

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Relevancia de la vía HGF/Met en regeneración hepática durante un daño
colestásico crónico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carlos González Corralejo

DIRIGIDA POR

Aránzazu Sánchez Muñoz
Blanca María Herrera González



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
PROGRAMA DOCTORADO BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA
MOLECULAR Y BIOMEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Relevancia de la vía HGF/Met en regeneración hepática
durante un daño colestásico crónico.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Carlos González Corralejo

Directoras
Aránzazu Sánchez Muñoz
Blanca María Herrera González

Madrid 2024








A mis abuelos, padres, a mi hermana.





AGRADECIMIENTOS





En primer lugar, tengo que agradecer al Departamento de Bioquímica, Biología molecular y Biomedicina de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y todos sus integrantes por hacer posible la participación en esta aventura. Gracias a mis dos Directoras de Tesis que a pesar de las distintas etapas recorridas siempre estuvieron aquí. Pero esto no hubiera sido posible sin el “Grupo Hígado”, y todos los integrantes que están o estuvieron desde el inicio de 2021, cuando os conocí. Pasaron casi 5 años de aquella primera vez. Todo esto ha sido un poquito más fácil por vosotros, gracias por vuestro tiempo. En especial, gracias Juan, María F., María R., Nerea P., Nerea L., Cristina, Paloma, César, Blanca y Arancha. Y todas aquellas personas con quién pasé tanto tiempo en la sala de cultivos, esas tardes fueron geniales, gracias a vuestra compañía. Guardo un bonito recuerdo de esta etapa. Aprendí mucho de vosotros y así empezó a gustarme la investigación.

Pero también tengo que agradecer a mi nueva familia del Hospital Clínico San Carlos, en especial, a mis compañeros de Microbiología. Cristina, Elvira, Irene, Paloma, Fernando, Iciar, Esther, Jorge, Berta, Ana, Alberto...gracias. Es por vosotros por lo que pude acabar esta etapa que tanto me ha dado para hablar. Vuestros consejos y todo ese apoyo que me regalasteis en cada momento fueron muy importantes para mí. Gracias por todas esas conversaciones que me permitieron no abandonarlo y que llegara a su última etapa este viaje, una locura más. Gracias a mis compañeros residentes, no conozco nada lo suficientemente bueno como para compararos, sois especiales para mí. Gracias Pilar, mi mejor compañera de residencia. Gracias Esmeralda y Miguel, fuisteis especiales desde el principio. Gracias al resto del grupo de integrantes del Servicio de Microbiología.

Gracias a mi familia, por estar siempre cerca. En especial, a cinco personas que siempre están aquí. Gracias madre y padre. Gracias abuela y abuelo, sois mis segundos madre y padre. Gracias María por estar ahí también dando un poco de rumbo a esta familia.

Realmente lo único que pasa por la mente durante estos años es si en algún momento se llegará a alcanzar la meta de finalizar el proyecto de investigación. Pero lo bueno y mejor de todo, ha sido el placer de poder crecer con todos vosotros. Conseguí darme cuenta de ello. Aunque este trabajo lleve nombre y apellidos, todos lo habéis hecho posible, y eso me ha regalado la fuerza suficiente para conseguirlo. Gracias siempre.



ÍNDICE

RESUMEN	16
ABREVIATURAS	24
INTRODUCCIÓN	29
1. Fisiología hepática	31
2. La bilis y los ácidos biliares	32
3. Enfermedad crónica hepática	36
4. Regeneración hepática	38
5. Células progenitoras hepáticas	41
6. Vía de HGF/Met	43
7. Vía de TGF- β	48
8. Respuesta antioxidante	52
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	60
1. Experimentación animal	62
1.1. Declaración ética	62
1.2. Generación de ratones transgénicos de Met	62
1.3. Modelo de daño hepático inducido por dieta DDC	63
1.4. Proceso de recogida de muestras	63
1.5. Cálculo de la relación entre el peso del hígado y peso del cuerpo	64
1.6. Análisis de marcadores séricos	64
1.7. Análisis morfométrico cuantitativo de la expansión de CPH/OC	64
1.8. Análisis histopatológico. Tinción de Rojo Sirio (Sirius Red)	64
2. Cultivo de líneas celulares	65
2.1. Modelos celulares: hepatocitos inmortalizados	65
2.2. Modelos celulares: CPH/OC	67
2.3. Condiciones de cultivo celular	67
2.4. Factores de crecimiento y ácidos biliares	68
3. Análisis de ADN	68
3.1. Aislamiento de ADN genómico	68
3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	69

4. Análisis de expresión génica	70
4.1. Aislamiento de ARN total.....	70
4.2. Síntesis de ADNc (RT, retrotranscripción).....	71
4.3. RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR).....	71
5. Análisis de expresión de proteínas	73
5.1. Análisis de la expresión de proteínas mediante western blot	73
5.1.1. Obtención de extractos proteicos celulares	73
5.1.2. Obtención de extractos proteicos a partir de tejido hepático.....	73
5.1.3. Cuantificación de proteínas	73
5.1.4. Electroforesis de proteínas.....	74
5.1.5. Transferencia de proteínas	74
5.1.6. Inmunodetección de proteínas	74
5.2. Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	75
5.2.1. Tinción inmunohistoquímica de CK19/Ki67 a partir de cortes histológicos embebidos en parafina	75
5.3 Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunoprecipitación	77
6. Análisis de la viabilidad y proliferación celular	77
6.1. Contaje celular	77
6.2. Tinción cristal violeta.....	77
7. Determinación de la actividad β-Galactosidasa	78
8. Análisis de la producción de radicales libres de oxígeno mediante la medida de fluorescencia en placa	78
9. Determinación de la actividad Caspasa 3	80
10. Determinación de niveles de glutatión celular	80
10.1. Niveles de glutatión intracelular total	80
10.2. Niveles de glutatión reducido (GSH) intracelular	82
10.3. Niveles de glutatión oxidado (GSSG) intracelular.....	82
11. Determinación de actividades enzimáticas antioxidantes.....	83
11.1. Obtención de los extractos proteicos	83
11.2. Actividad enzimática de glutatión reductasa.....	83
11.3. Actividad enzimática de catalasa	85
11.4. Actividad enzimática de superóxido dismutasa	85
12. Determinación de los niveles de proteínas carboniladas.....	85
13. Análisis transcriptómico mediante la tecnología MACE (<i>Massive Analysis of cDNA Ends</i>).....	86

14. Análisis estadístico	87
RESULTADOS.....	89
1. La sobreexpresión de Met reduce el daño hepático durante la colestasis.....	91
1.1. La sobreexpresión de Met reduce el daño hepático en ratones sometidos a dieta DDC	91
1.2. La sobreexpresión de Met conduce a una aminoración de la reacción ductular inducida por la dieta DDC.....	100
1.3. La sobreexpresión de Met protege y mejora la capacidad regenerativa de los hepatocitos frente a un daño colestásico.....	102
1.4. La sobreexpresión de Met produce una alteración en la vía de TGF- β en el hígado de ratones sometidos a un daño colestásico	106
1.5. La sobreexpresión de Met promueve una respuesta antioxidante potente frente al daño colestásico.....	112
2. Determinación de genes regulados por la vía HGF/Met en CPH/OC....	119
2.1. Análisis transcriptómico de los genes modulados por HGF en células ovas	119
2.2. Análisis de la expresión de los genes diana de HGF en células ovas en el hígado de ratones sometidos a un daño colestásico	126
DISCUSIÓN	130
CONCLUSIONES	152
BIBLIOGRAFÍA	156





RESUMEN

RELEVANCIA DE LA VÍA DE HGF/MET EN REGENERACIÓN HEPÁTICA DURANTE UN DAÑO COLESTÁSICO CRÓNICO

Introducción

Las enfermedades hepáticas crónicas, entre las que se incluyen las enfermedades colestásicas, constituyen un gran problema de salud mundial. Éstas son el resultado de un proceso complejo, iniciado por el estancamiento del flujo biliar, asociado a inflamación, estrés oxidativo y fibrosis, con pérdida de la funcionalidad en etapas avanzadas.

En respuesta a un daño, en el hígado pone en marcha una respuesta tisular para intentar restablecer la homeostasis y la funcionalidad. Los hepatocitos juegan un papel clave en las etapas iniciales de esta respuesta, ya que conservan su capacidad proliferativa y de regeneración. Sin embargo, si el daño es severo y persistente y sobrepasa la capacidad regenerativa de los hepatocitos, este proceso se ve comprometido. En esta situación son claves las células progenitoras hepáticas, denominadas células ovas en roedores (CPH/OC), que actuarían como una segunda línea de defensa contra el fallo hepático, contribuyendo a la regeneración hepática.

La vía de HGF/Met juega un papel esencial en el proceso de regeneración hepática, tanto en la regeneración clásica, mediada por los hepatocitos, como en procesos de regeneración en la que intervienen las CPH/OC. En diferentes modelos experimentales se ha evidenciado un papel protector y antifibrogénico de la vía. Además, es un regulador clave de estas células. En las CPH/OC se ha descrito su papel en la regulación de distintos procesos, que incluyen la proliferación, supervivencia, migración e invasión, y los procesos morfogenéticos. A pesar de estas acciones, una activación aberrante de la vía está asociada al desarrollo y/o progresión de la hepatocarcinogénesis.

Por otro lado, otra señal que controla la biología de las células hepáticas, incluyendo las CPH/OC, es la vía de TGF- β . Así, el TGF- β regula la proliferación, la muerte/supervivencia, procesos de transición epitelio-mesénquima, invasión y migración. Es, además, uno de los factores pro-fibrogénicos más importantes y tiene un papel dual en los procesos de carcinogénesis hepática.

Por tanto, las vías de HGF/Met y TGF- β son centrales en la regulación de los procesos de fibrosis y regeneración hepática, y forman parte esencial en el entramado de señales que regulan la biología de los hepatocitos y las CPH/OC. Además, existen evidencias previas en la literatura de que la vía de HGF/Met se opone o modula las acciones de TGF- β en diferentes contextos. Sin embargo, la contribución exacta de la vía HGF/Met en la enfermedad colestásica y los mecanismos subyacentes son solo parcialmente conocidos. Tampoco se han dilucidado los genes diana que median las acciones de la vía de HGF/Met en las CPH/OC y que podrían ser claves para modular su acción regenerativa.

Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es avanzar en el conocimiento de la relevancia de la vía de HGF/Met en la biología de los hepatocitos y CPH/OC, y en especial, su contribución a la respuesta regenerativa frente a un daño colestásico, a través de la regulación de estas poblaciones celulares. Para ello, se plantean los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar el proceso de regeneración hepática en ratones que sobreexpresan el receptor Met (Tg Met) sometidos a un daño colestásico crónico, y dilucidar los mecanismos que subyacen a los efectos provocados por la sobreexpresión de Met.
2. Estudiar el perfil de genes regulados por la vía de HGF/Met en las CPH/OC mediante un análisis transcriptómico por tecnología de alto rendimiento, así como su posible relevancia durante la respuesta regenerativa.

Resultados

Para abordar el primer objetivo, se utilizaron ratones transgénicos con sobreexpresión del receptor Met (Tg Met) en el hígado sometidos a una dieta suplementada con 3,5-Dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) que induce un proceso de colestasis. En primer lugar, se validó el modelo mediante diferentes abordajes, como el análisis de los niveles ARNm del receptor y niveles proteicos de fosforilación tanto en hígados de ratones como en hepatocitos aislados. La sobreexpresión de Met reduce el daño durante la colestasis en el modelo de dieta DDC con menores niveles de marcadores séricos de daño hepático (bilirrubina total, fosfatasa alcalina y aspartato aminotransferasa, AST) junto con un perfil favorable en la ratio peso hígado/peso animal. Además, los hígados de los ratones Tg Met presentaban menor nivel de apoptosis y mayor porcentaje de hepatocitos proliferativos. Aunque no se observaron diferencias en el depósito de colágeno entre los ratones Wt y Tg Met durante la dieta DDC, algunos mediadores de la remodelación de matriz extracelular como MMP9 y TIMP1 relacionados con la resolución de la fibrosis mostraron una tendencia en su regulación compatible con este fenómeno en ratones Tg Met. Además, nuestros resultados muestran con claridad que los ratones que sobreexpresan Met presentan una reacción ductular aminorada con una menor expansión de CPH/OC en respuesta a la dieta DDC.


Por otro lado, la sobreexpresión de Met impide la regulación al alza de los receptores de TGF- β I, II y III que se producen durante el daño colestásico inducido por DDC, lo que da lugar a una disminución de la fosforilación/activación de SMAD2 y a una regulación aminorada de los genes diana de TGF- β *Smad7* y *Serpine1*. Esta situación se ve parcialmente reproducida en hepatocitos pretratados con la sal biliar TCDC (ácido tauroquenodesoxicólico). Usando este modelo *in vitro* demostramos que hepatocitos Tg Met pretratados con TCDC, están protegidos frente al estrés oxidativo inducido por TGF- β . El análisis de diferentes sistemas antioxidante reveló que la sobreexpresión de Met regulaba al alza genes implicados en la síntesis de glutatión, y Nrf2, un factor de transcripción esencial en la defensa antioxidante, y en consistencia, los niveles de glutatión permanecían elevados en células tratadas con TGF- β en presencia de TCDC.

Esto nos condujo a comprobar el estado redox en los hígados de los ratones Tg Met tratados con la dieta DDC. Estos ratones tenían mayores niveles de expresión de los genes que observábamos en el modelo *in vitro* (*Nfe2l2*, *Gclc* y *Gss*), así como mayores niveles de glutatión total y reducido, y menores niveles de ROS.

El abordaje del objetivo 2 nos ha llevado a la realización de un análisis de expresión génica masivo mediante la tecnología MACE (*Massive Analysis of cDNA Ends*) sobre CPH/OC con diferentes niveles de expresión de Met tratadas o no con HGF. Este análisis determinó 16 genes comúnmente regulados de forma significativa en las células que expresan Met en respuesta al HGF, y no se regulaban en las células que carecían de la actividad catalítica de Met (CPH/OC Met^{-/-}). El estudio detallado de estos genes permitirá conocer los mecanismos por los cuales el HGF modula la biología de las CPH/OC, que a su vez nos permitirá entender la respuesta de estas células frente a daño colestásico y su contribución a los procesos de regeneración.

Conclusiones

1. La sobreexpresión moderada de Met en hígado de ratón confiere protección frente al daño colestásico inducido por la dieta DDC, lo que se evidencia por menores niveles de marcadores séricos de daño hepático, y una mayor ratio peso hígado/peso animal.
2. Este efecto protector no está asociado a una reducción del depósito hepático de fibras de colágeno I y III durante la colestasis, a pesar de observarse cambios en los niveles de expresión de genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular y la fibrosis.
3. La sobreexpresión moderada de Met conduce a una aminoración de la reacción ductular y de la inducción de marcadores de células progenitoras hepáticas, lo que, junto a una menor respuesta apoptótica y mayor proliferación de hepatocitos, sugiere que se promueve una respuesta regenerativa mediada principalmente por hepatocitos.
4. La mejora en la respuesta regenerativa inducida por sobreexpresión de Met está asociada a una menor activación de la vía del TGF- β , lo que se evidencia por una menor expresión de sus receptores de señalización, menores niveles de activación de SMAD2, y de sus dianas transcripcionales.
5. El modelo *in vitro* de colestasis basado en el pretratamiento de hepatocitos con la sal biliar TCDC ha demostrado que en un contexto colestásico los hepatocitos con sobreexpresión de Met (Tg Met) tienen una respuesta aminorada al TGF- β , tanto a nivel de señalización, como de la respuesta prooxidante y apoptótica inducidas.
6. Tanto los ratones Tg Met sometidos a dieta DDC como los hepatocitos Tg Met pretratados con TCDC y TGF- β , muestran niveles superiores de expresión de Nrf2 y sus genes diana, en particular enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión, indicando que la sobreexpresión de Met promueve una respuesta antioxidante más eficiente.
7. El análisis transcriptómico de genes modulados por HGF en CPH/OC ha proporcionado un conjunto de genes candidatos para el estudio y la modulación de la



respuesta hepática frente a un daño colestático, así como de la expansión de esta población celular en dicho contexto.

RELEVANCE OF HGF/MET IN LIVER REGENERATION DURING CHRONIC CHOLESTATIC DAMAGE

Introduction

Chronic liver diseases, including cholestatic diseases, are a major global health problem. They are the result of a complex process, initiated by bile flow blockage, associated with inflammation, oxidative stress and fibrosis, with a loss of hepatic function in advanced stages.

In response to a damage, a regenerative response is triggered in the liver in an attempt to restore homeostasis and function. Hepatocytes play a key role in the early stages of this response, as they retain their proliferative and regenerative capacity. However, if the damage is severe and persistent and exceeds the regenerative capacity of hepatocytes, this process is compromised. In this situation, hepatic progenitor cells, called rodent oval cells (HPC/OC) become key, acting as a second line of defense against liver failure, contributing to liver regeneration.

The HGF/Met pathway plays an essential role in the liver regeneration process, both in the classical hepatocyte-mediated and in the HPC/OC-mediated regeneration. The protective and anti-fibrotic role of the pathway has been demonstrated in different experimental models. It is also a key regulator of these cells. Thus, in HPC/OC it has been described that this pathway plays a role in the regulation of different processes, including proliferation, survival, migration and invasion, and morphogenetic processes. Despite these actions, aberrant activation of the pathway is associated with the development and/or progression of hepatocarcinogenesis.

Another signal that controls the biology of liver cells, including HPC/OC, is the TGF- β pathway. TGF- β regulates cell proliferation, death/survival, epithelial-mesenchymal transition processes, invasion and migration. It is also one of the most important pro-fibrogenic factors and has a dual role in liver carcinogenesis.

Therefore, both HGF/Met and TGF- β pathways are central in the regulation of liver fibrosis and regeneration processes and are recognized as an essential part of the signalling network that regulates hepatocyte and HPC/OC biology. Furthermore, there is previous evidence in the literature that the HGF/Met pathway counteracts or modulates TGF- β actions in different contexts. However, the exact contribution of the HGF/Met pathway in cholestatic disease and the underlying mechanisms are only partially known. The target genes that mediate the actions of the HGF/Met pathway in HPC/OC and that might be key to modulate their regenerative action have not been elucidated either.

Aims

The main objective of this work is to advance in the knowledge of the relevance of the HGF/Met pathway in the biology of hepatocytes and HPC/OCs, and particularly its contribution to the regenerative response upon a cholestatic damage, through the

regulation of these cell populations. To this end, the following specific objectives are proposed:


1. To study the process of liver regeneration in mice overexpressing Met receptor (Tg Met) submitted to a chronic cholestatic damage, and to elucidate the mechanisms underlying the effects caused by Met overexpression.
2. To study the profile of genes regulated by the HGF/Met pathway in HPC/OCs by high-throughput transcriptomic analysis, as well as their possible relevance during the regenerative response.

Results

To address the first objective, transgenic mice overexpressing the Met receptor in the liver were fed with a diet supplemented with 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine (DDC) that induces a process of cholestasis. First, the model was validated using different approaches, such as the analysis of receptor mRNA levels and protein phosphorylation levels in both mouse livers and isolated hepatocytes. Met overexpression reduces liver damage during cholestasis in the DDC diet model evidenced by lower levels of serum markers of liver damage (total bilirubin, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase, AST) along with a favorable liver weight/animal weight ratio. In addition, the livers of Tg Met mice showed lower levels of apoptosis and a higher percentage of proliferative hepatocytes. Although no differences in collagen deposition were observed between Wt and Tg Met mice during the DDC diet, some mediators of extracellular matrix remodelling such as MMP9 and TIMP1 that have been associated with fibrosis resolution, showed a trend in their regulation compatible with this phenomenon in Tg Met mice. Furthermore, our results clearly show that Met-overexpressing mice exhibit a decreased ductular reaction with reduced HPC/OC expansion in response to the DDC diet.

On the other hand, Met overexpression prevents the up-regulation of TGF- β receptors I, II and III that occurs during DDC-induced cholestatic damage, resulting in decreased SMAD2 phosphorylation/activation and down-regulation of TGF- β target genes, Smad7 and Serpine1. These phenomena are partially reproduced in hepatocytes pre-treated with the bile acid TCDC (taurochenodeoxycholic acid). Using this *in vitro* model, we demonstrate that Tg Met hepatocytes pretreated with TCDC are protected against TGF- β -induced oxidative stress. Analysis of different antioxidant systems revealed that Met overexpression up-regulated genes involved in glutathione synthesis, and Nrf2, an essential transcription factor orchestrating antioxidant defenses, and consequently, glutathione levels remained elevated in TGF- β -treated cells in the presence of TCDC. This led us to check the redox status in the livers of Tg Met mice fed with the DDC diet. These mice showed an up regulation of the same genes that we observed in the *in vitro* model (*Nfe2l2*, *Gclc* y *Gss*), as well as higher levels of total and reduced glutathione and lower levels of ROS.

Addressing objective 2 led us to perform a massive gene expression analysis using MACE (Massive Analysis of cDNA Ends) technology on HPC/OC with different levels of Met expression treated or not with HGF. This analysis determined 16 genes that were



commonly significantly regulated in cells expressing Met in response to HGF and were not regulated in cells lacking Met catalytic activity (Met^{-/-} HPC/OC). A detailed study of these genes will provide insight into the mechanisms by which HGF modulates HPC/OC biology, which in turn will allow us to understand the response of these cells to cholestatic damage and their contribution to regenerative processes.

Conclusions

1. Moderate overexpression of Met in mouse liver confers protection against cholestatic damage induced by the DDC diet, as evidenced by lower levels of serum markers of liver damage, and a higher liver weight/animal weight ratio.
2. This protective effect is not associated with a reduction in the hepatic deposition of collagen I and III fibers during cholestasis, despite changes in the expression levels of genes related to extracellular matrix remodelling and fibrosis.
3. Moderate overexpression of Met leads to decreased ductular reaction and induction of HPC/OC, which, together with a decreased apoptotic response and increased hepatocyte proliferation, suggests that a hepatocyte-mediated regenerative response is mainly promoted.
4. The enhanced regenerative response induced by Met overexpression is associated with reduced activation of the TGF- β pathway, as evidenced by lower expression of its signaling receptors, together with lower levels of SMAD2 activation and its transcriptional targets.
5. The *in vitro* model of cholestasis based on the pre-treatment of hepatocytes with the bile acid TCDC has shown that in a cholestatic context, hepatocytes with Met overexpression (Tg Met) have a decreased response to TGF- β , both at the signalling level, and at the pro-oxidant and apoptotic responses.
6. Both Tg Met mice subjected to DDC diet and Tg Met hepatocytes pretreated with TCDC and TGF- β show higher levels of expression of Nrf2 and its target genes, in particular enzymes related to glutathione metabolism, indicating that Met overexpression promotes a more efficient antioxidant response.
7. Transcriptomic analysis of HGF-modulated genes in HPC/OC has provided a set of candidate genes for the study and modulation of the hepatic response to cholestatic damage, as well as the expansion of this cell population in this context.





