autocrine secretion of prolactin in human breast cancer. *J Biol Chem* 2000 Oct 27;275(43):33937-44.

- Yang J, Liu Y:** Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2001; 159: 1465–1475
- Yang J, Liu Y.** Blockage of Tubular Epithelial to Myofibroblast Transition by Hepatocyte Growth Factor Prevents renal Interstitial Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 96–107
- Yang J, Dai C, Liu Y.** Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction. *Am J Pathol* 2003a 163: 621–632,
- Yang J, Dai C, Liu Y.** Molecular mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2003b 14: 591A,
- Yang XM, Park M.** Expression of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor tyrosine kinase is localized to epithelia in the adult mouse. *Lab Invest* 1995; 73 (4):483-491.
- Yao P, Zhan Y, Xu W, Li C, Yue P, Xu C, Hu D, Qu CK, Yang X.** Hepatocyte growth factor-induced proliferation of hepatic stem-like cells depends on activation of NF-kappaB. *J Hepatol* 2004; 40: 391-398
- Yarden Y, Sliwkowski MX.** Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):127-37
- Yavorkovsky L, Lai E, Ilic Z, Sell S.** Participation of small intraportal stem cells in the restitutive response of the liver to periportal necrosis induced by allyl alcohol. *Hepatology* 1995;21:1702–1712.
- Yin L, Lynch D, Ilic Z, Sell S.** Proliferation and differentiation of ductular progenitor cells and littoral cells during the regeneration of the rat liver to CCl4/2-AAF injury. *Histol Histopathol* 2002;17:65–81.
- Yin X-M, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ.** Bid-deficient mice are resistant to Fas induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 1999; 400: 886–891
- Yoo J, Ghiassi M, Jirmanova L, Balliet AG, Hoffman B, Fornace AJ Jr, Liebermann DA, Bottinger EP, Roberts AB.** Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J Biol Chem.* 2003 Oct 31;278(44):43001-7
- Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H, Racherla H, Guha C, Dabeva MD.** Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology.* 2008 Feb;47(2):636-47
- Yu Q, Stamenkovic I.** Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000 Jan 15;14(2):163-76.
- Yu L, Hébert MC, Zhang YE.** TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.* 2002 Jul 15;21(14):3749-59
- Yu J, Zhang L, Chen A, Xiang G, Wang Y, Wu J, Mitchelson K, Cheng J, Zhou Y.** Identification of the gene transcription and apoptosis mediated by TGF-beta-Smad2/3-Smad4 signaling. *J Cell Physiol.* 2008 May;215(2):422-33.
- Yu X, Song M, Chen J, Zhu G, Zhao G, Wang H, Hunag L.** Hepatocyte growth factor protects endothelial progenitor cell from damage of low-density lipoprotein cholesterol via the PI3K/Akt signaling pathway. *Mol Biol Rep.* 2010 Jun;37(5):2423-9
- Yusoff P, Lao DH, Ong SH, Wong ES, Lim J, Lo TL, Leong HF, Fong CW, Guy GR** Sprout2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. *J Biol Chem.* 2002 Feb 1;277(5):3195-201
- Zarnegar R.** Regulation of HGF and HGFR gene expression. *EXS* 1995 ; 74:33-49.
- Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, Piek E, Bottinger EP.** Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 5;98(12):6686-91.
- Zavadil J, Narasimhan M, Blumenberg M, Schneider RJ.** Transforming growth factor-beta and microRNA:mRNA regulatory networks in epithelial plasticity. *Cells Tissues Organs.* 2007;185(1-3):157-61
- Zeisberg M, Neilson EG.** Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009 June 1; 119(6): 1429–1437.
- Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R.** Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007a Aug;13(8):952-61.
- Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R.** Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2007b Aug 10;282(32):23337-47
- Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R.** Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2007c Nov 1;67(21):10123-8.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ.** "Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression." *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 33 (3): 337–49.

**Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ.** Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996; 87, 619-628.

**Zhang YE.** Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling *Cell Res.* 2009 January ; 19(1): 128–139

**Zhang YW, Vande Woude GF.** HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem* 2003; 88 (2):408-417.

**Zhang Y, Adachi M, Kawamura R, Imai K.** Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006 Jan;13(1):129-40.

**Zhang R, Chae S, Lee JH, Hyun JW.** The cytoprotective effect of butin against oxidative stress is mediated by the up-regulation of manganese superoxide dismutase expression through a PI3K/Akt/Nrf2-dependent pathway. *J Cell Biochem.* 2012 Jan 17

**Zhai B, Yan HX, Liu SQ, Chen L, Wu MC, Wang HY.** Reduced expression of E-cadherin/catenin complex in hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol* 2008;14:5665–5673 #

**Zhou XF, Wang Q, Chu JX, Liu AL.** Effects of retrorsine on mouse hepatocyte proliferation after liver injury. *World J Gastroenterol* 2006;12:1439–1442.

**Zioncheck TF, Richardson L, Liu J, Chang L, King KL, Bennett GL, Fügedi P, Chamow SM, Schwall RH, Stack RJ.** Sulfated oligosaccharides promote hepatocyte growth factor association and govern its mitogenic activity. *J Biol Chem.* 1995 Jul 14;270(28):16871-8

**Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF.** Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001; 50: 521-533