ABREVIATURAS

AB	Ácidos Biliares
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	<i>AK strain Transforming</i>
ALB	Albúmina
ALT	Alanina aminotransferasa
AMA	<i>Antimitochondrial Antibodies</i>
AMP	<i>Adenosin Monophosphate</i>
ANIT	Alfa-naftil isotiocianato
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato aminotransferasa
BCL-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BDL	<i>Bile Duct Ligation</i>
BIM	<i>BCL-2-like-11</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
BSEP	<i>Bile Salt Export Pump</i>
CA	<i>Cholic Acid</i>
CBP	Colangitis Biliar Primaria
CCL₄	Tetracloruro de carbono
CDCA	<i>Quenodeoxycholic Acid</i>
CEP	Colangitis Esclerosante Primaria
CI	Control Interno
CIFP	Colestasis Intrahepática Familiar Progresiva
CK	Citoqueratina
CKI	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitors</i>
COL	Colágeno
CO-SMAD	<i>Cooperating SMAD</i>
CPH	Célula Progenitora Hepática
CYP	Citocromo
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DCF	2',7'-Diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de dihidro-2',7'-diclorofluoresceína
DCA	<i>Deoxycholic Acid</i>
DDC	3,5-Dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido EtilendiaminoTetracético
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ECH	Enfermedad Crónica Hepática
EMT	<i>Epithelial to Mesenchymal Transition</i>
EPCAM	<i>Epithelial Cellular Adhesion Molecule</i>
ERK	Extracelular Signal-Regulated Kinases
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>

FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factors</i>
FXR	Receptor Farnesoide X
GAB1	<i>GRB2 associated binding protein 1</i>
GCA	<i>Glycocholic Acid</i>
GDF	<i>Growth Differentiation Factors</i>
GR	Glutati3n Reductasa
GRB2	<i>Growth factor Receptor-Bound protein 2</i>
GS	Glutati3n Sintetasa
GSH	Glutati3n reducido
GSHPX	Glutati3n Peroxidasa
GSSG	Glutati3n oxidado
H&E	Hematoxilina y Eosina
HCC	<i>Hepatocellular Carcinoma</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IBAT	<i>Ileal Bile Acid Transporter</i>
IL	Interleucina
IFN-G	Interfer3n gamma
IP	Inmunoprecipitaci3n
IPT	<i>Immunoglobulin-like domains shared by Plexins and Transcriptional factors</i>
I-SMAD	<i>Inhibitory SMAD</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LAP	<i>Latency associated Peptide</i>
LCA	<i>Lithocholic Acid</i>
LPS	Lipopolisac3ridos
MACE	<i>Massive Analysis of cDNA Ends</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MDR	<i>Multidrug Resistance-associated Protein</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MRP	<i>Multidrug Resistance Protein</i>
MET	<i>Mesenchymal to Epithelial Transition</i>
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
NAC	N-acetil ciste3na
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucle3tido
NEM	N-etilmaleimida
NF-KB	<i>Factor kappa-Light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NOX	Oxidasas dependientes de NADPH
NTCP	<i>Na-Taurocholate Cotransporting Polypeptide</i>
OATP	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide</i>
OC	<i>Oval Cell</i>
OCA	<i>Obeticholic Acid</i>
OPT	σ -Ftaldialdehido
PAI	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reacci3n en cadena de la polimerasa

PAI1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PLC-G	<i>Phospholipase C gamma</i>
PSI	<i>Plexin-Semaphorin-Integrin</i>
PVDF	<i>Polifluoruro de Vinilideno</i>
RAC	<i>Ras related C3 botulinum toxin substrate</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
RH	<i>Regeneración Hepática</i>
RHOA	<i>Ras homolog family member A</i>
RHOB	<i>Ras homolog family member B</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
R-SMAD	<i>Receptor-associated SMAD</i>
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
RT	<i>Retrotranscripción (Transcripción reversa)</i>
RT-QPCR	<i>Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SAM	<i>S-adenosil metionina</i>
S.D.	<i>Standard Deviation</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
SDS-PAGE	<i>SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
S.E.M.	<i>Standard Error of the Mean</i>
SHC	<i>SH2 domain-containing transforming protein</i>
SHP2	<i>Src Homology 2 domain-containing Phosphatase-2</i>
SMAD	<i>Caenorhabditis elegans Sma genes and the Drosophila Mad, Mothers Against Decaplegic homolog</i>
SNAIL	<i>Snail Family Transcriptional Repressor 1</i>
SOD	<i>Superóxido dismutasa</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TCA	<i>Taurocholic Acid</i>
TCDC	<i>Taurochenodeoxycholic Acid</i>
TE	<i>Tampón Tris-EDTA</i>
TG	<i>Transgenic</i>
TGF-B	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIEG1	<i>TGF-β-inducible early response gene 1</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinase</i>
TNF-A	<i>Tumor Necrosis Factor alfa</i>
TPA	<i>Tissue-type Plasminogen Activator</i>
TTBS	<i>Tween 20-tris-buffered saline</i>
TWEAK	<i>Tumor Necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i>
TWIST	<i>Twist Family BHLH Transcription Factor 1</i>
TβR	<i>TGF-β Receptor</i>
UDCA	<i>Ursodeoxycholic Acid</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WT	<i>Wild Type</i>
ZEB	<i>Zinc finger E-box-Binding homeobox</i>





INTRODUCCIÓN



1. Fisiología hepática.

El hígado es un órgano central, compuesto por cuatro lóbulos, con numerosas funciones implicadas en metabolismo, detoxificación y almacenamiento, siendo un órgano vital con alta capacidad regenerativa en respuesta a un daño (Itoh T. & Miyajima A., 2014). Está formado por células parenquimáticas (hepatocitos y colangiocitos) y células no parenquimáticas (células endoteliales, células de Kupffer, linfocitos, fibroblastos y células estrelladas, entre otras). La unidad funcional está formada por el lobulillo hepático, el cual está delimitado por la triada portal (**Figura 1**). El hígado humano contiene entre 50.000-100.000 lobulillos (Krishna M., 2014). La triada portal está formada por una rama de la vena porta, arteria hepática y un ducto biliar. Los hepatocitos, principales células del parénquima hepático, presentan una forma poliédrica y dos o más caras de microvellosidades (Guiton C. A. & Hall J. E.: Tratado de fisiología médica), y son las encargadas de realizar la mayoría de las funciones del hígado.

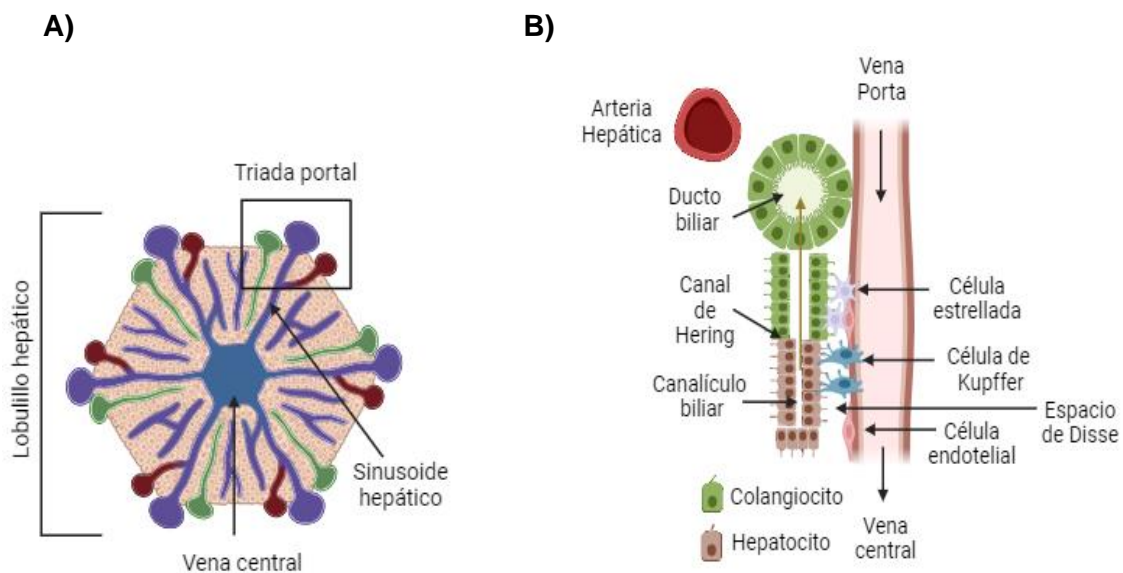


Figura 1. Esquema representativo del lóbulo hepático y la triada portal. A) La triada portal está formada por una rama de la vena porta (en morado), una de la arteria hepática (en rojo) y un conducto biliar (en verde). Cada lobulillo hepático está compuesto por seis triadas portales alrededor de una vena central, con forma de prisma hexagonal. **B)** Los hepatocitos forman la bilis, la liberan al canalículo biliar pasando por el Canal de Hering, formado por colangiocitos y hepatocitos, y desembocando en el ducto biliar. En sus proximidades se encuentra la vena porta y la arteria hepática que confluyen en los sinusoides hepáticos, éstos a su vez vierten su contenido a la vena central. Adaptado de: Duncan A. W., 2009. Creado con: BioRender.com.

El espacio de Disse es un compartimento situado entre las células endoteliales y los hepatocitos, en el que se encuentra el microentorno en el que se produce el intercambio de sustancias de la sangre periférica y los hepatocitos. Contiene abundante plasma, tejido conectivo (forma el marco de reticulina) y células estrelladas hepáticas (también llamadas “células de Ito”). Las células estrelladas son células no parenquimáticas que

están íntimamente relacionadas con las terminaciones nerviosas pequeñas y desempeñan un importante papel en el control del flujo sanguíneo sinusoidal, la fibrogénesis y el almacenamiento de vitamina A3, 4 y 5 (Krishna M., 2014). Las células de Kupffer son macrófagos que constituyen uno de los tipos celulares hepáticos funcionalmente más activos. Así, son los principales productores de citoquinas, factores de crecimiento y otros mediadores celulares en el hígado. Ejercen funciones vitales para el organismo tales como la eliminación de sustancias extrañas y la regulación de la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Las células de Kupffer desempeñan también un papel fisiopatológico destacado en el daño hepático causado por endotoxinas o alcohol y en la patogénesis de la inflamación y fibrosis hepática (Dixon L. J. et al., 2013).

2. La bilis y los ácidos biliares.

La bilis es producida por los hepatocitos, como una de sus principales funciones. Tiene un pH comprendido entre 8.0-8.5 y está compuesta por colesterol, lecitina, sales biliares (alrededor de un 0,7%), bilirrubina, biliverdina, sodio, potasio, bicarbonato, agua y algunos elementos como cobre o hierro. La bilis se almacena en la vesícula biliar y es liberada durante el proceso de digestión ante estímulos principalmente nerviosos y hormonales (principalmente mediados por la hormona colecistoquinina secretada por la mucosa intestinal). Se forman aproximadamente 600-750 ml de bilis al día, con un ritmo de secreción variable, en torno a 10-20 μ l por segundo durante el proceso de digestión. Algunos solutos osmóticamente activos como el glutatión y el bicarbonato promueven el flujo de bilis independiente de las sales biliares. Posteriormente, la bilis es modificada por los colangiocitos, que diluyen y alcalinizan la bilis mediante procesos de absorción y secreción (Hundt M., 2022).

Hay dos tipos de ácidos biliares: ácidos primarios, denominados ácido cólico (por sus siglas en inglés, CA) y quenodesoxicólico (CDCA) (**Figura 2**), formados y secretados por el hepatocito, en una cantidad aproximada al día de 0,5 g. En el intestino estos ácidos serán metabolizados y convertidos en ácidos biliares secundarios: del ácido cólico se obtiene el ácido desoxicólico (DCA) y del ácido quenodesoxicólico se obtiene el ácido litocólico (LCA) por la acción de enzimas procedentes de la microbiota bacteriana intestinal. De este modo las sales biliares se reciclan y reabsorben volviendo al hepatocito para utilizarse de nuevo mediante su captación a través del espacio de Disse (**Figura 3**). Tanto los ácidos biliares primarios como los secundarios se unen a aminoácidos como la glicina y la taurina formando así ácidos biliares conjugados (**Figura 2**). La conjugación facilita su solubilidad en medios acuosos y potencia su actividad como detergente. Las sales biliares mayoritarias en la bilis humana son el ácido taurocólico (TCA) y glicocólico (GCA) (Kuhajda K. et al., 2006). Estos ácidos pueden experimentar otras transformaciones como epimerización o conjugación con N-acetilglucosamina por acción de la microbiota intestinal, obteniéndose los ácidos biliares terciarios.

Los ácidos biliares tienen propiedades tensioactivas cuando se encuentran en un medio neutro o ligeramente básico, siendo el extremo alifático, que contiene el grupo carboxilo, la parte hidrófila, mientras que el resto de la molécula presenta características lipofílicas.

Por eso, su principal función es emulsionar grasas y sustancias apolares formando agregados conocidos como micelas, lo que permite su absorción por parte del intestino delgado y que se mantengan solubles en la sangre. Esto facilita la labor de las lipasas, enzimas que degradarán los lípidos a ácidos grasos libres y glicerol. Además de su función emulsionante, los ácidos biliares también actúan como mediadores químicos, ya que se unen a diversos receptores celulares con el fin de desencadenar importantes procesos bioquímicos (incluyendo la señalización celular), e incluso participan en los mecanismos que regulan la inflamación de los tejidos dada la capacidad de estas moléculas de unirse a receptores de membrana acoplados a proteína G (Chiang J. Y., 2009).

Así, entre otras funciones, se sabe que intervienen en la movilización del calcio, en la activación de la proteína quinasa C, en la síntesis del AMP cíclico o en la segregación de citoquinas proinflamatorias. También intervienen en procesos oxidativos que tienen lugar en las mitocondrias e incluso participan en la señalización del receptor de insulina. Además, regulan el nivel de colesterol, participan en la eliminación de productos del catabolismo del grupo hemo, como la bilirrubina, y en la detoxificación de fármacos y xenobióticos (Singh J. et al., 2019).

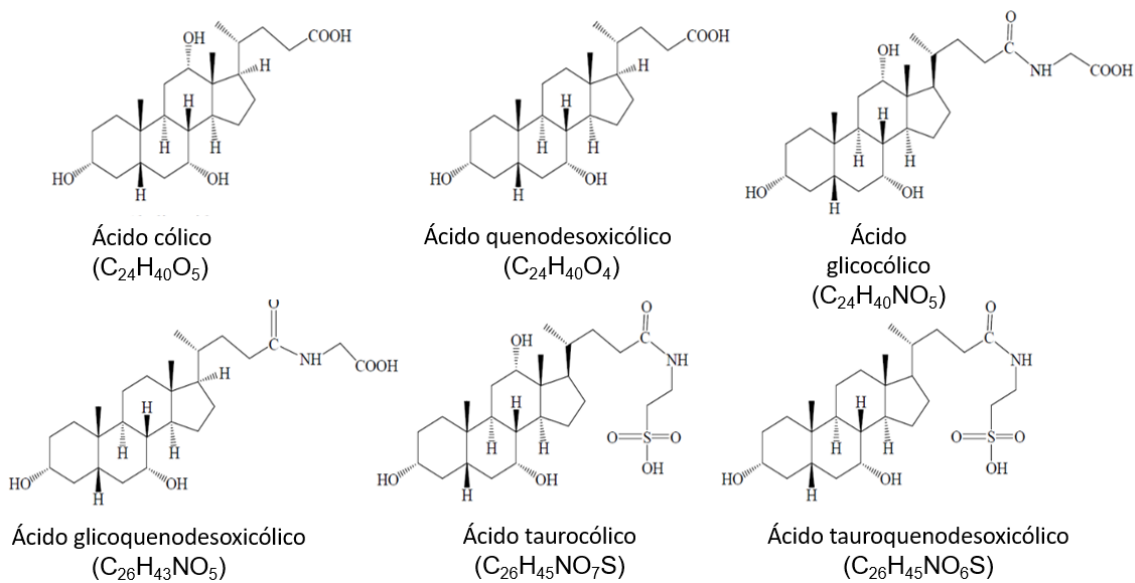


Figura 2. Fórmulas químicas de ácidos biliares primarios sin conjugar y conjugados. Los ácidos biliares primarios, cólico y quenodesoxicólico, son producidos y secretados por los hepatocitos al ducto biliar, de allí pasarán al intestino delgado donde tras ejercer su papel serán reabsorbidos y metabolizados mediante reacciones de tipo redox, convirtiéndose en ácidos biliares secundarios: desoxicólico y litocólico (no mostrados). Los ácidos biliares primarios y secundarios se unen a aminoácidos, como la glicina y la taurina, formando así ácidos biliares conjugados. Se muestra la fórmula química de los ácidos biliares primarios conjugados. Adaptado de: Kuhajda, K. et al, (2006).

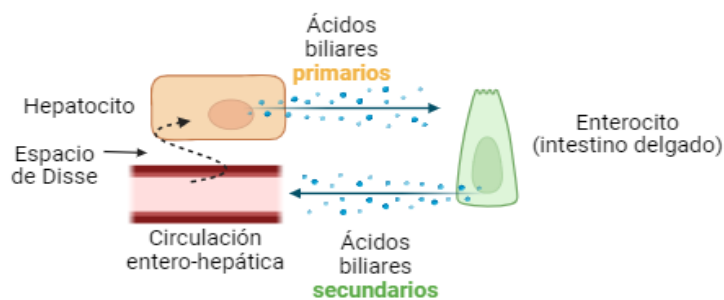


Figura 3. Esquema representativo de la circulación de ácidos biliares. Los ácidos biliares primarios (cólico y quenodesoxicólico) son producidos y secretados por los hepatocitos al ducto biliar, de allí pasarán al intestino delgado donde tras ejercer su papel serán reabsorbidos y metabolizados convirtiéndose en ácidos biliares secundarios (desoxicólico y litocólico). Mediante circulación entero-hepática, éstos ácidos biliares serán incorporados nuevamente al hepatocito para su posterior reutilización. Creado con: BioRender.com.

Los ácidos biliares son producidos en el hepatocito a partir del colesterol y la acción de sistemas enzimáticos como la enzima colesterol 7 α hidrolasa (codificada por el gen *Cyp7a1*) perteneciente a la familia del citocromo P450. Éstos son liberados por su extremo apical al ducto biliar mediante transportadores, por ejemplo, la bomba exportadora de sales biliares BSEP (*Bile Salt Export Pump*) codificada por el gen *Abcb11*, y las proteínas asociadas con resistencia a múltiples fármacos: MRP2 (*Multidrug Resistance-associated Protein 2*) codificada por el gen *Abcc2*, MDR3 (*Multidrug Resistance Protein 3*) codificada por el gen *Abcb4*, o algunas minoritarias, recientemente descritas como probables transportadores, como ABCG2 (*ATP-binding cassette subfamily G member 2*) codificada por el gen *Abcg2*. Tras su liberación al intestino y reabsorción, serán reconducidos por circulación entero-hepática de nuevo al hepatocito por su extremo basolateral. Los ácidos biliares secundarios pueden reintroducirse mediante transportadores como el péptido cotransportador de sodio-taurocolato NTCP (*Na-Taurocholate Cotransporting Polypeptide*), codificado por el gen *Slc10a1*, asociado a un cotransporte de moléculas de sodio, o el polipéptido transportador de aniones orgánicos OATP (*Organic Anion Transporting Polypeptide*) de tipo 1A1, 2, 3A1, codificados por los genes *Slco1a1*, *Slco2* y *Slco3a1*, respectivamente. También pueden liberarse ácidos biliares directamente al torrente circulatorio mediante los transportadores MRP3 y 4, proteínas de resistencia a múltiples fármacos tipo 3 y 4 (*Multidrug Resistance-associated Protein 3 and 4*, MRP4 codificado por el *Abcc4*, y OATP3A1 (*Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 3A1*) (Figura 4) (Gómez Aldana A. J. et al., 2020).

El NTCP representa la absorción de más del 80% de las sales biliares conjugadas (principalmente con taurina, como el ácido taurocólico), pero menos del 50% de las sales biliares no conjugadas (Kosters A. & Karpen S. J., 2008). Los sistemas de transporte hepatocelular están sujetos a una amplia regulación, principalmente marcados por sus niveles de transcripción génica. Estos procesos de regulación controlan la actividad de los sistemas de captación y flujo de sales biliares en respuesta a la acumulación intracelular de sales biliares y otros compuestos anfipáticos. Gracias a esta regulación transcripcional coordinada de los transportadores hepatocelulares involucrados en la captación y flujo hepático, y a la regulación de enzimas de la familia del citocromo P450,

el hígado puede responder rápidamente a los cambios en la homeostasis de los ácidos biliares, evitando así su acumulación en el interior del hepatocito.

Los ácidos biliares pueden unirse a receptores específicos y modular la expresión de genes. El receptor nuclear de ácidos biliares/receptor farnesoide X (BAR/FXR) está codificado por el gen *Nr4h1* (*Nuclear receptor subfamily 1 group H member 4*), y desempeña un papel predominante en la regulación de la síntesis y el transporte de ácidos biliares (Wu W. B. et al., 2015). El receptor FXR se expresa abundantemente en el hígado, donde es activado por diferentes ácidos biliares como el CDCA, DCA, CA y el ácido ursodesoxicólico (UDCA, ácido biliar terciario) (Puhl T. et al., 2006). En respuesta a dicha activación, FXR puede inducir la expresión de BSEP y MDR3, los principales transportadores implicados en la secreción canalicular de ácidos biliares y de fosfolípidos en la bilis (Schuetz E. G. et al., 2001). Así, durante la colestasis, los ácidos biliares aumentan su propio flujo a través de un aumento de la expresión de BSEP mediado por FXR, mientras que la inducción de MDR3 contrarresta la toxicidad de los ácidos biliares en el árbol biliar mediante la formación de micelas mixtas. Curiosamente, las bombas alternativas de exportación de ácidos biliares MRP3 y MRP4, que se expresan en la membrana basolateral de los hepatocitos, se inducen a través de un mecanismo independiente de FXR en respuesta a la colestasis obstructiva en ratones (Wagner M. et al., 2009). FXR también es capaz de regular negativamente la actividad de CYP7A1, y por tanto la síntesis de ácidos biliares, durante la colestasis. Además, los ácidos biliares pueden unirse a receptores acoplados a proteína G, como es el caso del receptor TGR5 (*Takeda-G-protein-receptor-5*) codificado por el gen *Gpbar5* (Ibrahim E. et al., 2018), relacionado con la activación de señales antiinflamatorias mediadas por la vía de mTOR/AKT y NF- κ B (Wang Y. D. et al., 2011).

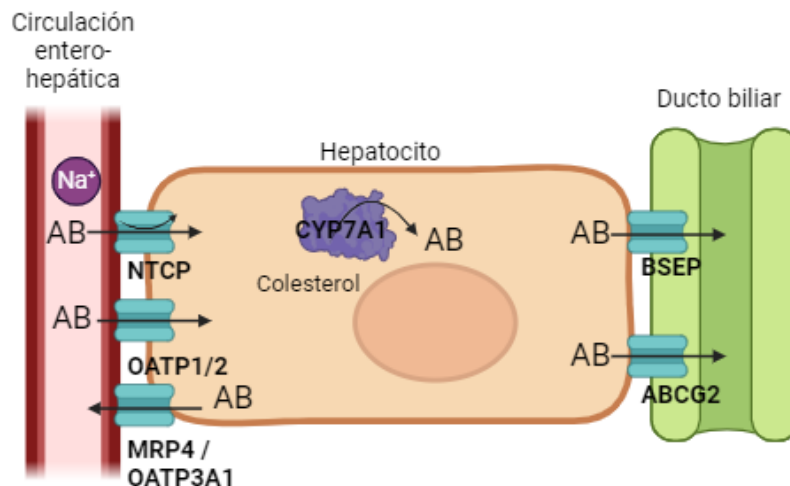



Figura 4. Esquema simplificado del transporte de ácidos biliares al interior y exterior del hepatocito. Los ácidos biliares (AB) son producidos a partir de colesterol por la enzima CYP7A1, y liberados al ducto biliar (a través de BSEP y ABCG2). Una vez se reabsorben en el intestino, son recaptados de la circulación periférica por transportadores como NTCP, OATP1 y 2. También pueden ser liberados al torrente sanguíneo por MRP4 y OATP3A1. Adaptado de: Gómez Aldana A. J. et al., 2020. Creado con: BioRender.com.

3. Enfermedad crónica colestásica.

Las Enfermedades Crónicas Hepáticas (ECH) son un conjunto de alteraciones hepáticas progresivas, producidas por el desarrollo de inflamación crónica y fibrosis, que afectan a la estructura y las funciones del hígado. La ECH se caracteriza por la destrucción gradual e irreversible del hígado, que puede acabar en cirrosis, donde en muchos casos el trasplante hepático es la única solución curativa. Dentro de las ECH, las enfermedades crónicas colestásicas consisten en un daño hepatobiliar en el que la formación, secreción o el flujo de bilis están alterados por diferentes causas (Trivedi P. J. et al., 2016). Independientemente del agente causante, la enfermedad colestásica cursa con aparición de ictericia. La incidencia de colestasis neonatal se estima entre 1/2.500 y 1/5.000 recién nacidos (De la Vega A. & Remacha F. E., 2015). De forma general, la causa más frecuente en niños con patología neonatal sería la inmadurez hepática asociada a diferentes causas como: prematuridad, cardiopatía, infección, cirugía, nutrición parenteral, toxicidad farmacológica, etc. En el recién nacido o lactante sin patología neonatal, las causas más frecuentes son, en primer lugar, la atresia biliar extrahepática y, en segundo lugar, el déficit de alfa-1-antitripsina, seguidas del síndrome de Alagille y de la colestasis intrahepática familiar progresiva (CIFP) (Vitale G., 2019). La incidencia de enfermedad colestásica en el paciente adulto se encuentra cercana a 1/100.000 pacientes, generalmente asociada a una patología de base (Gómez Aldana A. J. et al., 2020).

La colestasis puede dividirse en intra y extrahepática. En la colestasis intrahepática existe una alteración en el flujo de bilis debido a causas que afectan directamente a las células que componen el hígado, mientras que en la extrahepática existe una obstrucción mecánica que generalmente afecta al colédoco o al conducto hepático común (es decir, afectan directamente a la anatomía del árbol biliar). Entre las causas de colestasis cabe destacar las infecciones (virus de la hepatitis B, C, infecciones bacterianas o fúngicas), fenómenos autoinmunitarios, consumo excesivo de alcohol, tóxicos, fibrosis quística, daño vascular, isquemia, amiloidosis, obstrucción de las vías biliares tras procesos quirúrgicos, masa tumoral u otras causas (Yokoda R. T. & Rodriguez E. A., 2020).

El estancamiento en el flujo de la bilis produce daño principalmente por la presencia de los ácidos biliares que actúan como detergente, disolviendo y desorganizando membranas lipídicas celulares. También producen toxicidad celular directa sobre los hepatocitos aumentando la secreción de citoquinas y moléculas de adhesión, desencadenando una respuesta inflamatoria junto con una disfunción de la actividad mitocondrial (Li M., 2017). Si el daño se mantiene en el tiempo, se activa una respuesta celular principalmente mediada por colangiocitos, hepatocitos y células inmunitarias, en la que se liberan mediadores inflamatorios y quimioatrayentes con el fin de resolver el daño. Señales autocrinas y paracrinas disparan una serie de respuestas que incluyen principalmente la regeneración tisular promoviendo la proliferación y reduciendo la apoptosis y senescencia. Sin embargo, la persistencia del daño tisular puede derivar en fenómenos de fibrosis, ductopenia, estrés oxidativo y cirrosis, que en algunos casos conducirá a procesos de malignificación con aparición de colangiocarcinoma (Yokoda R. T. & Rodriguez E. A., 2020).



Dentro de las enfermedades colestásicas, la Colangitis Esclerosante Primaria (CEP), la Colangitis Biliar Primaria (CBP) y la CIFP son consideradas enfermedades raras, cuyas causas son solo parcialmente conocidas. La CEP es una entidad que predomina en los hombres (en una relación 2:1) respecto a las mujeres y con una edad media de aparición de, aproximadamente, 40 años. Afecta a los conductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos, generando una lesión que puede conducir a fibrosis y cirrosis (Williamson K. D. & Chapman R. W., 2014). El diagnóstico de esta enfermedad involucra una combinación de criterios por imagen que pueden mostrar estenosis localizadas a lo largo de todo el árbol biliar, las cuales son identificables mediante una colangiografía o una colangiopancreatografía retrógrada endoscópica. La CEP se presenta como una enfermedad multifactorial con predisposición genética, sin embargo, recientemente, se han descrito factores que intervienen en la fisiopatología de la CEP tales como la respuesta inmunitaria frente a antígenos propios, la permeabilidad selectiva de la mucosa intestinal y la propia dieta del individuo (Morgan M. A. et al., 2023).

LA CBP es una de las causas más frecuentes de colestasis de origen autoinmune y genera una inflamación granulomatosa linfocítica que involucra a los conductos biliares de pequeño calibre (Patel A. & Seetharam A., 2016). Por lo general, la CBP se presenta en mujeres (relación 9:1 frente a hombres) entre los 40 y 60 años de edad, con marcadores diagnósticos como la presencia de anticuerpos antimitocondriales (*Anti-mitochondrial antibodies*, AMA) dirigidos contra la subunidad E2 de la piruvato deshidrogenasa. Su diagnóstico se realiza cuando se dan 2 de 3 criterios: la presencia de colestasis con elevación de la fosfatasa alcalina, los AMA positivos y la evidencia histopatológica de colangitis no supurativa con destrucción de los conductos biliares interlobulares de mediano y pequeño calibre (Trivella J., 2023). La CIFP puede clasificarse en tres subgrupos. Los tipos CIFP1 y CIFP2 están causados por una secreción alterada de ácidos biliares debida, respectivamente, a mutaciones en el gen *Atp8b1*, que codifica para la proteína FIC1 (*Familial Intrahepatic Cholestasis 1 protein*), y en el gen *Abcb11* que codifica para la proteína BSEP. Los defectos en el gen *Abcb4*, que codifica para la proteína MDR3, dificulta la secreción biliar de fosfolípidos, y es la causa del tipo CIFP3 (Vitale G. et al., 2022).

Independientemente de su causa, debido al desarrollo silencioso de la enfermedad, los pacientes que sufren colestasis suelen permanecer sin diagnosticar hasta sus fases finales, en las que la única opción terapéutica es el uso de medicamentos para contrarrestar las consecuencias y manifestaciones clínicas de la colestasis crónica. Asimismo, está recomendado el uso de UDCA, sin embargo, este tratamiento no es efectivo en todos los pacientes, de tal modo que el trasplante hepático sería la única opción terapéutica curativa, con las limitaciones y el coste que esto conlleva (Patel V. S. et al., 2024). Queda así patente que tanto CEP como CBP son enfermedades raras, que carecen de tratamiento efectivo. Esto se explica, en parte, por la falta de información sobre los mecanismos moleculares que están implicados en estas enfermedades. En los últimos años se han desarrollado alternativas para el tratamiento de la CBP como el ácido obeticólico (OCA), actualmente empleado como fármaco de segunda línea aprobado por las agencias reguladoras cuando fracasa el tratamiento con UDCA. Recientemente, se ha comercializado el fármaco Odevixibat, un inhibidor reversible, potente y selectivo del transportador ileal de ácidos biliares (IBAT, por sus siglas en

inglés, *Ileal bile acid transporter*) para el tratamiento de la CIFP. Este fármaco permite reducir la recirculación enterohepática de ácidos biliares permitiendo un menor daño derivado de la toxicidad y la colangiopatía causada por la acumulación de ácidos biliares en el hígado (Bedoyan S. M. et al., 2022).

4. Regeneración hepática.

El hígado tiene una gran capacidad de regeneración en respuesta a un daño. En condiciones basales, en ausencia de estímulos externos, los hepatocitos permanecen en estado “quiescente” en la fase G0 del ciclo celular, pero a diferencia de otros tejidos, mantienen la capacidad de reiniciar el ciclo celular ante cualquier lesión, pérdida de tejido hepático o frente a estímulos exógenos (factores de crecimiento o mitógenos) (Chauhan A. et al., 2011).

El proceso de regeneración hepática (RH) es un fenómeno presente en todos los vertebrados, del que se han descrito mecanismos comunes: participación del sistema inmunitario innato, remodelación tisular y regulación estricta del volumen hepático (Michalopoulos G. K. & Bhushan B., 2021). La respuesta regenerativa aguda es una respuesta controlada, suele iniciarse con la proliferación de hepatocitos, seguido de las secuencias replicativas de las células mesenquimales, la morfogénesis y el control del volumen a término de la regeneración. Dicho proceso se describe tras una hepatectomía parcial en ratones, modelo ampliamente empleado para el estudio de RH tras una pérdida de masa hepática (Yagi S., 2020). Se trata de un proceso bastante rápido que se inicia en segundos tras la aparición del daño y termina en pocos días, dependiendo de la edad del individuo, estado basal del tejido y de la especie, con la restauración del volumen hepático.

La respuesta proliferativa celular activada se ha descrito con detalle, se sucede en un orden secuencial; en primer lugar se dividen los hepatocitos y colangiocitos, posteriormente las células de Kupffer y las células endoteliales, seguido de la neoformación de vasos y de los canalículos biliares, hasta reproducir la estructura hepática. Ante un daño hepático causado por colestasis, los hepatocitos serán también las primeras células encargadas de activar respuestas y la transcripción de genes de proliferación y supervivencia para hacer frente al daño (Yokoyama Y., Nagino M. & Nimura Y., 2007), aunque los colangiocitos son también claves en este contexto (Salas Silva S. et al., 2020) con el fin de alcanzar nuevamente la homeostasis hepática (**Figura 5**).

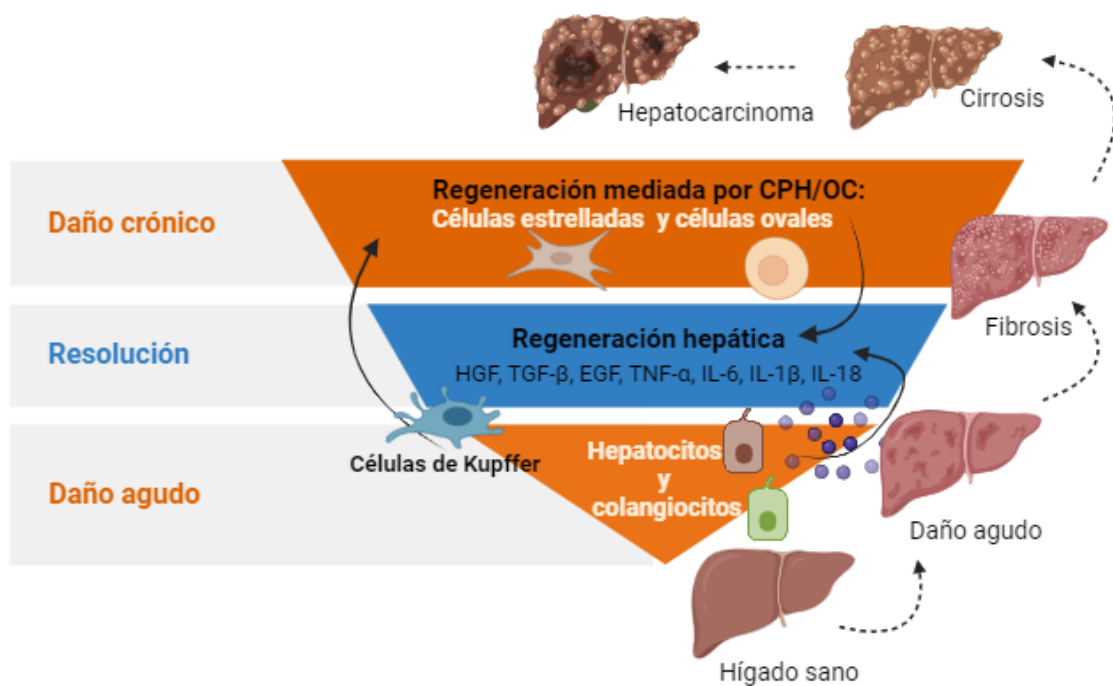



Figura 5. Tipos celulares implicados en la RH. Representación esquemática de las poblaciones celulares implicadas en la RH durante un daño hepático agudo y crónico. Adaptado de: Huang R. et al., 2022. Creado con: BioRender.com.

Numerosos estudios, a lo largo de los años, han permitido caracterizar en detalle el proceso de RH. La RH está finamente controlada, y comparte vías de señalización y programas transcripcionales con los procesos de embriogénesis y de cicatrización tisular, aunque sean procesos de naturaleza distinta (Qian Y. et al., 2022). Intervienen mecanismos de señalización autocrinos, paracrinos y endocrinos; genes responsables de proliferación celular, morfogénesis y reguladores del metabolismo. Se sabe que, durante el proceso de RH, los diversos tipos celulares implicados liberan factores y señales paracrinas a los hepatocitos con el fin de activar su capacidad proliferativa para restaurar la funcionalidad del hígado (Preziosi M. E. & Monga S. P., 2017). Por otro lado, en los últimos años se han identificado las vías de señalización y transcripción asociadas a la RH, muchas de ellas relacionadas con la respuesta fisiológica del hígado al daño celular, donde la vía de HGF (*Hepatocyte Growth Factor*, factor de crecimiento de hepatocitos) y su receptor Met desarrolla un papel crucial (Huh C.G., 2004; Zhao Y., 2022), como se comentará más adelante.

Así, la RH puede dividirse de forma general en tres fases (iniciación, progresión y finalización), donde participarán distintos factores como por ejemplo IL-6 (*Interleukin 6*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), Hippo, HGF y TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*). Las células de Kupffer, y otros tipos celulares, son capaces de secretar los factores anteriormente mencionados para activar las diferentes vías en los hepatocitos. IL-6, TNF- α y HGF son necesarios para la fase de inicio de la RH promoviendo el paso de la fase G0 a la fase G1 del ciclo celular y la inducción de la expresión de genes como *c-Fos*, *c-Myc* y *c-Jun*, activando vías como la mediada por STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), todo ello influyendo sobre el proceso de mitosis a los hepatocitos. Los factores de crecimiento, como HGF y EGF (*Epidermal Growth Factor*),



tienen un importante papel en el inicio y la progresión de la RH, otros, como TGF- β y BMPs (*Bone Morphogenetic Protein*), permiten el control y la regulación de la fase final de la RH (Liu Q. et al., 2024).

El desarrollo de modelos animales modificados genéticamente, entre otros, ha sido clave para poder demostrar la importancia de algunas de estas vías, como es el caso de la vía de HGF/Met. Usando el modelo murino clásico de regeneración hepática tras hepatectomía parcial, se ha demostrado que la ausencia de Met reduce la respuesta regenerativa (Borowiak M. et al., 2004; Huh C. G. et al., 2004), de hecho, en ausencia de Met los hepatocitos presentan una mayor sensibilidad a la muerte por apoptosis mediada por Fas, junto con una mayor predisposición a la necrosis hemorrágica. Cuando estos ratones deficientes en Met son sometidos a una dosis necrotizante de CCl₄, presentan una menor proliferación de hepatocitos, una inflamación persistente, y una producción aumentada de osteopontina, presentando un déficit marcado en la remodelación tisular (Huh C. G. et al., 2004). La eliminación del ligando, HGF, en lugar del receptor Met, en hígado, tiene un efecto similar (Nejak-Bowen K. et al., 2023). Por el contrario, la sobreexpresión de Met en modelos murinos transgénicos implica una regeneración mediada por hepatocitos incrementada, con mayor proliferación y más eficiente recuperación del volumen hepático (Shiota, G., 1994). En numerosos modelos murinos, HGF ha demostrado su capacidad promotora de la supervivencia celular, regeneración de tejido hepático y su actividad supresora de inflamación crónica (Nakamura T. et al., 2011). Además, en un meta-análisis de datos de la literatura se ha evaluado el uso de HGF recombinante humano como estrategia terapéutica para frenar el desarrollo de fallo hepático en pacientes, concluyendo que el HGF induce la proliferación de hepatocitos y evita la pérdida de volumen celular, contribuyendo así a una menor mortalidad en los pacientes afectados (Hoffmann K. et al., 2020).

A pesar de que la proliferación de las células maduras hepáticas es el principal mecanismo de compensación en la RH tanto en un daño hepático agudo como crónico (Huang R. et al., 2022), cuando el daño persiste de forma crónica, se sobrepasa la capacidad regenerativa de éstas. El recambio celular sostenido y la respuesta regenerativa continua provocan que los hepatocitos terminen exhaustos, y en esta situación se puede dar la activación de células progenitoras hepáticas (CPH). Estas células, también conocidas en modelos murinos como células ovals (de sus siglas en inglés: *oval cells*, OC) por la forma ovalada de su núcleo, actuarían como segunda línea de defensa en respuesta a un daño, independientemente de su origen (Clouston A. D., et al., 2005; Lu W. Y. et al., 2015). La proliferación y diferenciación de CPH/OC a hepatocitos o colangiocitos; va acompañada de una reacción inflamatoria crónica, por reclutamiento y activación de células del sistema inmunitario endógenas y exógenas, con la liberación de mediadores pro y anti-inflamatorios que intentan restablecer la homeostasis tisular frente a un daño crónico (Hora S. & Wuestefeld T., 2023). Sin embargo, esta RH crónica es ineficiente y fallida, y generalmente deriva en la aparición de fibrosis, por activación de las células estrelladas que se convierten en miofibroblastos, principales células productoras de matriz extracelular. La fibrosis puede progresar a cirrosis y en algunos casos al desarrollo de cáncer hepático (Huang R. et al., 2022). Como se ha mencionado anteriormente, en la **Figura 5**, se muestran los tipos celulares predominantes implicados en la RH durante un daño agudo o crónico.

5. Células progenitoras hepáticas.

El hígado reacciona ante un daño crónico con un amplio espectro de respuestas que incluyen inflamación, regeneración de hepatocitos, fibrosis y reacción ductular. Esta última hace referencia a la aparición de estructuras proliferativas ductulares que invaden las regiones periportales y el parénquima. Esta reacción se observa frecuentemente en las ECH, incluyendo la enfermedad alcohólica hepática, y las enfermedades colestásicas, como CEP y CBP, y se considera que juega un papel importante en la regulación de la respuesta regenerativa (Sato K. et al., 2019). Las CPH/OC son, junto con los colangiocitos, los principales elementos de la reacción ductular, y por ello, se piensa que pueden tener un papel clave en el desarrollo y la evolución de la enfermedad colestásica crónica. Los hepatocitos, las células estrelladas y las células de Kupffer también están involucradas en el desarrollo de la reacción ductular, contribuyendo a la aparición de hiperplasia en los ductos biliares. De hecho, la reacción ductular también se ha asociado a fenómenos de transdiferenciación de hepatocitos a colangiocitos. Sin embargo, la reacción ductular inicialmente presentada como un mecanismo de regeneración tisular del hígado, puede derivar en inflamación crónica y desarrollo de fibrosis (Mavila N., 2024).

Las CPH/OC conforman una población heterogénea de células en diferentes estadios de diferenciación, caracterizadas por cambios fenotípicos dinámicos durante su expansión. Las CPH/OC tienen capacidad bipotencial, siendo capaces de diferenciarse a hepatocitos o colangiocitos dependiendo del ambiente externo al que estén expuestas (Duncan A. W. et al., 2009). Su origen es aún controvertido en la actualidad, aunque la mayoría de los autores defienden que proceden de células madre quiescentes localizadas en el Canal de Hering (Fausto N. & Campbell J.S., 2003), aunque en estudios recientes postulan que células hepáticas como los hepatocitos, colangiocitos o miofibroblastos pueden ser inducidas a un estado similar a una célula progenitora a través de transiciones que se producen en algunas circunstancias concretas (Chen J. et al, 2017).

Las CPH/OC han demostrado su capacidad proliferativa en un contexto de daño hepático crónico, tanto en ratones como en humanos, aunque parece que tienen una menor eficiencia de implantación y de repoblación que los hepatocitos maduros (Cantz T. et al., 2008). Sin embargo, el papel de las CPH/OC durante la regeneración hepática es actualmente objeto de debate. Por un lado, está aceptado que estas células participan en el remplazo de hepatocitos y colangiocitos cuando la regeneración fisiológica se agota y falla; por otro lado, existen estudios que demuestran que las CPH/OC apenas contribuyen a restaurar el contenido celular del hígado. Es más, se ha propuesto una asociación directa entre la expansión de las CPH/OC y la progresión de la fibrosis hepática (Clouston A. D. et al., 2005; Kuramitsu K. et al., 2013). También se ha descrito que estas células pueden actuar como células iniciadoras de un proceso de hepatocarcinogénesis (Köhn Gaone J. et al., 2016), aunque algunos trabajos apoyan que el carcinoma hepatocelular deriva principalmente de hepatocitos y no de CPH/OC, y éstas serían las responsables de otros tipos de tumores hepáticos, como el colangiocarcinoma hepatocelular combinado (Holczbauer Á. et al., 2021). Todas estas evidencias apoyan la teoría de que las CPH/OC desarrollan una respuesta que es

altamente contexto-dependiente existiendo un número de factores de crecimiento que ayudan a mantener las propiedades de las CPH/OC y contribuyen a mantener un balance entre activación, proliferación y diferenciación de estas células.

Según la teoría clásica, tras la activación de sus precursores, se produce la expansión de CPH/OC, las cuales proliferan, migran al parénquima hepático y finalmente se diferencian a hepatocitos y/o colangiocitos en función de los mediadores y señales presentes en el microambiente, también denominado nicho. Con todo esto, la respuesta de las CPH/OC puede dividirse en cuatro etapas: activación, proliferación, migración y diferenciación (Miyajima A. et al., 2014). El microambiente participa en la evolución de las diferentes fases mediante la presencia de determinados tipos celulares, componentes de la matriz extracelular, factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas con actividad biológica (Chen J. et al., 2017).

Entre los factores de crecimiento implicados en esta modulación caben destacar factores de crecimiento, como el HGF, el TGF- β , el EGF, el factor de crecimiento transformante-alfa (*Transforming Growth Factor α* , TGF- α) o el factor de crecimiento del tejido conectivo (*Connective Tissue Growth Factor*, CTGF), la proteína morfogenética ósea-9 (*Bone Morphogenetic Protein 9*, BMP9), entre otros; citoquinas como IL-6, TNF- α , interferón gamma (IFN- γ) o el inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK); hormonas como la somatostatina o la insulina; adipoquinas como la leptina; quimioquinas como el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1) o neurotransmisores como la serotonina, la epinefrina o la norepinefrina (Kaur S. et al., 2015; Lukacs-Kornek V. & Lammert F., 2017; Addante A. et al., 2018). Por último, los morfógenos (factores que desempeñan un papel fundamental durante el desarrollo embrionario) como Wnt, Notch y Hedgehog, son reguladores clave de la respuesta de las CPH/OC tal y como han puesto de manifiesto estudios *in vivo* e *in vitro* (Behari J., 2010; Darwiche H. et al., 2011; Chen J. et al., 2017) (Figura 6).

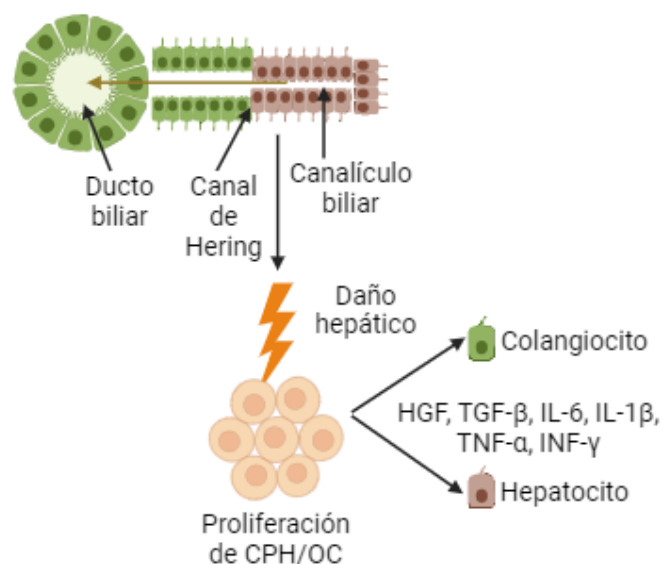


Figura 6. Activación y diferenciación de las CPH/OC. Esquema representativo de la activación y diferenciación de CPH/OC en hepatocitos y colangiocitos en el microambiente presente en un daño hepático, proceso regulado por factores de crecimiento, mediadores inflamatorios y citoquinas, presentes en el microambiente. Adaptado de: Tanaka M. et al., 2011. Creado con: BioRender.com.

Muchos modelos experimentales se han utilizado para el estudio de la expansión de las CPH/OC, uno de los más empleados es la administración de 0,1% de 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) en la dieta habitual de los modelos de ratón. El DDC es una hepatotoxina porfirinogénica (Preisegger K.H. et al., 1999), actúa como inhibidor de la enzima mitocondrial ferroquelatasa promoviendo así la acumulación de protoporfirinógeno. Este compuesto se acumula en el citoplasma de células hepáticas y es eliminado principalmente mediante excreción biliar debido a sus características hidrofóbicas. Durante la secreción biliar del compuesto, se produce la precipitación y la formación de cristales en el canalículo biliar produciendo finalmente obstrucción del árbol biliar y como consecuencia, la instauración de colestasis. En el tejido dañado se genera una reacción ductular, pericolangitis y fibrosis periportal similar a la enfermedad de CEP humana (Delire B. et al., 2015).

6. Vía de HGF/Met.

Dentro de los diversos factores y mediadores químicos que regulan la fisiología hepática, en particular la regeneración hepática, y la biología y función de los hepatocitos y las CPH/OC, está el HGF, ligando del receptor tirosina quinasa Met. El papel crítico de la vía de HGF/Met en la regulación de la biología de las células hepáticas y en el control de la regeneración hacen de esta vía un interesante objeto de estudio (Zhao Y., 2022). Entre las funciones del HGF en el hígado, cabe destacar su actividad como mitógeno inductor de proliferación; de hecho, el HGF fue descubierto como un fuerte mitógeno de hepatocitos (Miyazawa K. et al., 1989; Nakamura T. 1989). Además, promueve supervivencia celular, aumenta la capacidad de migración e invasión celular y es un importante modulador de la morfogénesis (Gohda E. et al, 2002).

El HGF, en humanos, está codificado por el gen localizado en el brazo largo del cromosoma 7, locus 7q21.1, es sintetizado por células mesenquimales y se almacena en su forma precursora o pro-HGF, en la matriz extracelular. Esta forma precursora consta de 728 residuos de aminoácidos, incluyendo la secuencia señal y el péptido que contienen las subunidades α y β (Naldini L., 1992; Nakamura T. & Mizuno S., 2010). Es una glicoproteína similar a los factores de coagulación y de fibrinólisis como el plasminógeno. La activación del pro-HGF se debe al efecto proteolítico del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (*uroquinase-type Plasminogen activator*, uPA) (Nakamura T., 1989).

Tras una lesión hepática aguda se produce un aumento brusco (10 a 20 veces) del HGF plasmático. Dicha elevación se debe a la liberación del HGF almacenado en la matriz extracelular y a la síntesis de *novo* por los macrófagos estimulados por la IL-6 y el TNF- α , las células estrelladas hepáticas y las células endoteliales sinusoidales (Cienfuegos J. A. et al., 2014; Zhang C. et al, 2024).

El HGF maduro es un heterodímero de 697 residuos de aminoácidos, cuyas subunidades α y β están unidas por un puente disulfuro. La cadena α está formada por 463 residuos de aminoácidos, contiene cuatro dominios tipo *Kringle* (K1-K4) y un bucle

de tipo hairpin (*hairpin loop*). La cadena β está formada por 234 residuos de aminoácidos (**Figura 7**).



Figura 7. Estructura del HGF. HGF es un heterodímero formado por una cadena α y β . Tiene seis dominios: dominio amino terminal tipo hairpin loop (HL), cuatro dominios tipo Kringle (K1-K4) y un dominio de homología tipo proteasa de serina (SPH, serine protease homology). Adaptado de: Nakamura T., 1989. Creado con: BioRender.com.

El HGF actúa a través de su receptor MET, producto del protooncogén c-Met, que en humanos está localizado en el locus 7q31 del cromosoma 7, y que da lugar a un polipéptido de 150 kDa que después de su glicosilación y procesamiento proteolítico, genera el receptor heterodimérico maduro formado por las subunidades α - β , expresado fundamentalmente en células epiteliales. La cadena α extracelular queda unida por un puente disulfuro a una cadena transmembrana β de 140 kDa, la cual contiene múltiples sitios de regulación por fosforilación (**Figura 8**). La región extracelular del receptor contiene un dominio SEMA (*Semaphorin domain*), un dominio PSI (*plexin-semaphorin-integrin domain*) y cuatro dominios tipo IPT (*immunoglobulin-like domain shared by plexins and transcriptional factors*).

Tras la unión del ligando, dos moléculas del receptor dimerizan, y se produce la autofosforilación de las tirosinas 1230, 1234 y 1235 localizadas dentro del bucle de activación del dominio catalítico con actividad tirosina quinasa. Esto conduce a la activación de las cascadas de señalización asociadas a este receptor: la cascada de las quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas, ERK/MAPK) que, a su vez, estimulan factores de transcripción citosólicos (como AP-1) relacionados con proliferación y supervivencia celular. Además, el HGF señala a través de los factores de transcripción STAT3, NF- κ B y la β -catenina. La unión del HGF con su receptor, resulta en fosforilación la β -catenina, lo que facilita su traslocación al núcleo y regula la expresión de ciclina D necesaria para la transición G0-G1 del ciclo celular para continuar con el proceso de mitosis (Cienfuegos J. A. et al., 2014).

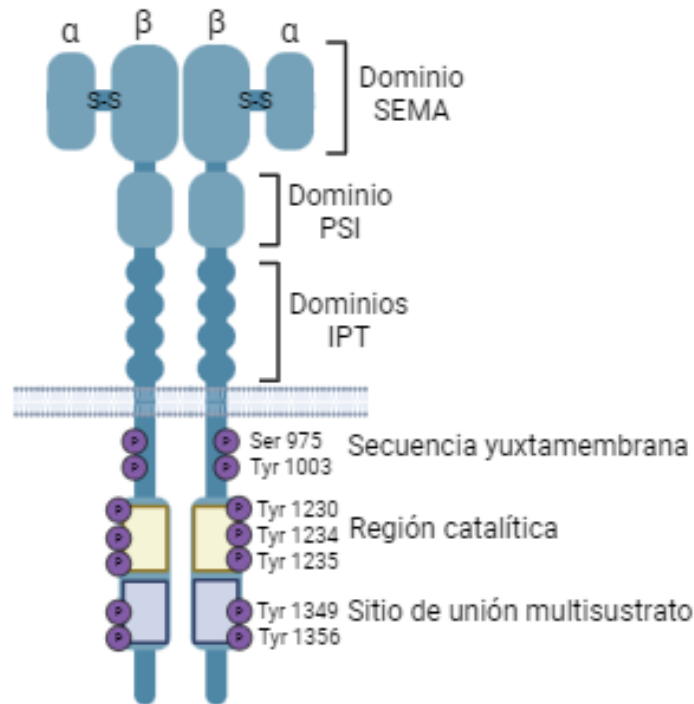


Figura 8. Estructura de Met. Receptor heterodimérico formado por una cadena α extracelular y una cadena β transmembrana, unidas por un puente disulfuro. La región extracelular está compuesta por tres regiones: dominio SEMA, dominio PSI y dominios IPT. En la región intracelular, se muestran los principales sitios de autofosforilación tras la unión a su ligando HGF. Las tirosinas 1230, 1234, 1235 se localizan en el dominio catalítico. Las tirosinas 1349 y 1356 se localizan en el sitio de unión multisustrato. En el dominio yuxtamembrana se localiza la serina 975 y la tirosina 1003 que al ser fosforiladas conducen a la degradación del receptor. Adaptado de: (Trusolino L. et al., 2010). Creado con: BioRender.com.

Adicionalmente, la fosforilación de los residuos 1349 y 1356 generan un sitio de anclaje para el reclutamiento de proteínas adaptadoras de la transducción de señales (**Figura 9**). Particularmente la fosforilación en la tirosina 1313 genera un sitio de unión por la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) activando esta cascada, mientras en el sitio de unión multisustrato, la fosforilación de las tirosinas 1349, y 1356 conduce al acoplamiento de proteínas como SHC (*Src homology 2 domain-containing transforming protein*), SRC (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*), GAB1 (*GRB2 associated binding protein 1*), GRB2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*), SHP2 (*Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase-2*), o la activación de proteínas como fosfolipasa C- γ (PLC- γ) o FAK (*Focal Adhesion Kinase*), entre otros (Bertotti A. & Comoglio P. M., 2003). También activa rutas como las gobernadas por PKC (*Protein Kinase C*) que conducen a la regulación y activación de factores como Nrf2 que inducen la expresión de enzimas antioxidantes y regulan el metabolismo del glutatión, estimulando la supervivencia celular y la reparación del tejido dañado.

Por otro lado, es interesante comentar que los niveles de expresión de Met en la superficie celular están finamente regulados por otros eventos, como, por ejemplo, el desprendimiento extracelular, la escisión intracelular y la degradación mediada por ubiquitina. Todos estos procesos regulan la fuerza de la activación de Met y la consiguiente robustez de las señales dependientes de esta vía (Trusolino L. et al., 2010).

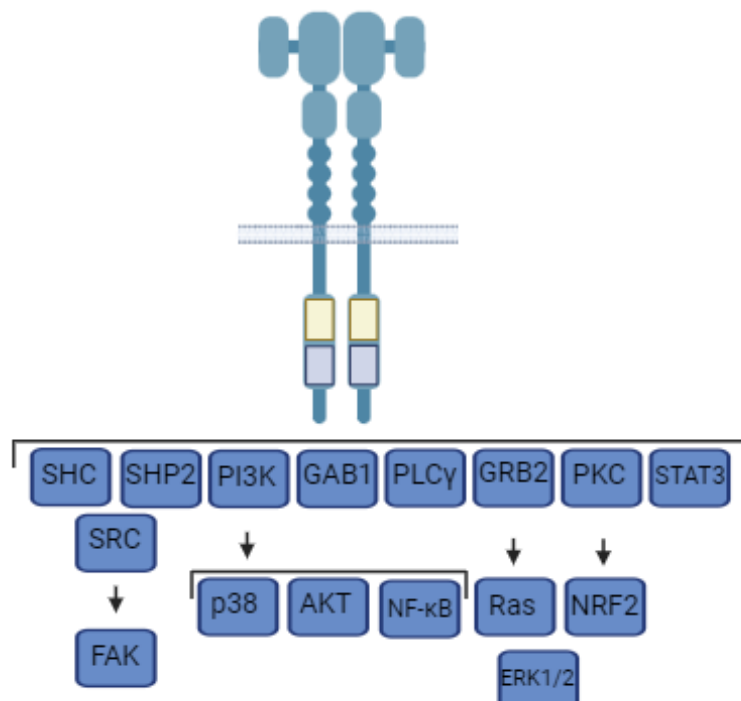


Figura 9. Vías de señalización disparadas por HGF/Met. Receptor Met heterodimérico dimerizado tras la unión de HGF. La fosforilación de residuos específicos de Tyr conducen al reclutamiento de efectores y proteínas adaptadoras para la iniciación de las diferentes vías de señalización asociadas, incluyendo ERK/MAPK, PI3K, p38, NF-κB, STAT3, PLC-γ, FAK y PKC. Adaptado de: Trusolino L. et al., 2010; Huh C.G., 2004. Creado con: BioRender.com.

El HGF cumple diversas funciones en la fisiología hepática principalmente manteniendo el control del volumen celular hepático. Como se ha mencionado anteriormente en el apartado 3, el HGF está implicado en la RH. Ante una lesión hepática, independientemente de su naturaleza, aumentan los niveles de HGF tanto en el endotelio hepático (secretado principalmente por células de Kupffer y células estrelladas) como en plasma (Maher J. J., 1993). En la etapa inicial de la RH, el HGF promueve la proliferación de los diferentes tipos celulares implicados, principalmente hepatocitos, potenciando el crecimiento y supervivencia mediante la activación de vías como PI3K/AKT, STAT3 y Ras/Raf. Además, el HGF interacciona con TGF- α para estimular la síntesis de ADN en hepatocitos y promover la progresión del ciclo celular. En modelos de ratón, la vía de HGF puede ser activada mediante el UDCA y PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) promoviendo la proliferación de hepatocitos, contribuyendo a la RH (Dong X., 2019). Además, se ha demostrado que la inhibición de la liberación de CCL5 (*C-C Motif Chemokine Ligand 5*) promueve la liberación de HGF por parte de macrófagos (de una forma dependiente de FoxO3a) estableciendo el inicio de la RH (Huang M. et al., 2022).

Por todo lo anteriormente mencionado, la vía de HGF/Met presenta un papel crucial en la RH, modulando la proliferación celular y la supervivencia de los hepatocitos (Mao S. A., 2014; Hoffmann K. et al., 2020).

Como se comentaba previamente (apartado 3 de esta memoria), el desarrollo de distintos modelos *knockout* de Met o HGF ha permitido demostrar de forma clara el papel esencial de esta vía en RH. Es interesante destacar que este papel esencial no solo se manifiesta en la regeneración mediada por hepatocitos, sino también en la mediada por

CPH/OC, siendo asimismo en este contexto una de las principales respuestas frente al daño (Ishikawa T., 2012). En lo referente al papel específico que ejerce esta vía en la regulación de las CPH/OC, estudios realizados en nuestro laboratorio han evidenciado su actividad mitogénica y antiapoptótica que protege del estrés oxidativo y/o la muerte celular inducida por TGF- β o BMP9 en estas células (del Castillo G. et al, 2008; Martínez Palacián A. et al, 2013; Addante A. et al., 2022). Además, aumenta su capacidad migratoria e invasiva (Suárez Causado A. et al., 2015), y detiene la senescencia inducida por tratamiento prolongado con TGF- β , permitiendo la expansión celular tras la transición epitelio mesénquima (*Epithelial to Mesenchymal Transition*, EMT) inducida por TGF- β , y favoreciendo el potencial regenerativo de las mismas (Almalé L. et al, 2019).

A pesar de que el HGF es principalmente conocido por su función proregenerativa, los modelos *knockout* de Met o HGF también demostraron su papel esencial durante el desarrollo embrionario (Uehara Y. et al., 1995). Además, la participación de este factor en la transición epitelio-mesénquima de diversos tipos celulares ha llevado al estudio de su implicación en el desarrollo, progresión y metástasis de diferentes tumores, incluyendo el carcinoma hepatocelular (de sus siglas en inglés, HCC). De hecho, su capacidad de inducción de proliferación, migración, invasión celular y metástasis lo ha convertido en un foco de interés como candidato central en el avance del HCC. Incluso, tanto el HGF como la expresión de Met, se han propuesto como marcadores pronóstico de tumores hepáticos y se han relacionado con diversas resistencias a fármacos antitumorales (Wang H. et al., 2020). No obstante, conviene señalar que los estudios sobre el efecto de la inactivación o sobreexpresión de HGF o Met sobre la hepatocarcinogénesis han revelado resultados discordantes que otorgan tanto un papel protumoral como antitumoral (Giordano S. & Columbano A., 2014), y las razones para esta discrepancia aún no están claras. A pesar de ello, y de los datos clínicos poco prometedores con los inhibidores de la vía, esta vía sigue siendo considerada una diana interesante en HCC. Las principales funciones de HGF en células hepáticas quedan resumidas en la **Figura 10**.

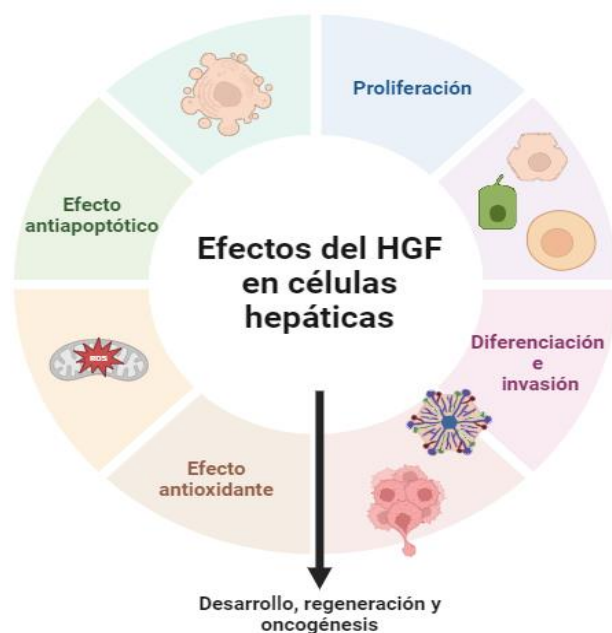


Figura 10. Principales funciones de HGF en células hepáticas. Esquema representativo de las principales funciones de HGF en células hepáticas. Creado con: BioRender.com.

7. Vía de TGF- β .

El TGF- β es una citoquina multifuncional presente en prácticamente todas las células y tejidos. Pertenece a una superfamilia que en el genoma de los mamíferos contiene 33 miembros diferentes conocidos donde se incluyen isoformas del TGF- β (TGF- β 1 es la mayoritaria, TGF- β 2 y TGF- β 3, las cuales son codificadas por genes ubicados en diferentes cromosomas, 19q13, 1q41 y 14q24), BMPs, activinas, inhibinas y GDFs (*Growth Differentiation Factors*) (Morikawa M. et al., 2016). La señalización del TGF- β dispara en las células una serie de efectos contexto dependientes, entre los que cabe destacar programas de desarrollo, proliferación, diferenciación y control de las propiedades fenotípicas celulares. Los efectos del TGF- β en el hígado, al igual que en otros tejidos, pueden catalogarse de pleiotrópicos dado que puede ejercer una gran variedad de efectos, incluso, efectos opuestos dependiendo del ambiente celular en el que se encuentre (Massagué J., 2012).

Los ligandos de TGF- β son sintetizados como precursores polipeptídicos compuestos por tres segmentos: extremo amino-terminal, segmento precursor (péptido asociado a latencia, *Latency associated Peptide*, LAP) y extremo carboxi-terminal. Para que el TGF- β pueda unirse a su receptor, el segmento precursor debe ser eliminado en el aparato de Golgi, posteriormente activado en la matriz extracelular mediante la acción de integrinas y proteasas como la plasmina o la trombospondina y finalmente se formarán dímeros estabilizados mediante puentes disulfuro (Massague J., 2012). Este dímero se va a unir a sus receptores localizados en la membrana plasmática. Así el TGF- β se une a un complejo heterotetrámero formado por dos receptores tipo I (T β RI) y dos receptores tipo II (T β RII), con actividad serina treonina quinasa. Existe un tercer tipo de receptores, receptores tipo III (β -glicano y endoglina), cuya principal función es actuar como receptores accesorios o co-receptores, presentando el ligando al complejo receptor y favoreciendo la estabilización del heterotetrámero de receptores I y II, aunque avances recientes indican funciones adicionales dependientes e independientes de ligando (Bernabeu C. et al., 2009). Una vez que el ligando se unió a sus receptores, se inicia la transducción de señales a través de las proteínas Smad (acrónimo fusión de: *Caenorhabditis elegans Sma genes and the Drosophila Mad, Mothers Against Decapentaplegic homolog*), que se translocan al núcleo para regular la transcripción de genes diana.

Dos moléculas de TGF- β , formando un homodímero, se unen a sus receptores, el receptor de tipo II (T β RII) fosforila y activa al receptor de tipo I, (T β RI) en una región rica en residuos de serina y treonina (dominio GS) insertada en el dominio con actividad quinasa. Esto provoca un cambio conformacional que permite la activación del receptor. El T β RI recluta y activa a miembros de la familia Smad, concretamente miembros de la subfamilia funcional R-Smad (*receptor-activated Smad*), que son fosforilados en el extremo carboxi-terminal. La R-Smad fosforilada sufre un cambio conformacional que le permite asociarse a otra proteína Smad, que pertenece a la subfamilia Co-Smad (*Common Smad*), Smad 4, y este complejo heterotrimérico (2 R-Smads:1 Co-Smad) se transloca al núcleo, donde uniéndose a diferentes factores de transcripción, co-activadores y co-represores, controlan la transcripción de genes específicos. La tercera clase de Smads son los I-Smad (*Inhibitor Smad*) que participan como

reguladores negativos de esta vía de señalización. En este grupo están las Smads 6 y 7. TGF- β y otros factores son capaces de inducir la expresión de Smad 6 y 7 como mecanismo de retroalimentación negativa (Denissova N. G., 2000). También se puede regular negativamente la señalización mediante otros mecanismos, como la endocitosis del receptor (Kamoto D. et al., 2013) (Figura 11).

Además de la vía canónica descrita, mediada por Smads, existen vías no canónicas disparadas por TGF- β . Estas vías se activan a través de la interacción entre los miembros de la respuesta canónica con otras vías de señalización y/o a través de la capacidad de los receptores de TGF- β para activar otras moléculas de señalización. Entre esas vías no canónicas cabe destacar la activación de MAPK (ERK, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) y p38); la vía mediada por el factor nuclear NF- κ B, JAK/STAT y PI3K/AKT (Heldin C. & Moustakas A., 2016). También aquellas mediadas por GTPasas pequeñas tales como RhoA (*Ras homolog family member A*), RhoB (*Ras homolog family member B*), Rac (*Ras related C3 botulinum toxin substrate*) y CDC42 (*Cell Division Control Protein 42*) implicadas en la reorganización del citoesqueleto, procesos de motilidad y expresión de genes mediante cascadas de señalización independientes de Smad (Tie Y. et al., 2022).

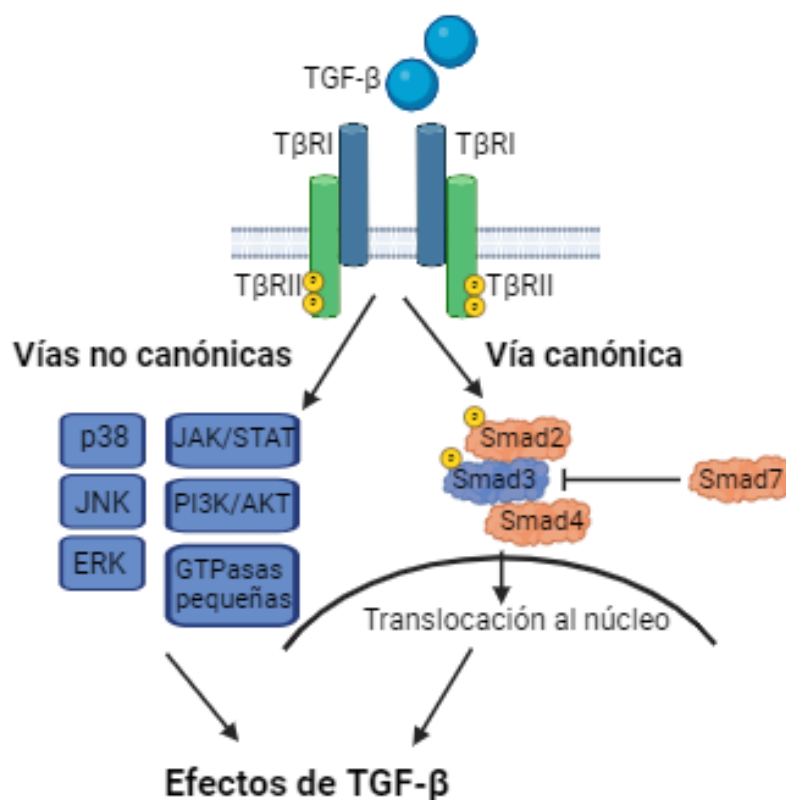



Figura 11. Vías de señalización canónica y no canónicas disparadas por TGF- β .

Representación esquemática de las principales vías disparadas por TGF- β . El dímero de TGF- β se une al complejo formado por el receptor T β RI y T β RII para la activación de la vía canónica mediada por Smad2/3 y Smad4 y las vías no canónicas. Adaptado de Budi E. H. et al, 2017. Creado con: BioRender.com.

Entre las funciones descritas por la acción de TGF- β en células hepáticas parenquimáticas cabe destacar su actividad inhibidora de crecimiento, mediada principalmente por inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (*CDK inhibitors*) (Morikawa et al., 2016). Su actividad proapoptótica depende del tipo celular y el ambiente circundante. Para llevarla a cabo, el TGF- β puede interactuar con rutas de receptores de muerte celular, la vía del ligando Fas (FasL) o la vía mediada por TNF- α . Asimismo, la activación de la vía canónica de TGF- β está relacionada con la expresión de genes diana implicados en muerte celular como TIEG1 (*TGF- β -inducible early response gene 1*) y DAP-quinasa (*Death-Associated Protein kinase*). El TGF- β también podría inducir apoptosis por vía mitocondrial, con la participación del citocromo c, y actuando sobre la expresión, localización y activación de proteínas de la familia BCL-2 (*B-Cell Lymphoma 2*) con actividades pro- y antiapoptóticas (Zhang et al., 2017; Deng Z. et al., 2024). El TGF- β también ha mostrado capacidad de producir radicales libres de oxígeno y estrés celular mediante la inducción de sistemas enzimáticos tipo oxidasas dependientes de NADPH (Nox), y la regulación a la baja de genes implicados en la defensa frente al daño oxidativo, siendo por tanto este estrés oxidativo, responsable de la muerte celular (Sánchez A. et al, 1996; Herrera B. et al., 2001; Espinosa Sotelo R. et al., 2023).

Además, el TGF- β se ha descrito como mediador de la EMT, proceso biológico que permite a una célula epitelial adquirir propiedades y capacidades de una célula mesenquimática. Este proceso implica una reorganización celular interna, con pérdida de la polaridad celular y de las uniones intercelulares, una disminución de la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina y un aumento de marcadores mesenquimales, como la N-cadherina, adquiriendo la célula un fenotipo mesenquimal asociado con un aumento de su capacidad migratoria, e invasiva, y confiriendo resistencia a la apoptosis. Este proceso es la consecuencia de una reprogramación de la expresión génica mediada por factores de transcripción como SNAIL, ZEB y TWIST (Wang R., 2015; Deng Z. et al., 2024; Lamouille S. et al., 2014). De este modo, modulando la EMT, el TGF- β también tiene impacto en el proceso de diferenciación celular de hepatocitos y CPH/OC.

A través de estas actividades, el TGF- β juega papeles clave en diferentes aspectos de la patología hepática, tanto en los procesos de regeneración como en la respuesta al daño. Así, el TGF- β participa en procesos inflamatorios como inmunomodulador, en la angiogénesis y en la activación de fibroblastos durante el desarrollo de fibrosis. Durante el proceso de RH, el TGF- β es capaz de estimular fibroblastos, y células estrelladas hepáticas, para que comiencen a proliferar y producir colágeno, fibronectina, MMPs (*Matrix metalloproteinases*), inhibidores de MMPs tales como TIMP-1 (*Tissue Inhibitor of MMPs- Type 1*), e induce la liberación del inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1, *Plasminogen Activator Inhibitor 1*). Este proceso contribuye al depósito y a la remodelación de la matriz extracelular durante el proceso de RH, siendo clave para la respuesta fibrogénica, a la que contribuyen también induciendo apoptosis en los hepatocitos y con sus efectos inmunomoduladores (Deng Z. et al., 2024; Caja L. et al, 2007; Caja L. et al., 2011). El estudio de los mecanismos moleculares ha revelado asimismo que la inducción de estrés oxidativo, y en particular la inducción de NADPH oxidasas, tanto en hepatocitos como en células estrelladas por TGF- β 1 es esencial para la respuesta profibrogénica (Crosas Molist E. & Fabregat I., 2015).



El TGF- β , junto a otros factores (PDGF, VEGF, HGF, FGF, ácidos biliares, etc) liberados por las células en el microambiente hepático durante el daño crónico, así como los componentes de la matriz extracelular depositada en el hígado, contribuyen también a la regulación de la activación y proliferación de las CPH/OC (Kaur S. et al, 2015; García-Saez J. et al, 2024). El microambiente específico y la compleja red de interacciones celulares y moleculares que se establece en él dictará la eficacia del proceso de regeneración y la amplitud y progresión del proceso fibrótico.

Por último, en este contexto es también importante destacar el papel dual reconocido del TGF- β en el proceso de tumorigénesis, actuando como supresor de tumores en etapas tempranas, sin embargo, en etapas tardías se ha descrito su capacidad promotora e inductora de tumores en diversos tejidos, incluido el hígado, un fenómeno conocido como “la paradoja del TGF- β ” (Buggiano V. et al., 2001, Massagué J., 2008). La capacidad supresora de tumores a nivel hepático mostrada por TGF- β , puede venir explicada por la respuesta citostática y proapoptótica inducida en células epiteliales hepáticas y la modulación de la senescencia en CPH/OC, que contribuyen al control del volumen celular (Matsuzaki, K. et al., 2009; Deng Z. et al., 2024).

La activación temprana de TGF- β induce la parada del ciclo y la muerte celular mediada por la inducción de factores tales como p15, p21, p27, la inhibición de MYC y la regulación de miembros de la familia Bcl-2, entre otros mecanismos. Por el contrario, en tumores hepáticos avanzados, TGF- β muestra un efecto promotor de la invasión y metástasis actuando a través de diversos mecanismos, que incluyen la promoción y mantenimiento de EMT en hepatocitos y CPH/OC, y sus efectos proangiogénicos e inmunoreguladores, específicamente inmunosupresores (Chen J., 2019).

La expresión de genes relacionados con TGF- β durante el desarrollo y avance del HCC puede emplearse en la clasificación y predicción del pronóstico de este. Así, estudios de genómica funcional comparada revelaron dos firmas genéticas (temprana y tardía) específicas de TGF- β , establecidas en líneas de hepatocitos primarios de ratón, que permitían discriminar distintos tipos de HCC. Tumores que expresaban la firma tardía mostraban un fenotipo con mayor capacidad invasiva y mayor recurrencia en la aparición de nuevos focos tumorales (Coulouarn C., 2008).

Además, los niveles circulantes y la expresión del TGF- β en hígado están elevados en pacientes con HCC, habiéndose establecido una correlación entre los niveles de TGF- β y un peor pronóstico (Devan A. R. et al, 2022). En conjunto, los estudios preclínicos y clínicos apoyan que el TGF- β es un buen candidato como diana terapéutica en HCC, lo que ha llevado al desarrollo de ensayos clínicos enfocados a la inhibición del TGF- β , sola o combinada con otros abordajes, para el tratamiento del HCC avanzado (Wege H., 2019; Cuesta A. M. et al., 2023).

La **figura 12** resume los principales efectos del TGF- β en las células hepáticas, implicados en su papel regulador durante el daño hepático, la regeneración, la fibrosis y la hepatocarcinogénesis.

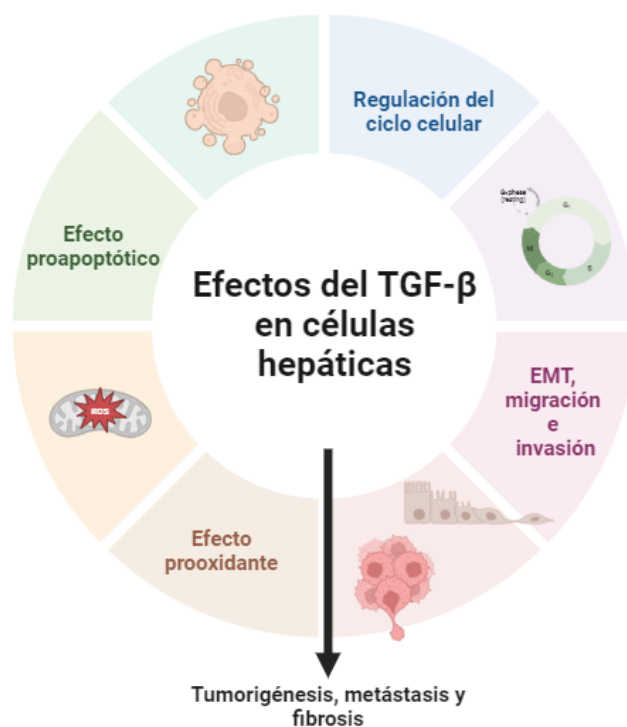


Figura 12. Principales funciones de TGF-β en células hepáticas. Esquema representativo de las principales funciones de TGF-β en células hepáticas. Creado con: BioRender.com.

8. Respuesta antioxidante.

Fisiológicamente cerca del 1-2% del oxígeno molecular es convertido por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, a especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés ROS, *Reactive Oxygen Species*) las cuales incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), oxígeno molecular (O_2) y radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Chen Z. et al., 2020). Con el fin de evitar los efectos perjudiciales de estas moléculas, las células contienen una batería de defensas antioxidantes que comprenden componentes enzimáticos y no enzimáticos. Entre las enzimas antioxidantes, la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GSHPx) y la glutatión reductasa (GR) mantienen la principal actividad de detoxificación. Las SOD1, 2 y 3, localizadas en el citosol, mitocondria y de forma extracelular, respectivamente, conducen la transformación del $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 (Su L. J. et al., 2019).

El H_2O_2 es precursor de especies reactivas más tóxicas como el radical OH^{\bullet} , ya sea a través de la reacción de Fenton, que conlleva la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , o la reacción de Haber-Weiss, en la cual se generan radicales OH^{\bullet} a partir de H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$, ambas reacciones se pueden producir en células vivas de forma lenta, sin embargo, en presencia de cationes divalentes como Fe^{2+} (que actúan como catalizadores) estas reacciones ocurren de forma más rápida (Valko M. et al., 2007). Para compensar este fenómeno, el H_2O_2 y peróxidos orgánicos (R-OOH) generados durante un daño por estrés celular son transformados a productos no tóxicos, (R-OH) y H_2O , mediante la acción de la catalasa o la GSHPx. La GSHPx emplea dos moléculas de glutatión reducido (GSH) para reducir H_2O_2 , generando la forma oxidada de glutatión (GSSG), el

cual puede ser regenerado a GSH por la acción de la GR usando NADPH como donador de electrones (**Figura 13**).

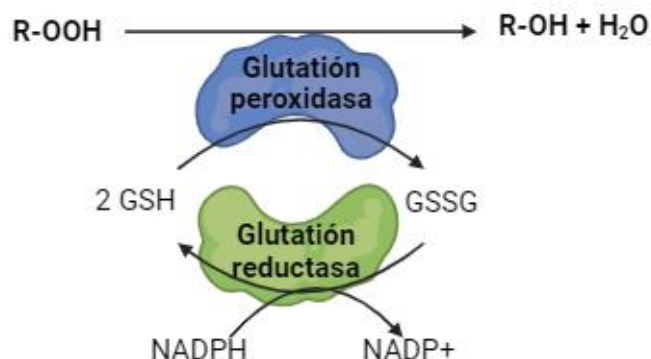


Figura 13. Función antioxidante del glutatión. Representación esquemática de la conversión de peróxidos orgánicos (R-OOH) en intermedios metabólicos (R-OH) y H₂O mediante la acción de la glutatión peroxidasa empleando dos moléculas de GSH. Posteriormente, para mantener el equilibrio redox, la enzima glutatión reductasa convierte el GSSG en GSH oxidando una molécula de NADPH. Adaptado de Couto N., 2016. Creado con: BioRender.com.

El GSH es el principal tiol natural. Es producido en el citosol por la acción de dos enzimas: la γ -glutamil cisteína ligasa (γ -GCL) que cataliza la formación del dipéptido L- γ -glutamil-L-cisteína y por la glutatión sintetasa, la cual convierte este dipéptido en GSH (L- γ -glutamil-L-cisteína-glicina). La habilidad del GSH para hacer frente a los ROS no está restringido a su papel como un cofactor de GSHPx, sino que en sí mismo posee capacidad de secuestrar radicales libres, como sucede con otros antioxidantes no enzimáticos como la vitamina C, la vitamina E y el β -caroteno (Liu K. et al., 2019).

El factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2), es un factor de transcripción que en humanos está codificado por el gen *Nfe2l2*. Ante la presencia de ROS, Nrf2 es liberado de una proteína citosólica acoplada (Keap1) y translocado al núcleo para promover la expresión de enzimas y mediadores antioxidantes mediante la unión al elemento de respuesta antioxidante (*Antioxidant Response Element* "ARE") (Clavijo-Cornejo D. et al, 2013; Fuertes-Agudo, M. et al, 2023) (**Figura 14**). La activación de Nrf2 ante un daño oxidativo supone una respuesta de defensa celular (Zhang Y. et al., 2020; McCord J. M. et al., 2023), de tal forma que Nrf2 unido a los elementos ARE, promueve el aumento de la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo del glutatión, como γ -GCL y GSHPx; y enzimas con capacidad intrínseca antioxidante como SOD, catalasa y hemo-oxigenasa 1 (*Heme Oxygenase Type 1*, HO-1) (Espinosa-Diez C. et al., 2015; Maher J. & Yamamoto M., 2010). Su capacidad de modular la expresión de un gran número de genes ha hecho que se conozca como el "regulador maestro" de la respuesta antioxidante. Es interesante mencionar que Nrf2 puede ser activado por PI3K y diferentes estudios han demostrado que la vía de PI3K/Akt juega un papel clave en la regulación de la respuesta antioxidante dependiente de Nrf2 (Hybertson B. M. et al., 2011; He F. et al., 2020). Se ha demostrado que el pretratamiento de hepatocitos con inhibidores de la vía PI3K sometidos a estrés oxidativo, producido por bajas

concentraciones de hexabromociclododecano, atenúa la expresión de Nrf2 con una menor activación del sistema ARE (Zou W. et al., 2013). También se ha demostrado la relevancia de la interacción entre la vía de PI3K y Nrf2 en la respuesta antioxidante mediada por hemina en la producción de proteínas antioxidantes (HO1, tiorredoxina y peroxirredoxina-I) en células humanas de neuroblastoma (Kazuhiro N. et al., 2003).

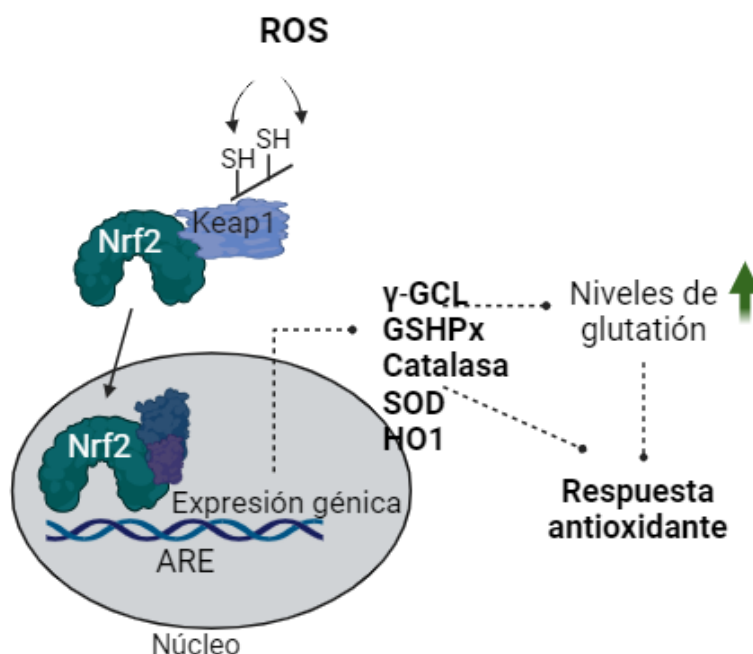



Figura 14. Respuesta antioxidante mediada por Nrf2. Representación esquemática de la vía de activación del elemento de respuesta antioxidante (de sus siglas en inglés ARE) por Nrf2 mediada por la presencia de ROS. La unión de Nrf2 al elemento ARE conlleva la expresión de cientos de genes, entre ellos, genes que codifican para enzimas implicadas en el metabolismo del glutatión y enzimas con actividad antioxidante. Adaptado de Clavijo-Cornejo D. et al, 2013; Orozco-Aguilar J. et al, 2021. Creado con: BioRender.com.

Nrf2 se ha relacionado con la regulación del equilibrio redox, la respuesta inflamatoria y los niveles de ácidos biliares durante la colestasis (He F. et al., 2020). Recientemente, se ha demostrado que los ácidos biliares acumulados en el hígado durante la enfermedad colestásica además de destruir el parénquima hepático, son capaces de inducir respuestas proinflamatorias y activar la producción de ROS (Orozco-Aguilar J. et al, 2021; Perino A. et al, 2021). Al aumentar su concentración en el citoplasma de los hepatocitos, los ácidos biliares inducen la formación de poros en la membrana mitocondrial, favoreciendo la liberación del citocromo C al citosol, que junto con cambios en la regulación de proteínas de la familia Bcl-2, promueve el proceso de apoptosis (Li T. & Apte U., 2015). La destrucción de membranas celulares durante la colestasis por la acción detergente de los ácidos biliares promueve fenómenos de peroxidación y la acumulación de peróxidos en las células afectadas (Sokol R., 1995). Algunos estudios sugieren que la alteración en la funcionalidad mitocondrial y la formación de peróxidos causada por los ácidos biliares son las principales causantes de citotoxicidad en los hepatocitos durante la colestasis. Además, el aumento de ácidos biliares conjugados con taurina son causantes del aumento de la liberación de malondialdehído, un compuesto β-dicarbonílico producto de la peroxidación lipídica que en un contexto de



estrés celular se ha asociado con la reducción de viabilidad en hepatocitos (Perez M. J. et al, 2005; Orozco-Aguilar J. et al, 2021). Existen otros mecanismos que intervienen en el estrés oxidativo inducido durante el proceso de colestasis. Así, el hecho de que la bilis que no es liberada de forma correcta al intestino, promueve el sobrecrecimiento de diferentes especies bacterianas afectando a la barrera intestinal. El sobrecrecimiento bacteriano implica una mayor facilidad de penetración de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (que actúan como endotoxinas) en el torrente circulatorio. Los LPS activan receptores tipo TLR4 (*Toll-like receptor 4*) implicados en la regulación al alza de las NOX aumentando la producción de ROS y contribuyendo al daño hepático (Singh N. & Li L., 2012).

Una activación de Nrf2 sostenida en el tiempo durante el daño hepático contribuye a hacer frente al estrés oxidativo (Okada K. et al., 2009). En este sentido, en modelos de ratón de colestasis por ligación del ducto biliar, se ha demostrado que una deficiencia en Nrf2 contribuye a una depleción de niveles de GSH y una reducción en el flujo de eliminación de ácidos biliares (Weerachayaphorn, J. et al., 2012). La activación de Nrf2 durante la colestasis se ha relacionado con la modulación del transportador BSEP (Stieger B. & Meier P.J., 2011), y de los transportadores multisustrato MRP2, 3 y 4, que sufren un aumento en su expresión cuando Nrf2 se activa, contribuyendo al transporte de ácidos biliares, colesterol y bilirrubina. Asimismo, la activación de Nrf2 se asocia con una reducción en la expresión de reguladores implicados en la síntesis de ácidos biliares como Cyp7a1, la enzima limitante de la vía de síntesis de ácidos biliares, y el citocromo 8b (Cyp8b1) (Ning C. et al., 2018).


Por otra parte, diferentes evidencias han sugerido un papel de Nrf2 en la contrarregulación del proceso de fibrosis hepática. La deficiencia de Nrf2 ha demostrado ser una de las causas de desarrollo de fibrosis en modelos de daño hepático (Xu D. et al., 2019). Además, se ha descrito una interesante relación o interacción funcional entre la vía de Keap1/Nrf2 y las NOXs que lo que podría jugar un papel importante en este contexto. Las enzimas NOX son importantes productoras de ROS en el hígado, expresadas principalmente en las células de Kupffer. Las células de Kupffer activadas presentan un aumento de la expresión de NOX-2, junto con la liberación de citoquinas, moléculas de adhesión y ROS. Este fenómeno contribuye a la activación de células estrelladas y la acumulación de matriz extracelular, lo que está estrechamente relacionado con la fibrosis hepática (Luangmonkong T. et al., 2023). Algunas evidencias apuntan a una correlación negativa entre los niveles de Nrf2 y NOX2, y por otra parte, NOX4 puede conducir a la activación de Nrf2 mediante la producción de ROS (Szanto I., 2022). Otras evidencias sugieren la probable relación de Nrf2 y el factor NLRP3 (*Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3*) el cual, activa la respuesta inflamatoria, incrementando los niveles de IL-1 β y promoviendo la activación de células estrelladas (Shi Y. S. et al., 2020). La inducción de Nrf2 puede inhibir la activación de NLRP3, reducir la expresión de IL-1 β y de TGF- β , suprimiendo la activación de células estrelladas y promoviendo la degradación de colágeno en el hígado (Meakin P. J. et al., 2014). La activación de la vía Nrf2/ARE y la inducción de enzimas antioxidantes de forma indirecta regula la expresión de proteínas de la familia Bcl-2, como Bax (*Bcl-2 associated X protein*), contribuyendo a atenuar el daño mitocondrial, el estrés oxidativo y la apoptosis de hepatocitos, y en consecuencia aminorando el daño colestásico y la fibrosis (Cui D. & Yang B., 2016).





OBJETIVOS





Numerosas evidencias avalan que la vía de señalización disparada por el HGF y su receptor Met, desempeña un papel fundamental en la regeneración del hígado tras un daño crónico a través de sus actividades mitogénicas, de supervivencia y morfogénicas sobre los hepatocitos y las CPH/OC. Sin embargo, su papel regulador específico de contexto y los mecanismos moleculares que subyacen a sus efectos pro-regenerativos no están totalmente dilucidados. Además, las evidencias también indican que una respuesta desequilibrada puede tener efectos negativos.

Bajo la premisa de que un conocimiento profundo del funcionamiento de la vía es relevante desde el punto de vista del diseño de estrategias terapéuticas en la enfermedad hepática, el objetivo general de este estudio es avanzar en esa dirección, mediante, por una parte, el análisis del impacto de la sobreexpresión de Met en el contexto de la respuesta regenerativa tras un daño crónico y su efecto en la función de los hepatocitos y las CPH/OC, y por otra, el análisis de la respuesta transcripcional inducida por HGF en CPH/OC, con el fin de identificar posibles dianas de acción.

Para abordar este objetivo general, se plantean dos objetivos concretos:

Objetivo 1: Estudiar el proceso de regeneración hepática en ratones que sobreexpresan el receptor de Met (Tg Met) sometidos a un daño colestásico crónico y dilucidar los mecanismos que subyacen a los efectos provocados por la sobreexpresión de Met.

Objetivo 2: Estudiar el perfil de genes regulados por la vía de HGF/Met en las CPH/OC mediante un análisis transcriptómico por tecnología de alto rendimiento, así como su posible relevancia durante la respuesta regenerativa.





MATERIALES Y MÉTODOS



1. Experimentación animal.

1.1 Declaración ética.

El uso de animales durante el proyecto cumplió con la legislación institucional, estatal y europea relativa a la vivisección, el uso de organismos modificados genéticamente y el cuidado y bienestar de los animales (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero; Directiva Europea 2010/63/UE aprobada por el Parlamento Europeo y el Consejo de la UE el 22 de Septiembre de 2010). Los animales se mantuvieron en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), en un ambiente controlado de temperatura, con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, y con acceso a dieta estándar y agua *ad libitum*. Rutinariamente fueron analizados para la detección de patógenos de acuerdo con los procedimientos estandarizados de la Federación de asociaciones europeas dedicadas a la ciencia del animal de laboratorio (FELASA). Los protocolos y procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional y Regional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid (Orden ECC/566/2015) (Proex 129/16).

1.2 Generación de ratones transgénicos Met.

Se ha empleado un modelo de ratón transgénico con sobreexpresión del receptor Met en el hígado generado en el laboratorio del Dr. F. Maina (Fan Y. et al., 2017). Para dicha generación, se cruzaron ratones que expresaban la recombinasa Cre bajo el promotor de la albúmina (*Alb-Cre*) con ratones $R26^{StopMet}$ (nomenclatura internacional $Gt(ROSA)26Sor^{tm1(Actb-Met)Fmai}$), los cuales portaban una secuencia stop flanqueada por sitios *LoxP* y un transgén Met quimérico en el locus *Rosa 26*. Los ratones resultantes presentan una sobreexpresión del transgén Met en niveles superiores al endógeno, en células albúmina positivas: *Alb-R26^{Met}* (Figura 15), denominados en el trabajo como transgénicos Met (Tg Met). Por otra parte, los ratones empleados como control son los $R26^{StopMet}$, denominados como *Wild Type* (Wt).



Figura 15. Representación esquemática de la generación de ratones transgénicos Met. Ratones inicialmente portadores del cassette LacZ-stop seguido de un transgén Met quimérico (*Rosa26 LacZ-stop-Met*, llamados $R26^{StopMet}$ o Wt) se cruzaron (X) con ratones *Alb-Cre* para dar lugar, tras la recombinação mediada por Cre, a los ratones transgénicos de Met en hígado (llamados *Alb-R26^{Met}* o Tg Met). Creado con: BioRender.com.

1.3 Modelo de daño hepático inducido por la dieta DDC.

Ratones Wt y Tg Met de entre 6-8 semanas de edad fueron aleatorizados en grupos experimentales de cinco individuos y sometidos a una dieta normal (grupo control) o a una dieta suplementada con un 0,1% de 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina, abreviado como DDC (Sigma Aldrich), una dieta ampliamente empleada como modelo de daño hepático colestático asociado con la expansión de CPH/OC (Preisegger K.H. et al., 1999). La dieta fue producida por los laboratorios Envigo y adecuadamente conservada en el laboratorio. Se recogieron muestras de suero y de tejido hepático tras 2 y 6 semanas de tratamiento con una dieta DDC o tras una dieta control para realizar posteriores análisis (Figura 16).

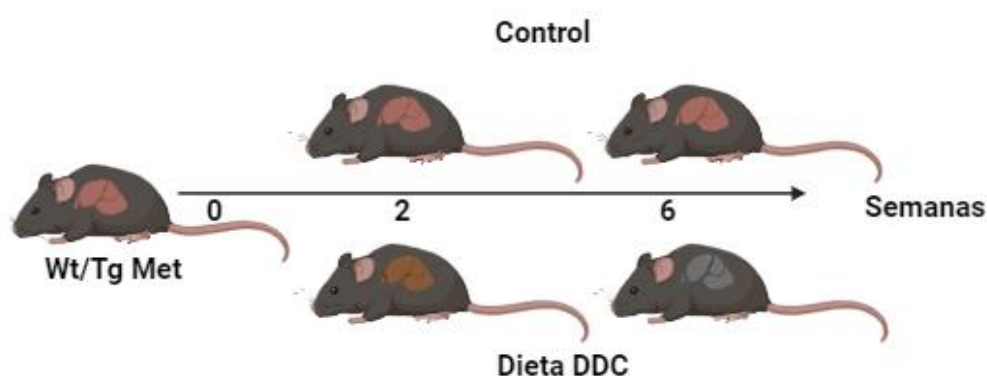


Figura 16. Representación esquemática del protocolo experimental. Creado con: BioRender.com.

1.4 Proceso de recogida de muestras.

Los ratones se anestesiaron por vía inhalatoria con isoflurano (laboratorios Esteve) y posteriormente se realizó una incisión para acceder a la cavidad torácica y exponer el corazón. La sangre se obtuvo por punción cardíaca directa utilizando una jeringa hipodérmica heparinizada de 1 ml y una aguja de calibre 25 mm. Tras coagulación a temperatura ambiente, se centrifugaron las muestras a 300 x g y temperatura ambiente durante 10 minutos para la separación del suero. El suero se congeló de forma inmediata a -80°C para posteriores análisis.

Los hígados fueron pesados. Parte de algunos lóbulos hepáticos fueron seccionados finamente y fijados en una solución al 10% de formalina (Sigma-Aldrich) durante toda la noche. Al día siguiente, se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) y después, consecutivamente, con diferentes soluciones: PBS-30% sacarosa, PBS-20% sacarosa y PBS-10% sacarosa. Posteriormente, el tejido fue embebido en parafina, y seccionado (4 µm) para posterior análisis inmunohistoquímico. La preparación de los bloques de parafina y la tinción Hematoxilina-Eosina (H&E) se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínica Universidad de Navarra (CUN), en colaboración con el Dr. Julián Sanz. El resto del hígado fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C para ser utilizado en la extracción de ARN y proteína.

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

La relación entre el peso del hígado y el peso del cuerpo (*liver to body weight ratio*) fue calculada siguiendo la siguiente fórmula matemática: $\% = 100 \times LW/BW$, donde LW es el peso del hígado y BW es el peso del cuerpo del animal, en el momento del sacrificio.

1.6 Análisis de marcadores séricos.

Las actividades de las enzimas marcadoras de daño hepático aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina, y la concentración de bilirrubina total, fueron analizadas por el Laboratorio Echevarne a partir de los sueros obtenidos.

1.7 Análisis morfométrico cuantitativo de la expansión de CPH/OC.

Se utilizó el software ImageJ para cuantificar la expansión de las CPH/OC a partir de los cortes histológicos teñidos con H&E. Las áreas de expansión de CPH/OC de 10 campos periportales no superpuestos de cada animal (3-5 animales por grupo) fueron delimitadas y medidas con un aumento 10X, y después normalizadas por el tamaño del área portal. Los datos se expresan como el valor medio relativo del área de expansión. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Eclipse TE300, Nikon acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS-U2.

1.8 Análisis histopatológico. Tinción de Rojo Sirio (*Sirius Red*).

Para la detección de fibras de colágeno tipo I y III mediante la tinción de *Sirius Red* a partir de los cortes histológicos embebidos en parafina, en primer lugar, se llevó a cabo la desparafinación del tejido en una estufa a 58°C durante 2 horas. Posteriormente, se hidrató el tejido mediante inmersión en soluciones con concentraciones decrecientes de etanol, tal y como se indica en la **Tabla 1**.

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

Tabla 1. Pasos de hidratación para la tinción *Sirius Red*.

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

Paso	Tiempo
Agua destilada	3-5 s
Agua destilada	3-5 s
Etanol 70%	3-5 s
Etanol 96%	3-5 s
Etanol 96%	3-5 s
Etanol 100%	3-5 s
Etanol 100%	3-5 s
Xileno	10 min
Xileno	10 min

Tabla 2. Pasos para la deshidratación en la tinción de *Sirius Red*.

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

2. Cultivo de líneas celulares.

2.1 Modelos celulares: hepatocitos inmortalizados.

Las líneas celulares usadas en este estudio proceden del laboratorio del Dr. F. Maina, obtenidas a partir de ratones Wt y Tg Met, anteriormente mencionados en el apartado 1.2 (Fan Y. et al., 2017). Del modelo animal se extrajeron hepatocitos Wt y Tg Met que se inmortalizaron para posteriores estudios *in vitro* (**Figura 17**) en las condiciones de cultivo descritas, a continuación, en el apartado 2.3. La inmortalización se llevó a cabo usando hepatocitos extraídos de hígados embrionarios de ratones E15.5 Alb-R26^{Met} y R26^{StopMet} mediante un retrovirus portador de la secuencia SV40 *large-T-antigen* (asociado al gen de resistencia a neomicina para la selección de clones estables). Posteriormente, tras 7 días en medio de cultivo adaptado para hepatocitos y pérdida de otros tipos celulares circundantes se obtenían las líneas celulares de hepatocitos inmortalizados (González-Rodríguez A., et al., 2007).

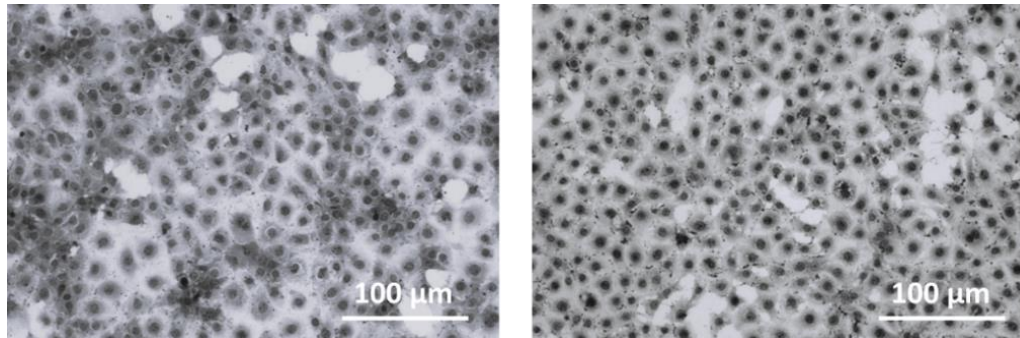


Figura 17. Imágenes representativas de hepatocitos Wt y Tg Met.

Imágenes tomadas con el microscopio de contraste de fases de hepatocitos Wt (izquierda) y Tg Met (derecha) en cultivo durante 24h en medio 10%FBS.

Para la simulación de un modelo de colestasis *in vitro* se trataron hepatocitos Wt y Tg Met durante 24h con la sal biliar TCDC a la concentración de 75 µM en medio de cultivo en ausencia de suero (**Figura 18**). Estos hepatocitos pretratados con TCDC, se mantuvieron en medio renovado con TCDC para posteriores experimentos. La puesta a punto se describe con más detalle en la sección de resultados.

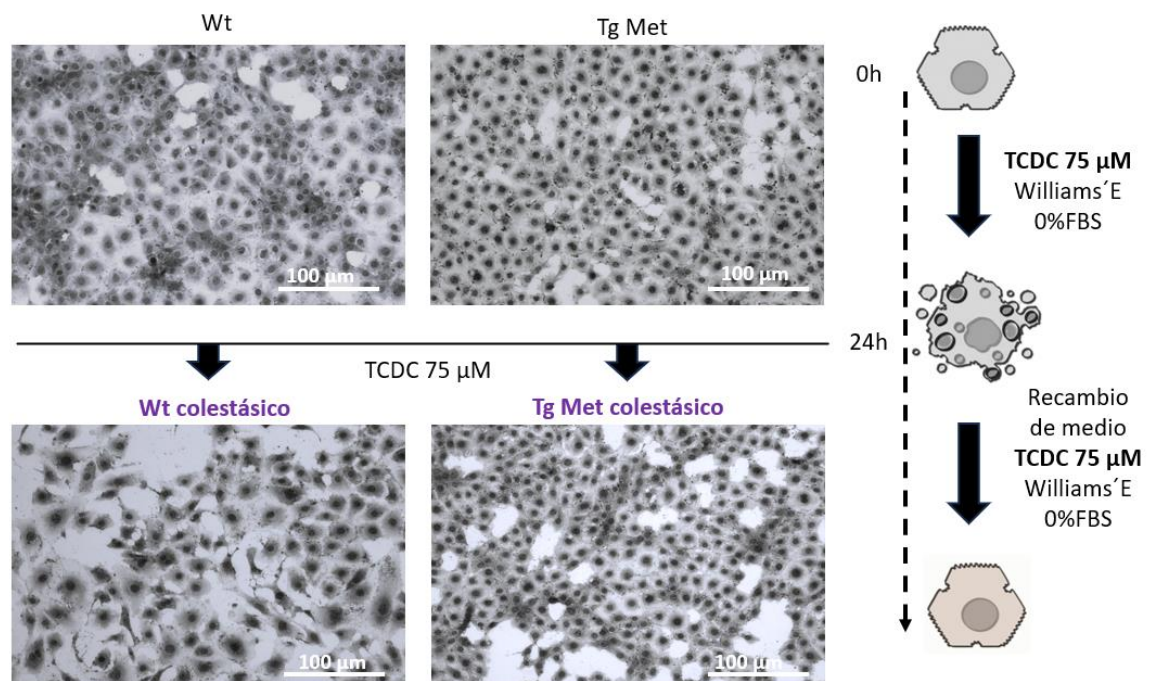


Figura 18. Imagen representativa de hepatocitos Wt y Tg Met basales y pretratados con TCDC. Imagen realizada en microscopio de contraste de fases de hepatocitos Wt (izquierda) y Tg Met (derecha) en cultivo durante 24h en medio 10%FBS (panel superior), y tras ser incubados durante 24h con TCDC 75 µM en medio al 0% FBS (panel inferior).

2.2 Modelos celulares: CPH/OC.

La línea celular de CPH/OC Met^{fix/fix} procede de un modelo de ratón *knockout* condicional para Met generado mediante el sistema de modificación genética *Cre-loxP* en el laboratorio del Dr. S. S. Thorgeirsson (Huh C. G. et al., 2004). Estos ratones presentan secuencias *loxP* flanqueando el exón 16, que codifica para un dominio de unión a ATP de la región tirosina quinasa de Met esencial para la activación del receptor. La eliminación de esta región mediante la expresión de la Cre-recombinasa bajo el control del promotor de citomegalovirus (Ad-CMV-Cre, Biolabs) conduce a la expresión de un receptor que carece de actividad tirosina quinasa, dejando así de ser funcional, obteniendo así el tipo celular CPH/OC Met^{-/-} (también llamada KO). El aislamiento, la generación y la caracterización de las líneas celulares de CPH/OC Met^{fix/fix} y Met^{-/-} se ha descrito previamente (del Castillo G. et al., 2008). Brevemente, las líneas celulares de CPH/OC WT y Tg Met usadas en este estudio proceden de ratones WT y Tg Met machos de 9 semanas de edad sometidos a una dieta suplementada con un 0,1% DDC durante 13 días. La fracción celular hepática no parenquimática (libre de hepatocitos) enriquecida en CPH/OC se aisló según el procedimiento descrito en la bibliografía (Bisgaard H. C. et al., 1996) ligeramente modificado, basado en la digestión del tejido hepático mediante combinación de perfusión y digestión en baño a 37°C con 0,1% de Pronasa E, 0,05% de Colagenasa tipo I y 0,007% de ADNasa I. La suspensión celular obtenida y filtrada (filtro de 70 µm, Falcon) se sometió a un gradiente de Percoll (30% y 70% Percoll), y se sembró en un medio de adhesión/crecimiento Williams E. Las células adheridas se mantuvieron en cultivo y se seleccionaron en base al fenotipo, se expandieron y caracterizaron para confirmar su identidad según se describe en (del Castillo G. et al., 2008).

2.3 Condiciones de cultivo celular.

El cultivo de hepatocitos se realizó en placas de cultivo Corning TM, en medio comercial William's E, 4,5 g/l glucosa (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich), 0.75 mM piruvato sódico, 120 µg/ml penicilina G (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml estreptomina (Sigma-Aldrich), 1,25 µg/ml anfotericina B (Gibco) y 0.4 µg/ml dexametasona añadido de forma extemporánea. Las condiciones físicas de cultivo eran controladas diariamente, temperatura de 37°C, humedad del 80% y atmósfera al 5% de CO₂. El medio se renovó completamente cada 3 días y las células se tripsinizaron y subcultivaron usando tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Gibco) cuando alcanzaron el 80-90% de confluencia. Las células fueron sometidas a control de infección por *Mycoplasma spp.* mediante protocolo estandarizado en el laboratorio de trabajo mediante PCR. El cultivo de las líneas de CPH/OC se realizó en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enriquecido con 4,5 g/l glucosa, suplementado con HEPES 20 mM (pH 7,4) (Sigma-Aldrich) y 10% FBS (Gibco) además de penicilina G 120 µg/ml (Sigma-Aldrich), estreptomina 100 µg/ml (Sigma-Aldrich) y anfotericina B 1,25 µg/ml (Gibco). Las condiciones físicas del cultivo y los subcultivos son iguales a los descritos anteriormente. Para la realización de los experimentos solo se utilizaron células de bajo número de pases (p4-p12).

Para criopreservar las células, éstas fueron tripsinizadas y centrifugadas durante 5 minutos a 450 x g. El precipitado celular fue resuspendido en una solución de FBS con dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) al 10% (v/v) e introducido en criotubos (Nunc). Las células se congelaron lentamente mediante el uso de una caja de criopreservación de polietileno bañada por isopropanol (Mr. Frosty, Thermo Scientific), introducida en un congelador a -80°C. Pasado un plazo máximo de 48h los criotubos fueron almacenados en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C. La descongelación de las células se realizó de forma rápida, pasando los criotubos directamente a un baño a 37°C. Una vez descongeladas, las células fueron sembradas en placas de cultivo con abundante medio de cultivo. Una vez adheridas, el medio fue reemplazado por medio fresco para la total eliminación del DMSO.

2.4 Factores de crecimiento y ácidos biliares.

Los factores de crecimiento y ácidos biliares utilizados en este trabajo aparecen resumidos en la **Tabla 3**:

Factores de crecimiento y sales biliares	Concentración final	Casa comercial
TGF-β1 HGF Tauroquenodesoxicolato de sodio (TCDC)	0,5-5 ng/ml 40 ng/ml 50-100 μM	BioNova R&D systems Sigma-Aldrich

Tabla 3. Factores de crecimiento y ácidos biliares.

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

3. Análisis de ADN.

3.1 Aislamiento de ADN genómico.

Para el genotipado de los células, el aislamiento del ADN genómico se realizó mediante una extracción fenol:cloroformo clásica. En primer lugar, las células se lavaron con PBS y se recogieron mediante rascado. Posteriormente, se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos a 4°C y se resuspendió el precipitado obtenido en 0,5 ml del tampón de lisis (Tris-HCl pH 8 100 mM, EDTA 5 mM, Dodecil sulfato sódico (SDS) 0,2% p/v, NaCl 200 mM, Proteínasa K 100 μg/ml añadida de forma extemporánea) y se incubó durante toda la noche a 55°C en agitación continua.

A continuación, se añadió el mismo volumen de fenol (0,5 ml), se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 3 minutos a 13.400 x g. Se tomó la fase acuosa superior que contiene los ácidos nucleicos y se añadió el mismo volumen de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 3 minutos a 13.400 x g. Nuevamente,

se tomó la fase superior y se realizó la misma operación sólo con cloroformo con el fin de eliminar los restos de fenol. Finalmente, se precipitó el ADN genómico mediante inversión manual con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 1 volumen de isopropanol. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70% y se centrifugó 2 minutos a 9.800 x g. El precipitado obtenido se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl pH 8 10mM, EDTA 1mM) y se incubó durante 1-2 horas a 37°C para facilitar su resuspensión. La concentración de ADN se determinó espectrofotométricamente a 260 nm (NanoDrop 2000).

3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se incubó 1 µg de ADN genómico con una mezcla de 0,4 µM de cebadores específicos (Tabla 4), 200 µM dNTPs (Thermo Scientific), tampón NH₄⁺ 1X, 1,5 mM MgCl₂ y 2 unidades de Taq polimerasa (Bioline). Las condiciones de PCR utilizadas para el genotipado de los hepatocitos Tg Met fueron las siguientes:

- 95°C durante 5 minutos.
- 30 ciclos con 3 pasos: 95°C durante 30 segundos (desnaturalización), 62°C durante 30 segundos (unión de los cebadores: *LoxP1* y *Met3*) y 72°C durante 40 segundos (elongación).
- 72°C durante 10 minutos.
- 4°C (conservación).

Para el genotipado de las células Wt se llevó a cabo el mismo protocolo en el termociclador salvo los cebadores empleados (*LacZ forward* y *LacZ reverse*) y una temperatura de 63°C durante 30 segundos para la unión de los cebadores.

Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en geles de 1,3% de agarosa en tampón TAE 1X que contenían el colorante GelRed (Biotium) para la visualización de ácidos nucleicos. La electroforesis se llevó a cabo durante aproximadamente 60 minutos a 90 V. Se observaron bandas de amplificación específicas para: el fragmento *LoxP1-Met3* (secuencia presente en el genotipo Tg Met, indica que la *Cre* recombinasa ha actuado) de un tamaño de 486 pb, o el fragmento correspondiente al gen *LacZ* (secuencia presente en el genotipo Wt, indica que la recombinasa no ha actuado) de un tamaño aproximado de 315 pb (Figura 19).

Gen	Cebador 5'-3' (<i>forward</i>)	Cebador 5'-3' (<i>reverse</i>)
<i>LoxP1</i>	CGGGGTTCGGCTTCTTCTGGCG	
<i>Met3</i>		ATCCCGACAAGCTAAACA
<i>LacZ</i>	ATCCTCTGCATGGTCAGGTC	
<i>LacZ</i>		CGTGGCCTGATTCATTCC

Tabla 4. Secuencias de los cebadores empleados en el genotipado de las líneas de hepatocitos.

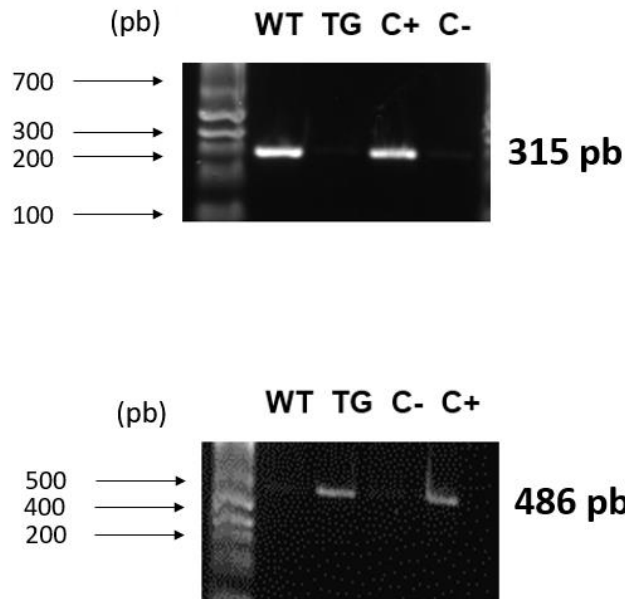


Figura 19. PCR ilustrativa para el genotipado de los hepatocitos Wt y Tg Met. La PCR confirma la presencia del gen *LacZ* de 315 pb en los hepatocitos Wt y la presencia del fragmento *LoxP1-Met3* a 486 pb en los hepatocitos Tg Met. C+ es un control positivo que lleva ADN genómico de células progenitoras hepáticas Wt y Tg Met previamente genotipadas; C - es un control negativo que lleva H₂O en lugar de ADN genómico.

4. Análisis de la expresión génica.

4.1 Aislamiento de ARN total.

En el caso del aislamiento a partir de células en cultivo, éstas se lavaron con PBS frío 1X y se recogieron mediante rascado con tampón de lisis (proporcionado en el kit comercial NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel). En el caso de tejido hepático, 40 mg de tejido congelado fueron machacados con un mortero previamente refrigerado, homogenizados con una aguja fina y lisados con tampón de lisis comercial (T-PER, Thermo Fisher Scientific) durante 30 minutos. En ambos casos, el ARN se aisló siguiendo el protocolo del kit comercial mencionado arriba, incluyendo el tratamiento con ADNasa (proporcionado en el propio kit) para evitar la presencia e interferencia de ADN genómico. El ARN fue eluído en agua libre de ARNasas y se conservó a -80°C hasta su posterior utilización.

La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente (NanoDrop 2000) a 260 nm. La pureza de las muestras de ARN se determinó mediante la relación entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm. Se aceptó un valor de ratio entre 1,8 y 2,0 como ARN puro.

4.2 Síntesis de ADNc (RT, retrotranscripción).

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

4.3 RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR).

Las reacciones de RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) se realizaron por triplicado en placas de 384 pocillos, siendo el volumen total de reacción por pocillo de 10 µl. La composición de la mezcla de reacción se detalla en la **Tabla 5**.

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

Tabla 5. Composición de la mezcla de reacción para la RT-qPCR.

El desarrollo de la reacción de RT-qPCR se realizó en un equipo ABI Prism 7900 HT Fast-Real-Time de Applied Biosystems del Servicios de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Las secuencias de los cebadores empleados se encuentran indicadas en la **Tabla 6**. La expresión de *Gusb* se empleó como normalizador interno. Además, se prepararon controles negativos mediante la adición de agua en lugar de ADNc en las muestras, con el fin de detectar posibles amplificaciones inespecíficas.

Se obtuvo el parámetro Ct (*Cycle threshold*), definido como el número de ciclos que cada muestra necesita para alcanzar un valor de fluorescencia umbral a partir del cual ese ADN puede ser detectado. Para cada condición del experimento los datos de Ct de cada gen se corrigieron con los valores de Ct del normalizador interno, obteniéndose así el valor de ΔCt . Éste, a su vez, se expresó en relación a los valores de ΔCt de un control, obteniendo así el parámetro $\Delta\Delta\text{Ct}$. Dicho parámetro, una vez expresado en escala no logarítmica mediante la transformación $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ proporciona el número de veces de inducción de la expresión del gen en estudio respecto a un control, denominado valor RQ.

Proteína	Gen	Cebador 5'-3' (forward)	Cebador 5'-3' (reverse)
TPA	<i>Tpa</i>	CTGAGGTCACAGTCCAAGCA	CCTTTTAGGGCGCATCTTCTG
PAI-1	<i>Serpine1</i>	TACTGCTGCTTTGTGGACTGG	CGACTGGTGTCTGTTGGTAAG
TIMP1	<i>Timp1</i>	TGGGTGGATGAGTAATGCGT	GGTATCTGCTCTGGTGTGTCTC
MMP9	<i>Mmp9</i>	CTCCTTCTTTGCTTCAACCG	GTGGATAGCTCGGTGGTGT
R1Tgfβ	<i>Tgfβ1</i>	TGCTAATGGTGGACCGCAACAAC	AGCTCTGCACGGGACAGCAAT
R2Tgfβ	<i>Tgfβ2</i>	TGGAGTCACAACAGTCCAGCCG	ATGTAAAGAGGGCGAAGGCAGCA
R3Tgfβ	<i>Tgfβ3</i>	AAGGCTGCACTCAGGAGACCTC	GTAATTCCTTTGGGGCAGACGGC
SMAD7	<i>Smad7</i>	CAGATGCTGTACCTTCTCCGC	ATGCCACCACGCACCAGTGT
COL1A1	<i>Col1A1</i>	GTCGCTTACCTACAGCACCTT	AGGCGGGAGGTCTTGGTGGTTT
EPCAM	<i>Epcam</i>	ACCTGAGAGTGAACGGAGAGCC	TGCATGGAGAACTCGGGTGCCT
CK19	<i>Krt19</i>	TTCAGTACGCATTGGGTGAGGGG	ACACAGCCAGGGTCCCCTAA
HNF4α	<i>Hnf4a</i>	GGCATGGATATGGCCGACTAC	TTCAGATGGGGACGTGTCTATT
GUSB	<i>Gusb</i>	AAAATGGAGTGCCTGTTGGGTGCG	CCACAGTCCGTCCAGCGCCTT
MET	<i>Met</i>	CCAGCCCCTCTGCTTCTTT	CGGTGGGAGCCTTCATTGTG
HGF	<i>Hgf</i>	GAGTCTGAGTTATGTGCTGGG	AGGACGATTTGGGATGGC
IL-1β	<i>Il1b</i>	CTGGGAAACAACAGTGGTCA	CTGCTCATTACGAAAAGGG
IL-6	<i>Il6</i>	AGACAAAGCCAGAGTCTTCA	GGAGAGCATTGGAATTGGGG
IL-10	<i>Il10</i>	CCTTCAGCCAGGTGAAGACT	GGCAACCCAAGTAACCCTTA
NLRP3	<i>Nlrp3</i>	TCAGATTGCTGTGTGTGGGA	AGATCCTGACAACACGCGGA
IFNγ	<i>Ifng</i>	AGACAATCAGGCCATCAGCA	CTGGACCTGTGGGTTGTTGA
TNFα	<i>Tnfa</i>	ACGTGCTAGCAAACCACCAA	ATCGGCTGGCACCCTAGTT
BSEP	<i>Abcb11</i>	GCCAAAGTACAGGGAGCACT	TCATGGGTGCCTCTTTCCAC
OATP1	<i>Slco1a1</i>	CCCAAATACCTGGAGCAGCA	CCAAGGCATACTGGAGGCAA
MRP4	<i>Abcc4</i>	CCTGGTGAGTTGTTAGCCGT	CAGGGCTGCTGAGAAAACGTA
ABCG2	<i>Abcg2</i>	ATCCGCAGGGTTGTTGTAGG	CAGCCTCACCTTACTGGCTT
NTCP	<i>Slc10a1</i>	CCTTGCGCCATAGGGATCTT	ACAGCCACAGAGAGGGAGAA
OATP3A1	<i>Slco3a1</i>	CTGGGGTCACTGTTGCTAC	GAGTCCGTCTGGCATTACACA
TGF-β1	<i>Tgfβ1</i>	ATGAACCGGCCCTTCTGCT	TTGGTATCCAGGGCTCTCCGGT
TGF-β2	<i>Tgfβ2</i>	TGGAGTCACAACAGTCCAGCCG	ATGTAAAGAGGGCGAAGGCAGCA
TGF-β3	<i>Tgfβ3</i>	AAGGCTGCACTCAGGAGAC	GTAATTCCTTTGGGGCAGA
CYP7A1	<i>Cyp7a1</i>	CAACCTGCCAGTACTAGAT	AAGGTGTAGAGTGAAGTCTCC
SOD1	<i>Sod1</i>	GCGATGAAAGCGGTGTGCGT	GTGGAACCCATGCTGGCCTT
SOD2	<i>Sod2</i>	TGGGGCTGGCTTGCTTCAA	GCGTGCTCCCACACGTCAAT
SOD3	<i>Sod3</i>	TAGCTGGGTGCTGGCCTGAA	AGCAAGCCGTAGAACAAGAAGGC
δ-GCLc	<i>δ-Gclc</i>	ACATCTACCACGCAGTCAAG	AAGAACATCGCCTCCATTCA
NOX4	<i>Nox4</i>	CCTCAACTGCAGCCTCATCC	CAACAATCTTCTTCTGTTCTCC
CATALASA	<i>Catalasa</i>	GTCACCGGCACATGAATGGCTA	TGCCCTGGTGGTCTTGTAAATGG
TGR5	<i>Gpbar1</i>	TTATGGCCTCCTGTTGCTG	GCCAGGGTTGAGGGTACATC
FXR	<i>Nr1h4</i>	AGAAACTTCTGCGGGTCAT	CTGTGAGCAGAGCGTACTCC
GR	<i>Gsr</i>	ACATTGCTGTGGAGATCGCGGG	CCAGTTCCTCGGTGCAGTTGGA
NRF2	<i>Nfe2l2</i>	CTCCTTGAGCTCAAATCCCACCTTA	TGGGCTCTGCTATGAAAGCA
GSS	<i>Gss</i>	AATGCGGTGCTACTGATTGCT	GATACACTGGACCCTTGGGCAGG
cGKII	<i>Prkg2</i>	CCTGTCCCACCTTCTTCCAC	CCCAATGAGCAAGTGGCAAG
DAB2	<i>Dab2</i>	ACCAGGAAGAGGCAGAAGGA	CGTGTGAGCACTATGGGGTC
ETV4	<i>Etv4</i>	ATCCCTTCGACCATTCCCAG	CCACAGTTGTAAGGCACCCC
SPRY4	<i>Spry4</i>	GACTTCAACGGCGACTGACC	GAGGTCTGAACTGCACCAA
PITPNM3	<i>Pitpnm3</i>	TTTTCTCGGACGGACTGGTG	TTTCGTGGAGCCATAGGCAG
NR4A1	<i>Nr4a1</i>	TCTTGCCACAGGGCAATCC	CGTGTGAGCACTATGGGGTC
TFAP2A	<i>Tfap2a</i>	CCGTTGTCCATTTAGGCA	TCTGTGAAGTGCCTCTTGT
PLS1	<i>Pls1</i>	CACAGGGCCTCAGATGACAA	GGTGGGCTGGCAAAGGTAA
GNBP1	<i>Ggnbp1</i>	GCAGTATTTGGGCCGTATT	CTACCGCACAAACGCATTTT
JAM2	<i>Jam2</i>	GGAACCCACTGTAAGCATCC	TGAGGTGGCCCTGAGTTAAG
CICLINA1	<i>Ccnd1</i>	ATATGGTCCCAACGTCTGCC	GCTGGCAAGTAGGAACTGG
CYR61	<i>Cyr61</i>	CCAGGTCTCGCCATCTTTT	TGGCAGCACCAACATAACCA
UFSP1	<i>Ufsp1</i>	GATCTACCCAACGGTGCAGG	CGAACAACCCTATGAGCACC

ADAMTS5	<i>Adamts5</i>	GATCTACCCAACGGTGCAGG	CGAACAACCCTATGAGCACC
ADAMTS7	<i>Adamts7</i>	TTGGCTGGGATAACTCGTCT	GGTGGGCTGGCAAAAGGTAA
PDZK1LP1	<i>Pdzk1lp1</i>	GAGGGGGTCTTGTTTAGCC	TCACTTGGTCTTGGGGCTTC

Tabla 6. Secuencias de los cebadores empleados en la RT-PCR cuantitativa.

5. Análisis de la expresión de proteínas.

5.1 Análisis de la expresión de proteínas mediante western blot.

5.1.1 Obtención de extractos proteicos celulares.

Las células se lavaron con PBS 1X frío y se rascaron en tampón de lisis RIPA (*Radioimmunoprecipitation Assay*) modificado (Tabla 7). Los lisados celulares se incubaron durante 30 minutos a 4°C, agitando mediante vórtex cada 10 minutos, y pasado ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 15.700 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su uso.

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

Tabla 7. Composición del tampón RIPA modificado.

(*) Añadido de forma extemporánea.

5.1.2 Obtención de extractos proteicos a partir de tejido hepático.

25-30 mg de tejido hepático congelado se machacaron con un mortero en hielo seco y se lisaron en tampón RIPA modificado (Tabla 7) durante 40 minutos a 4°C, agitando mediante vórtex cada 10 minutos. Pasado ese tiempo, se procedió como en el apartado 5.1.1.

5.1.3 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se realizó siguiendo el método de Bradford, utilizando una recta patrón con concentraciones conocidas (0-10 µg) de albúmina sérica bovina (BSA,

PanReac). Las muestras a valorar se prepararon por triplicado, añadiendo 1 μ l de extracto proteico, 49 μ l de agua ultrapura y 200 μ L de reactivo de Bradford (PanReac). Posteriormente, se cuantificó la absorbancia a una λ de 595 nm en un lector de placas (Powerwave XS, Biotek).

5.1.4 Electroforesis de proteínas.

Las muestras se prepararon utilizando el tampón de carga Laemmli 4X (Tabla 8) y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos.

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

Tabla 8. Composición del tampón de carga Laemmli 4X.

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

5.1.5 Transferencia de proteínas.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando un equipo de transferencia en húmedo y tampón de transferencia (metanol 20%, Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM) a amperaje constante (0,3 A) durante 110-160 minutos, dependiendo del tamaño o grosor del gel, así como del porcentaje de acrilamida. Para evaluar la eficacia de la transferencia, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau (0,2% en ácido tricloroacético al 3%).

5.1.6 Inmunodetección de las proteínas.

Tras la transferencia de las proteínas a las membranas, éstas se lavaron con tampón TTBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 0,05%, pH 7,6) y se incubaron con una solución de bloqueo (5% de leche desnatada en polvo o BSA en TTBS, según las especificaciones de cada anticuerpo) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Seguidamente, se incubaron en agitación suave a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario diluido como se indica en la Tabla 9 en TTBS suplementado con 0,5-5% de leche o BSA, según las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TTBS para eliminar el anticuerpo no unido a la

proteína y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente diluido 1:5000 en TTBS suplementado con 0,5-1% de leche o BSA durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, tras 3 nuevos lavados de 10 minutos con TTBS se realizó la inmunodetección mediante una reacción de quimioluminiscencia con la enzima peroxidasa que lleva acoplada el anticuerpo secundario. Esta reacción se llevó a cabo con un kit comercial (Pierce ECL *Western blotting substrate*) en el documentador de geles VWR® Imager2 Imager CHEMI Premium.

Las membranas podían ser borradas para ser rehibridadas con otros anticuerpos. Para ello se incubaron con una solución de borrado (glicina 0.2 M, SDS 0,1%, Tween-20 1% a pH 2,2-2,5) dos veces durante 7 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron en TBS dos veces durante 10 minutos y finalmente en TTBS dos veces durante 5 minutos.

Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución	Especie
β-ACTINA	Cell Signaling Technology (3700)	1:5000	Ratón
Phospho-MET	Cell Signaling Technology (Tyr1234/1235) (3126)	1:1000	Conejo
MET	Cell Signaling Technology (Tyr1234) (25H2)	1:1000	Ratón
COL1A1	Cell Signaling Technology (Phe1197) (72026)	1:1000	Conejo
TIMP-1	Santa Cruz Biotechnology (sc-365905)	1:1000	Ratón
MMP9	Santa Cruz Biotechnology (sc-13520)	1:1000	Ratón
EPCAM	Santa Cruz Biotechnology (sc-66020)	1:1000	Ratón
Phospho-AKT	Cell Signaling Technology (Ser473) (9271)	1:1000	Conejo
Phospho-ERK1/2	Cell Signaling Technology (Thr202/Tyr204) (9101)	1:1000	Conejo
Phospho-SMAD2	Cell Signaling Technology (Ser465/467) (3101)	1:1000	Conejo
Phospho-STAT-3	Cell Signaling Technology (Tyr705) (9145)	1: 1000	Conejo

Tabla 9. Anticuerpos primarios utilizados en western blot.

5.2 Análisis de expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

5.2.1 Tinción inmunohistoquímica de CK19/Ki67 a partir de cortes histológicos embebidos en parafina.

Para la tinción inmunohistoquímica de CK19/Ki67 a partir de los cortes histológicos embebidos en parafina, en primer lugar, se llevó a cabo la desparafinación del tejido en

una estufa a 50°C durante 30 minutos. Posteriormente, se hidrató el tejido mediante inmersión en soluciones con concentraciones decrecientes de etanol, tal y como se indica en la **Tabla 10**. Todos estos pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

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

Tabla 10. Pasos de hidratación para la inmunohistoquímica.

A continuación, las muestras se sumergieron en un tampón citrato 10 mM (pH 6) y se hirvieron durante 15 minutos. Este paso rompe los puentes de metileno y expone los determinantes antigénicos para permitir la unión de los anticuerpos. Seguidamente, las muestras se dejaron sumergidas en el tampón durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se permeabilizaron con PBS-1% Triton X-100 durante 5 minutos y se lavaron en PBS-0,1% Tritón X-100 durante 5 minutos. En este punto, se procedió a inactivar la peroxidasa endógena, con el fin de minimizar la señal endógena inespecífica mediante la incubación de los tejidos en PBS-3% H₂O₂ durante 15 minutos a temperatura ambiente, y posterior lavado en PBS-0,1% Tritón X-100 durante 10 minutos. El bloqueo se realizó en PBS-0,1% Tritón X-100 suplementado con 6% de suero de cabra y 3% BSA en una cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios frente a CK19 (Hybridoma Bank), diluido 1:2 en solución de bloqueo, y frente a Ki67 (Abcam, ab15580), diluido 1:25 en solución de bloqueo, en una cámara húmeda primero durante 2 horas a 37°C y seguidamente durante toda la noche a 4°C.

Posteriormente, se lavaron las muestras en PBS-0,1% Tritón X-100 durante 5 minutos y se incubaron durante 1 hora y media con los anticuerpos secundarios anti-rata FITC (Invitrogen, 31629) y anti-conejo AlexaFluor 594 (Invitrogen, A11012), ambos diluidos 1:30 en solución de bloqueo en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Además, también se añadió DAPI (PanReac) diluido 1:1000 en solución de bloqueo para la visualización de los núcleos. Luego se lavaron las muestras, primero en PBS y posteriormente en agua destilada (5 minutos cada lavado) y finalmente se montaron utilizando Mowiol (Sigma-Aldrich). Las preparaciones se visualizaron en un microscopio de fluorescencia invertido (Eclipse TE300, Nikon) con un objetivo 20X. El número de células ductales proliferativas Ki67+/CK19+ y de células parenquimáticas Ki67+ fueron analizadas utilizando el software ImageJ en al menos 8 campos por muestra.

5.3 Análisis de expresión de proteínas mediante inmunoprecipitación.

Extractos celulares totales para la inmunoprecipitación de Met fueron preparados con tampón RIPA como se describe en el apartado 5.1.1. Un mg de proteína extraída fue diluida con tampón RIPA, ajustando a una concentración de proteína final 1 µg/µl. Se añadió anticuerpo anti-Met (Cell Signalling, 4560) a una concentración de 7 µg/mg de proteína. La mezcla fue incubada con esferas de agarosa unidas a proteína A (MERCK) durante toda la noche a 4°C en agitación constante y suave. Al día siguiente, los inmunoprecipitados fueron lavados tres veces con tampón RIPA y resuspendidos en tampón Laemmli 4X (apartado 5.1.4). Las muestras fueron hervidas durante 5 minutos a 95°C con el fin de separar las bolitas de proteína A-agarosa. Paralelamente se preparó un control negativo sin extracto proteico.

Las muestras fueron cargadas en un gel de acrilamida al 8% SDS-PAGE junto con un marcador de peso molecular. Se sometió a electroforesis durante 2h a 100V y se transfirió a una membrana de PVDF tal y como se describe en el apartado 5.1.5. Se emplearon anticuerpos anti-Met y anti-p-TYR 100 (Tabla 11) para la detección de proteínas tal y como se describe en el apartado 5.1.6

Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución	Especie
MET	Cell Signaling Technology (4560)	1:5000	Conejo
Phospho-Tyr kinase (p-TYR 100)	Cell Signaling Technology (9411)	1:1000	Ratón

Tabla 11. Anticuerpos primarios utilizados en la inmunoprecipitación y posterior western blot.

6. Análisis de la viabilidad y proliferación celular.

6.1 Contaje celular.

Para el análisis de la respuesta de las células en cultivo al tratamiento con factores, las células se sembraron por triplicado en placas de 12 pocillos en medio completo en un rango de distintas densidades (10.000-65.000 células), según el tipo de experimento y tratamiento utilizado en cada caso. Al día siguiente se privaron de suero (2-3 horas) y se añadieron los diferentes factores de crecimiento, para realizar el contaje a diferentes tiempos. Para ello, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron, se tiñeron con azul de tripano (Lonza) y se realizó un contaje celular utilizando una cámara de Neubauer.

6.2 Tinción con cristal violeta.

Este método permite la cuantificación de las células que permanecen adheridas a la placa tras un tratamiento, por ello es útil para cuantificar proliferación y muerte celular, en este último caso sólo cuando el proceso de toxicidad implica la pérdida de adhesión. Se sembraron 185.000 células en placas de 6 pocillos y, tras los diversos tratamientos, se lavaron 2 veces con PBS e incubaron durante 30 minutos con la solución colorante y fijadora (cristal violeta 0,2% p/v (Sigma-Aldrich) en 2% etanol) a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el exceso de colorante mediante lavados con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Las células teñidas se resuspendieron con una solución de SDS al 1% durante 30 minutos. Finalmente, la cuantificación se realizó espectrofotométricamente, midiéndose la absorbancia a 560 nm.

7. Determinación de la actividad β -Galactosidasa.

Para la detección de la actividad β -galactosidasa como método de caracterización de células con la construcción génica que expresa esta enzima, se empleó el sustrato cromogénico X-gal que al ser degradado por la enzima forma un precipitado azul. Las células se lavaron dos veces con PBS 1X frío y se añadieron 3 ml de solución fijadora por placa (formaldehído 37%, glutaraldehído 25% en PBS 1X) durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se retiró la solución fijadora, se realizaron 4 lavados con PBS 1X frío y se añadieron 3 ml de solución de tinción (sustrato X-gal (Sigma-Aldrich) 40 ng/ml disuelto en dimetilformamida; ferrocianuro potásico 50 mM disuelto en PBS 1X; ferrocianato potásico 50 mM disuelto en PBS 1X; y 1 M de $MgCl_2$) durante toda la noche, en oscuridad, a 37°C. Al día siguiente se retiró la solución de tinción, y se lavó 2 veces con PBS 1X atemperado. Se visualizaron las células en un microscopio Eclipse TE300, Nikon acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS-U2 con un objetivo 20X.

8. Análisis de la producción de radicales libres de oxígeno mediante la medida de fluorescencia en placa.

Para la detección de la formación de radicales libres de oxígeno, de sus siglas en inglés ROS, se utilizó una sonda lipofílica de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA, Sigma-Aldrich), una forma reducida de fluoresceína que sirve de marcador de ROS en las células, tal y como se describe en la bibliografía (Reiniers M.J. et al., 2021; de Haan L. R. et al., 2022). Esta sonda se incorpora al interior celular y es convertida finalmente en 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF), compuesto emisor de fluorescencia, debido a la acción de esterasas intracelulares y la oxidación (**Figura 20**). El ensayo en líneas celulares *in vitro* se realizó en placas de 6 pocillos. Las células, tras someterse a los diferentes tratamientos, se lavaron dos veces con PBS 1X atemperado a 37°C. Posteriormente, se añadió 1 mL de William's E 0%FBS con 10 μ M de DCFH-DA (a partir de un stock 10 mM disuelto en DMSO), y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en ausencia de luz.

Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se lavó dos veces con PBS 1X, finalmente se mantuvo la placa con 1 ml de PBS 1X sin sonda para su observación al microscopio de fluorescencia en el canal verde. A continuación, se retiró el PBS de los platos, se añadió 200 μL de RIPA, tras 5 minutos de incubación en hielo y en ausencia de luz, se rascaron los platos y el lisado se recogió en tubos eppendorf. Seguidamente esos tubos se centrifugaron a 10.000 x g y el sobrenadante se recogió. La lectura fluorimétrica se realizó en una placa de 96 pocillos con 100 μL de sobrenadante, a una λ excitación de 485nm y a una λ de emisión de 530 nm en un equipo de fluorimetría automatizado (TECAN infinite M200). Paralelamente se guardó una alícuota para la valoración de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford anteriormente descrito (sección 5.1.3.).

El protocolo que se llevó a cabo para muestras de tejido hepático basado en el modelo propuesto en la bibliografía (Murphy M. P. et al., 2022) se describe a continuación: a partir de 250 mg de tejido machacado en hielo seco y extraído con 400 μl de tampón de extracción (Hepes 50 mM a pH 7.5, NaCl 150 mM, CaCl_2 1 mM, 10% glicerol, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 10 mM NaF, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 2 mM benzamidina, 2 mM PMSF, 5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 20 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina y 2 mM NaVO_3), se sometió a sonicación a 3.5 mA durante 1 minuto y se centrifugó a 10.000 x g . Una parte del sobrenadante se empleó para la valoración de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford y el restante se congeló a -80°C hasta su posterior utilización. Se emplearon 100 μl del sobrenadante y 1900 μl de tampón Locke's (14 mM NaCl, 15,6 mM KCl, 3,6 mM NaHCO_3 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM D-glucosa, 5 mM Hepes) y se incubó con 10 μM de la solución de H2DCF-DA durante 30 minutos a 37°C en ausencia de luz. Transcurrido el tiempo, se procedió a la lectura fluorimétrica en una placa de 96 pocillos con 100 μL de la mezcla anterior, a una λ excitación de 485 nm y una de λ emisión de 530nm (**Figura 20**) en un equipo de fluorimetría (TECAN infinite M200).

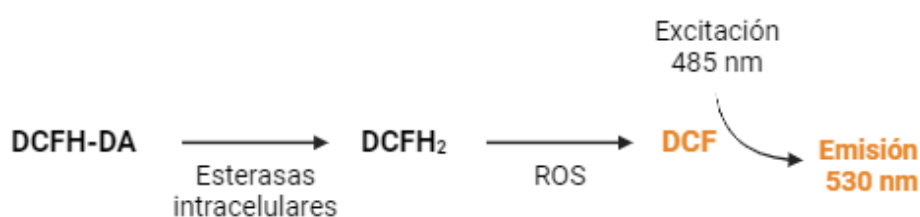


Figura 20. Esquema representativo de la activación de la sonda DCFH-DA para la determinación de ROS intracelulares. El compuesto DCFH-DA en presencia de esterasas intracelulares se convierte en DCFH₂, el cual, ante la presencia de radicales libres de oxígeno se oxida formando el compuesto DCF que emite fluorescencia tras ser excitado. Creado con: BioRender.com.

9. Determinación de la actividad Caspasa 3.

Para analizar los niveles de actividad de caspasa 3 en muestras de tejido hepático se partió de 250 mg de tejido machacado en hielo seco, posteriormente se resuspendió con 300 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 5 mM a pH 8, EDTA 20 mM, 0,5% Tritón 100X, H₂O ultrapura estéril), se sometió a sonicación a 3.5 mA durante 1 minuto y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Del sobrenadante se retiró una porción para valorar la concentración de proteínas y la otra se conservó a -80°C hasta su posterior utilización.

Para cada condición, se preparó la siguiente mezcla de reacción: 325 µl de tampón de ensayo (Hepes 20 mM pH 7.5, 10% glicerol, 2% DTT añadido de forma extemporánea en H₂O ultrapura estéril); 5 µl de sustrato cromogénico Caspasa 3 (BD Pharmigen) resuspendido en DMSO y 25 µl del extracto proteico de cada condición de estudio. Se incubó durante 1h a 37°C en ausencia de luz. Pasado ese tiempo, se tomaron 200 µl de cada mezcla de reacción en una placa de 96 pocillos, por duplicado, para la lectura fluorimétrica, con λ excitación de 380nm y λ emisión de 440nm.

Para analizar los niveles de caspasa 3 en células de cultivo *in vitro* se partió de 2 placas de 6 cm (con 250.000-275.000 células por placa), tras realizar los tratamientos oportunos, el medio de cultivo se centrifugó a 750 x g durante 5 minutos a 4°C. Paralelamente, se rascaron los platos con PBS 1X frío, se centrifugaron a 750 x g durante 5 minutos a 4°C. El precipitado resultante de ambas centrifugaciones fue resuspendido con 100 µl de PBS 1X frío, se volvió a centrifugar a 750 x g durante 5 minutos a 4°C. El precipitado resultante se resuspendió en 55 µl de tampón de lisis (descrito anteriormente), se incubó en hielo durante 10 minutos, y se agitó vigorosamente en agitador magnético tipo vórtex. Del sobrenadante, se reservó una porción para valorar la concentración de proteínas y la otra parte se empleó en realizar el ensayo tal y como se detalla en el en el párrafo anterior.

10. Determinación de los niveles de glutatión intracelular.

10.1 Niveles de glutatión intracelular total.

Para analizar los niveles totales de glutatión (GSH + GSSG) intracelular se empleó el método de Griffith modificado (1980), basado en la reacción continua de óxido-reducción del glutatión intracelular en presencia del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), NADPH y la enzima glutatión reductasa, monitorizando el cambio de absorbancia a 412nm. El ensayo en líneas celulares *in vitro* se realizó a partir de 2 placas de 10cm de diámetro (con 1 y 1,5 millones de células por plato). Tras el tratamiento, se recogió el medio de cultivo y se centrifugó a 750 x g durante 5 minutos a 4°C. Las células adheridas al plato se rascaron con espátula en 500 µl en PBS 1X frío. En este punto se juntó el contenido de la placa rascada con el precipitado resultante de centrifugar el medio de cultivo, y nuevamente se volvió a centrifugar a 10.000 x g durante 5 minutos. Este precipitado fue resuspendido en 300 µl de tampón de lisis (Tritón 100X al 0,2%) y las

muestras se agitaron vigorosamente en un agitador magnético de tipo vórtex en dos intervalos sucesivos de 30 segundos. Una parte del homogeneizado obtenido fue reservado para valorar la concentración de proteínas, el resto fue sometido a precipitación de proteínas mediante la adición de 17,5 µl de una solución de ácido sulfosalicílico (concentración final de 2,5%). Las muestras de este modo preparadas se sometieron a centrifugación a 15.700 x g durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

La medida del glutatión total se realizaba espectrofotométricamente (Hitachi UV-2000 Spectrophotometer) atendiendo a la siguiente reacción química (Figura 21):

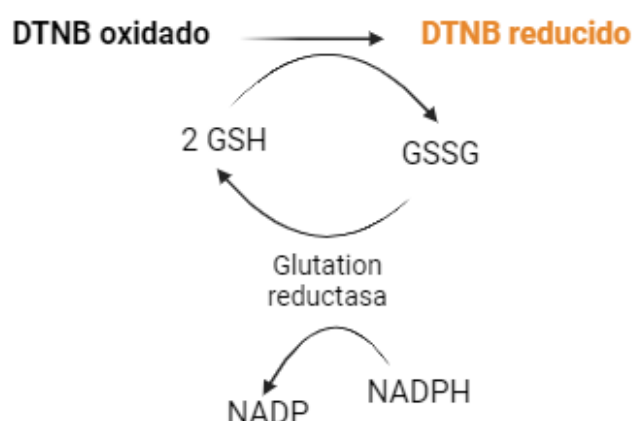


Figura 21. Esquema representativo de la reducción de DTNB para la determinación de glutatión intracelular. El compuesto DTNB en presencia de glutatión reducido, se reduce dando lugar al DTNB reducido que puede detectarse espectrofotométricamente a 420 nm. Para ello se acopla a la oxidación del glutatión mediada por la glutatión reductasa en presencia del cofactor NADPH. Creado con: BioRender.com.

Para llevar a cabo la reacción, en una cubeta se añadió 1ml de tampón de reacción (0,1 mM DNTB, 0,15 mM NADPH, 1 mM EDTA y 0,05 M de tampón fosfato pH 7,5) y 50 µl del extracto proteico obtenido como se indicó anteriormente, ajustando a cero el espectrofotómetro. Tras ello se añadió 1 µl de enzima glutatión reductasa, se agitó manualmente y se inició la lectura espectrofotométrica a una λ de 412nm durante 120 segundos. Después de esta primera lectura se añadió a esta misma cubeta una concentración de glutatión reducido conocida (2 µl de una solución 0,5 mM para obtener una concentración final en la cubeta de 1 µM) actuando de esta forma como patrón interno. Tras esta segunda medida, se procedió a realizar el cálculo para conocer la cantidad de glutatión total en la muestra, teniendo en cuenta la absorbancia obtenida del patrón interno y aplicando la siguiente fórmula matemática:

$$\begin{aligned} \Delta\text{Abs}/\text{min} \text{ debida al glutatión añadido} & \text{-----} 1 \mu\text{mol Glutatión} \\ \Delta\text{Abs}/\text{min} \text{ debida al glutatión presente en la muestra} & \text{-----} X \mu\text{mol Glutatión} \end{aligned}$$

Tras este cálculo, el valor de glutatión obtenido en cada muestra se corregía por la concentración de proteína obtenida en cada extracto. El valor final era expresado en picomol de glutatión/ μg de proteína, para posteriormente expresarlo como porcentaje respecto del control (células incubadas en ausencia de factores).

El protocolo que se llevó a cabo en muestras de tejido hepático es el siguiente: se partía de 250 mg de tejido machacado en hielo seco y extraído con 350 μl de tampón de lisis. Se homogeneizó mediante sonicación a 3.5 mA durante 1 minuto. Posteriormente se centrifugó a 15.700 x g durante 10 minutos a 4°C. Se guardó una parte para valorar la concentración de proteínas y otra parte se almacenó a -80°C hasta su posterior lectura. El ensayo, a partir de aquí, se realizó de la misma forma descrita en el protocolo *in vitro*.

10.2 Niveles de glutatión reducido (GSH) intracelular.

Para la determinación de la concentración de GSH en muestras de tejido hepático, primero se procedió a la preparación de los extractos homogeneizados según el protocolo descrito por Hissin and Hilf (1976). Se partió de 250 mg de tejido machacado en mortero con hielo seco, se añadió 3,75 ml de tampón fosfato-EDTA (0.1 M fosfato de sodio; 0.005 M de EDTA, pH 8) y 1 ml de HPO_3 al 25%. Se homogeneizó mediante sonicación a 3.5 mA durante 1 minuto. Posteriormente se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos, tras ello se recogió el sobrenadante, guardando una parte de la muestra para valoración de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford y el resto quedó conservado a -80°C hasta su posterior análisis.

Para determinar la concentración de GSH se empleó el método descrito por Cohn y Lyle (1980). Se partió de 100 μl del sobrenadante procedente de la extracción junto con 1,8 ml de tampón fosfato-EDTA y 100 μl de solución σ -Ftaldialdehído abreviado de sus siglas en inglés como OPT (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos en ausencia de luz, para posteriormente realizar una lectura fluorimétrica en cubeta de cuarzo con una λ excitación de 350 nm y λ emisión de 420 nm.

Paralelamente se generó una recta patrón con una solución de GSH a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 0 hasta 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ajustando el volumen a cada pocillo de la recta con tampón fosfato-EDTA y añadiendo 20 μl de OPT. La concentración de GSH de las muestras se obtuvo extrapolando los valores obtenidos en la recta empleada como patrón. El valor final era expresado en pg de GSH/ μg de proteína, para posteriormente expresarlo como porcentaje respecto del control.

10.3 Niveles de glutatión oxidado (GSSG) intracelular.

Para la determinación de la concentración de GSSG en muestras de tejido hepático, se partió de los extractos homogeneizados según el protocolo descrito por Hissin and Hilf

(1976) mostrado en el apartado 10.2. Los extractos (500 µl) se mezclaron con 200 µl de N-etilmaleimida, (NEM) al 0.04 M. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo se añadieron 4,3 ml de NaOH 0.1 N. De esta nueva solución se tomaron 100 µl, que se añadieron a 100 µl de NaOH 0,1 N y 20 µl de OPT (1 µg/µl). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos en ausencia de luz, para posteriormente realizar una lectura fluorimétrica en cubeta de cuarzo con una λ de excitación de 350 nm y una λ de emisión de 420 nm.

Paralelamente se hizo una recta patrón con una solución de GSSG a 2 µg/ml, de 0 hasta 200 µg/ml, ajustando el volumen a cada pocillo de la recta con tampón fosfato-EDTA y añadiendo 20 µl de OPT. La concentración de GSSG de las muestras se obtuvo extrapolando los valores obtenidos en la recta empleada como patrón. El valor final era expresado en pg de GSSG/µg de proteína, para posteriormente expresarlo como porcentaje respecto del control.

11. Determinación de actividades de enzimas antioxidantes.

11.1 Obtención de los extractos proteicos.

Se empleó el método de obtención del extracto proteico descrito por Ellerby y colaboradores (2000) para la determinación de las diferentes actividades enzimáticas. Se usaron diez millones de hepatocitos (dos placas de 10 cm de diámetro con 5 millones de células/placa) y tratados con los diferentes factores. Posteriormente, las células fueron recogidas mediante rascado de la placa en 500 µl de PBS 1X en hielo y se centrifugaron a 750 x *g* durante 1 minuto. Retirado el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 500 µl de tampón de lisis (fosfato sódico 50mM, Tritón X-100 al 0,5%, pH 7,5), y sometidas a sonicación a 2 mA durante 30 segundos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000 x *g* durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante para almacenarlo a -80°C hasta su posterior utilización. Paralelamente, se determinó la concentración de proteínas de los extractos obtenidos mediante el método de Bradford.

Para la determinación de las actividades enzimáticas en tejido hepático se partió de la cantidad de 250 mg de muestra congelada, machacada en mortero con hielo seco y resuspendido en 500 µl de tampón de lisis, sometido a sonicación a 3.5 mA durante 30 segundos, dos veces. Tras este procedimiento, se centrifugó tal y como se describe para la obtención del extracto a partir de cultivo celular.

11.2 Actividad enzimática de glutatión reductasa.

La medida de la actividad de la glutatión reductasa en los extractos proteicos se realizó mediante el seguimiento espectrofotométrico de la oxidación del NADPH a una λ de 340nm, según el método descrito por Ellerby y Bredesen (2000) modificado. Para esta

determinación se añadía en una cubeta de cuarzo: 700 µl de tampón fosfato/EDTA (22 mM Na₂HPO₄; 6 mM NaH₂PO₄; 3 mM EDTA; pH de 7,5), 50 µl de NADPH 4 mM, 170 µl de KCl 1,2 M y 50 µl de glutatión oxidado 10 mM.

Tras ajustar el espectrofotómetro a cero, la reacción se iniciaba añadiendo 50 µl de extracto de proteínas en la cubeta analizando los cambios de absorbancia a 340nm durante 3 minutos. Todos los reactivos y los extractos proteicos se mantuvieron en hielo hasta el inicio de la lectura en el equipo. Cada determinación se realizó por duplicado.

La actividad enzimática específica de la enzima glutatión reductasa se calculó con la siguiente fórmula matemática, usando los datos obtenidos:

$$\Delta E \text{ específica} = \frac{\left(\frac{Abs' - Abs}{t' - t}\right) \times \text{volumen de ensayo (mL)}}{\epsilon \times b}$$

ΔE específica: actividad enzimática específica, *Abs*: absorbancia, *t*: tiempo (minutos), ϵ : coeficiente de extinción molar (M⁻¹ x cm⁻¹), *b*: distancia cubeta (cm). Siendo ϵ NADPH = 6,22 x 10³ M⁻¹ x cm⁻¹ a 340 nm.

La actividad enzimática específica se expresó respecto a la concentración de proteínas de cada extracto, para posteriormente expresarlo como porcentaje respecto del control.

11.3 Actividad enzimática de catalasa.

La medida de la actividad catalasa en los extractos proteicos se realizaba mediante la monitorización espectrofotométrica de la desaparición de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una λ de 240nm según el protocolo descrito por Luck y colaboradores (1965).

Para esta determinación se añadía en una cubeta de cuarzo: 900 µl tampón fosfato 50 mM, pH 7, atemperado a 37°C y 100 µl de solución de H₂O₂ 100 mM, (concentración final en la cubeta: 10 mM).

Tras ajustar a cero, la reacción se inicia al añadir 10 µl de extracto proteico, monitorizando los cambios en la absorbancia a una λ de 240 nm, durante un total de 3 minutos, anotándose los valores cada 20 segundos.

La actividad enzimática específica de la enzima catalasa se calculó con la siguiente fórmula matemática, usando los datos obtenidos:

$$\Delta E \text{ específica} = \frac{\left(\frac{Abs' - Abs}{t' - t}\right) \times \text{volumen de ensayo (mL)}}{\epsilon \times b}$$

ΔE específica: actividad enzimática específica, *Abs*: absorbancia, *t*: tiempo (minutos), ϵ : coeficiente de extinción molar (M⁻¹ x cm⁻¹), *b*: distancia cubeta (cm). Siendo ϵ H₂O₂ = 0,436 x 10² M⁻¹ x cm⁻¹ a 240 nm.

Como en el caso anterior, la actividad enzimática específica se expresó respecto a la concentración de proteínas de cada extracto, para posteriormente expresarlo como porcentaje respecto del control.

11.4 Actividad enzimática de superóxido dismutasa.

La medida de la actividad superóxido dismutasa en los extractos proteicos se realizaba mediante la monitorización espectrofotométrica de la inhibición de la autooxidación de la 6-hidroxi-dopamina a una λ de 490 nm según el protocolo descrito por Heikkila (1976). La enzima superóxido dismutasa inhibe la autooxidación de la 6-hidroxi-dopamina consumiendo superóxido generado en la reacción, aprovechándose este proceso para la determinación de su actividad enzimática. De esta forma, cuanto mayor sea la actividad de la enzima, mayor será el porcentaje de inhibición de la autooxidación de la 6-hidroxi-dopamina.

La preparación de la solución de 6-hidroxi-dopamina se realizó de forma extemporánea, en 10 ml de agua ultrapura estéril y 60 μ l de HClO_4 al 60%, gaseado con N_2 durante 20-25 minutos, junto con la adición de 6-hidroxi-dopamina para una concentración final de 0,01 M. Una vez preparada, la solución se mantuvo en hielo y protegida de la luz.

En una cubeta se añadió: 1 ml de tampón de reacción (50 mM de fosfato sódico, 0,1 mM ácido dietiltri-aminopentaacético, pH 7,4) atemperado a 37°C, y 15 μ l de la solución de 6-hidroxi-dopamina 0,01 M.

La lectura espectrofotométrica se realizó a $\lambda = 490$ nm, tras realizar el ajuste a cero. En primer lugar, se realizó la medida de la autooxidación de la 6-hidroxi-dopamina hasta que la cinética fuera lineal durante 1 minuto. A continuación, se añadió 10 μ g de proteína procedentes del extracto proteico a la mezcla de reacción y se procedió a la lectura espectrofotométrica.

La expresión final de los resultados se muestra como porcentaje de inhibición de la autooxidación de la 6-hidroxi-dopamina que lograrían 10 μ g de proteína del extracto, y posteriormente se calcula el porcentaje respecto de la condición control.

12. Determinación de los niveles de proteínas carboniladas.

Para la determinación de los niveles de proteínas carboniladas, se emplearon los extractos proteicos obtenidos según la descripción en el apartado 11.1 y previamente valorada su concentración de proteína. Se partió de 150 μ g de proteína a los cuales se les añadió 4 volúmenes de NADPH 10 mM y se incubó en hielo y ausencia de luz durante 60 minutos (agitando manualmente cada 15 minutos para favorecer la reacción entre los grupos carbonilo y el NADPH). A continuación, se añadió 1 volumen de ácido tricloroacético al 20% y se mantuvo en hielo durante 10 minutos adicionales. Tras este paso, se centrifugó a 7.500 x g durante 10 minutos para obtener el precipitado proteico, el cual se lavó tres veces con una solución de etanol: acetato de etilo (1:1).

Posteriormente, se resuspendió el precipitado en 500 μ l de guanidina 6 M. Para la lectura espectrofotométrica se empleó una placa de 96 pocillos donde se incluyeron 200

µl de cada muestra de proteínas solubilizadas y se hizo una lectura a $\lambda = 360$ nm en un lector automático de placas (Powerwave XS, Biotek). El valor de absorbancia obtenido de los grupos carbonilo en las muestras estudiadas se corrigió mediante la lectura del blanco (muestra con proteína sin NADPH), realizado paralelamente con cada muestra. Finalmente se aplicó la siguiente fórmula con el coeficiente de extinción molar (ϵ) $3,53 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 360 nm para NADPH.

$$\text{nmol/mg de proteína} = \left[\frac{\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}}{\epsilon \times b} \right] / \text{mg de proteína}$$

Abs: absorbancia, ϵ : coeficiente de extinción molar ($\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), b : distancia cubeta (cm).

13. Análisis transcriptómico mediante la tecnología MACE (*Massive Analysis of cDNA Ends*).

En primer lugar, se realizó la extracción de ARN total de los diferentes tipos celulares (líneas de CPH/OC tratadas o no con HGF) que se realizó mediante el protocolo descrito en el apartado 4.1. Para estudiar los cambios a nivel transcripcional, se empleó la técnica de análisis masivo de los extremos del ADNc (*Massive Analysis of cDNA Ends*) que es una variante mejorada de la técnica de secuenciación de extremos 3' de ARNm (*3' single end mRNA Seq*) o Tag-Seq, que permite estudiar con alta resolución los transcritos de expresión baja y media, que son generalmente indetectables mediante microarrays y otras técnicas convencionales de RNA-seq. El ensayo se basa en el análisis de un solo fragmento de ADNc por molécula-transcrito (ya que se marca con una secuencia única o *tag* en el extremo 3' del ANRm) tras someter el ADNc a fragmentación, posterior secuenciación, cuantificación y comparación con bases de datos de referencia (**Figura 22**). Para ello, una población de ADNc se ancla a una matriz de estreptavidina por el extremo 3'-biotina. Los ADNc se rompen en fragmentos de tamaño comprendido entre 50-500 pb y los fragmentos no anclados se descartan. Los ADNc son secuenciados por secuenciación de última generación (NGS) empezando por el sitio de fragmentación, generando "tags" de 50 a 500 pb. Las secuencias (tags) son ensambladas en lecturas extendidas (*contigs*), de manera que todas las secuencias se pueden anotar a entradas de bases de datos y cuantificar. La técnica fue realizada en un laboratorio externo (GenXPro GmbH, Alemania). Con la plataforma bioinformática Galaxy genetics®, se procedió al cribado de genes que se modulaban de forma significativa (criterios de Log2Foldchange < -1 o > 1 , con un p valor $< 0,05$) en las condiciones estudiadas, y la plataforma GeneOntology resource-PANTHER®, se usó con el fin de revisar las rutas biológicas donde están implicados y su función.

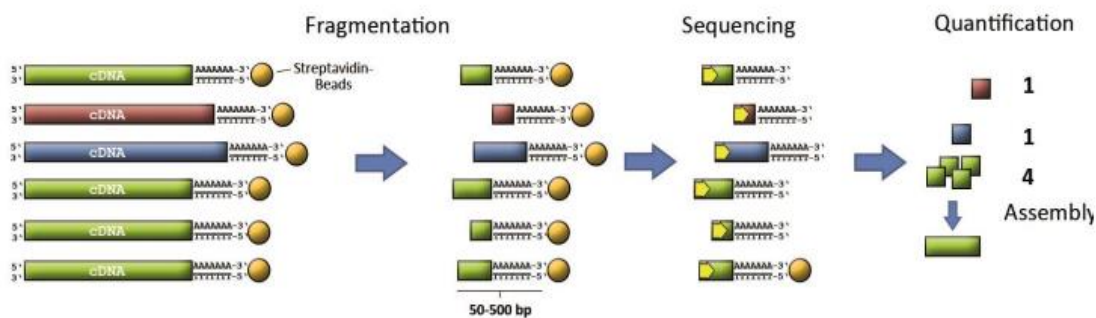


Figura 22. Esquema representativo del análisis transcriptómico por MACE. Esquema aportado por la casa comercial GenXPro GmbH®.

14. Estudio estadístico.

Los resultados se han expresado como la media aritmética de valores de entre 2-6 experimentos independientes *in vitro* o 3-5 animales por condición y su error estándar de la media (S.E.M). Cuando sólo se ha mostrado un experimento, los datos se han representado como el valor medio \pm desviación estándar (S.D). Se comprobó la normalidad de los datos con la prueba de Saphiro-Wilk. Cuando los datos mostraron una distribución normal, se utilizó la prueba t de Student desapareada paramétrica para la comparación de 2 grupos experimentales independientes, y el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni para la comparación de más de 2 grupos. Cuando los datos no mostraron una distribución normal y en variables ordinales, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para la comparación de 2 grupos experimentales independientes, seguida de la corrección de Monte Carlo, y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar más de 2 grupos experimentales, seguida de una prueba de comparación múltiple de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Para todos los análisis, los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos y se indicaron en cada figura. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 8.





RESULTADOS



1. La sobreexpresión de Met reduce el daño hepático durante la colestasis.

Estudios realizados en modelos animales deficientes de Met en hepatocitos han evidenciado un efecto protector para esta ruta de señalización en un contexto de daño hepático colestásico inducido por ligadura del conducto biliar (Giebeler A. et al, 2009). Asimismo, la pérdida de Met agrava la lipotoxicidad y el daño colestásico provocados por una dieta aterogénica (2% colesterol, 0,5% colato sódico) (Gómez-Quiroz L. E., et al, 2016). Con estos antecedentes, y dada la importancia de esta vía en regeneración hepática (Zhao Y., 2022), consideramos que sería interesante y útil analizar la respuesta de ratones transgénicos con sobreexpresión del receptor Met en el hígado (Tg Met) (Fan Y. et al., 2017), frente a un daño colestásico, para ayudar a comprender mejor la implicación de la vía de HGF/Met en este contexto. Como se describe en la sección de metodología, es importante resaltar que este modelo se caracteriza por una sobreexpresión moderada de Met, en niveles aproximadamente 2-3 veces superiores a los endógenos, en hepatocitos, como principales células que expresan albúmina (gen cuyo promotor se ha usado para inducir el transgén). Como modelo de daño colestásico se decidió someter a ratones Wt y Tg Met a tratamiento con una dieta suplementada con DDC durante 2 y 6 semanas (ver métodos para más detalles).

1.1 La sobreexpresión de Met reduce el daño hepático en ratones sometidos a dieta DDC.

Primeramente, se validó el modelo experimental (ratón y hepatocitos transgénicos de Met).

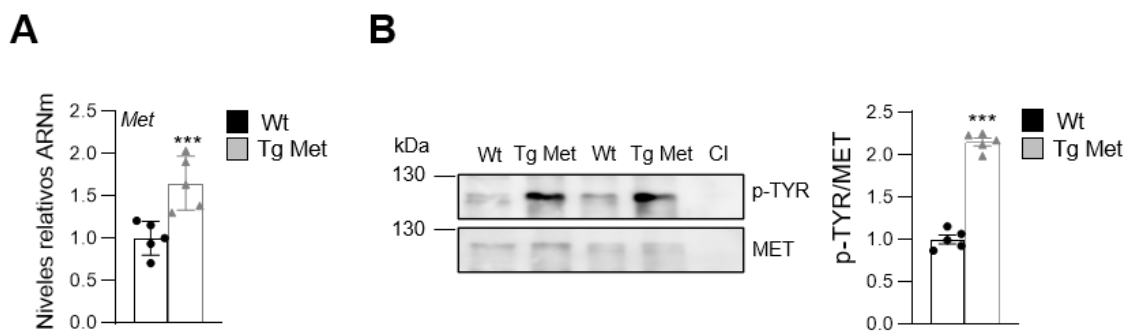


Figura 23. Análisis de los niveles de Met en hígados de ratones Wt y Tg Met. **A.** Niveles de ARNm de Met analizados por RT-qPCR en hígados de ratones Wt y Tg Met. Datos de 5 ratones por grupo (media \pm S.E.M.). **B.** Extractos proteicos de hígados de ratones Wt y Tg Met fueron usados para la inmunoprecipitación de Met mediante un anticuerpo específico frente a MET total. La fosforilación fue detectada mediante inmunoblot con anticuerpo anti-P-tirosina (P-TYR). El western blot de MET fue empleado como control de carga. Se empleó como control interno negativo (CI) el extracto proteico sin previa inmunoprecipitación con el anticuerpo primario frente a MET total. Se muestra un experimento representativo (panel izquierdo) y el análisis cuantitativo (panel derecho). Se representa la media \pm S.E.M. (n= 3-5). *** = p < 0,001.

Para ello, se analizaron los niveles de expresión de Met en el hígado de los ratones Wt y Tg Met con el fin de confirmar la sobreexpresión de este receptor. De este modo se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de ARNm de Met, y nuestros resultados muestran que los niveles de Met en los tejidos hepáticos procedentes de ratones Tg Met son moderada pero significativamente mayores que los de ratones Wt en condiciones basales (**Figura 23A**).

Además, se decidió realizar una inmunoprecipitación de MET para evaluar la fosforilación del receptor por western blot mediante el anticuerpo anti-fosfotirosina (P-TYR). En la **figura 23B**, se puede observar la existencia de diferencias significativas entre hígados de ratones Wt y Tg Met, indicando una mayor activación de la vía HGF/Met en los hígados de los ratones Tg Met en comparación con los Wt. Paralelamente, se confirmó la presencia del transgén de Met en hepatocitos inmortalizados procedentes de ratones Wt y Tg Met. Para ello, se realizaron varios abordajes: por una parte, se realizó una PCR para detectar la presencia del transgén Met. Se amplificaron dos fragmentos, el fragmento *LoxP1-Met3* correspondiente a una secuencia de tamaño 486 pb presente exclusivamente en células Tg Met, que indica

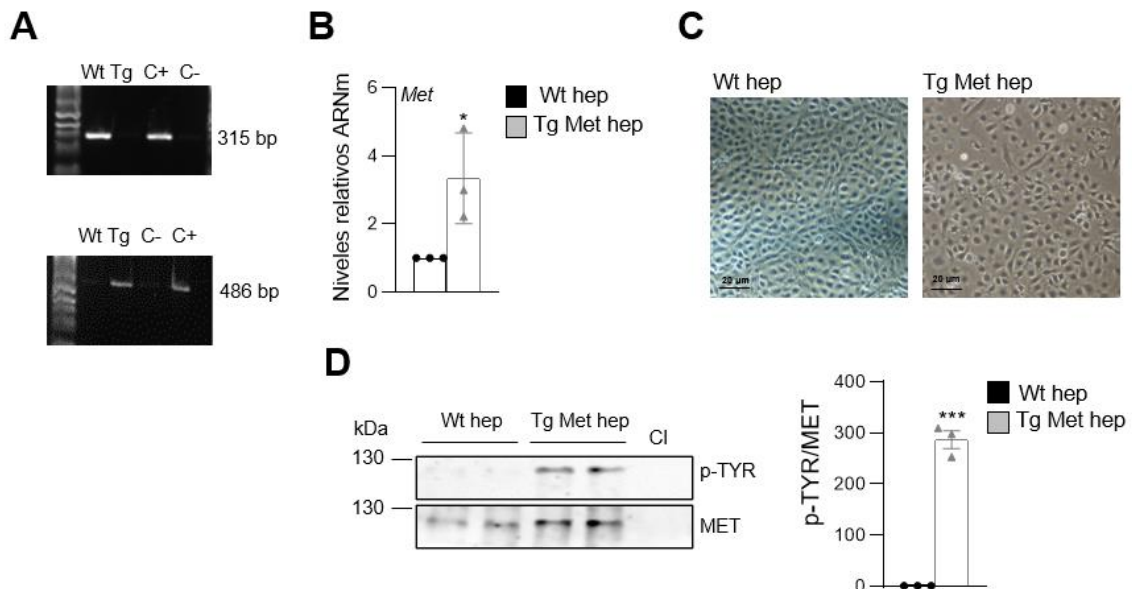


Figura 24. Análisis de los niveles totales y de activación de Met en hepatocitos Wt y Tg Met. Se usaron hepatocitos inmortalizados en cultivo, procedentes de hígados de ratones Wt y Tg Met. **A.** Análisis de la presencia de las secuencias correspondientes al gen *LacZ* (fragmento de 315 bp, *base pair*; imagen superior) y el fragmento *LoxP1-Met3* (fragmento de 486 bp; imagen inferior) en hepatocitos Wt y Tg Met. C+: control positivo, ADN genómico extraído de células progenitoras hepáticas Wt y Tg Met previamente validadas; C-: control negativo (empleando agua en lugar de ADN genómico). **B.** Niveles de ARNm de Met analizados por RT-qPCR en hepatocitos Wt y Tg Met. Datos de 3 experimentos independientes (media ± S.E.M.). **C.** Imágenes de microscopía óptica de campo claro de hepatocitos Wt y Tg Met en cultivo previa tinción con X-gal. Fotos representativas en aumento 20X. Barra de escala: 20 μ m. **D.** Extractos proteicos de hepatocitos Wt y Tg Met fueron usados para la inmunoprecipitación de Met con un anticuerpo específico frente a Met total. La fosforilación fue detectada mediante inmunoblot con anticuerpo anti-P-tirosina (P-TYR). El western blot de Met fue empleado como control de carga. Se empleó como control interno negativo (CI) el extracto proteico sin previa inmunoprecipitación con el anticuerpo primario frente a MET total. Se muestra un experimento representativo (panel

izquierdo) y el análisis cuantitativo (panel derecho). Se representa la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

que la *Cre* recombinasa ha actuado; y un fragmento correspondiente al gen *LacZ* de tamaño 315 pb, secuencia que está presente exclusivamente en células Wt, e indica que la recombinasa no ha actuado (**Figura 24A**).

Asimismo, se realizó un análisis de los niveles de ARNm de Met que muestra que los hepatocitos Tg Met presentan mayores niveles de expresión de Met que los Wt (**Figura 24B**). Este análisis se complementó con una tinción usando X-gal, un sustrato cromogénico que tiñe de color azul el interior celular cuando se expresa la enzima β -galactosidasa codificada por el gen *LacZ*. En la **figura 24C** se puede observar cómo los hepatocitos Wt adquieren coloración azulada al expresar la β -galactosidasa dado que la recombinasa no ha actuado, y ausencia de coloración en los hepatocitos Tg Met, en los cuales la recombinasa sí ha actuado. Adicionalmente, se realizó una inmunoprecipitación de MET para ver la activación de Met de forma basal mediante el análisis de P-TYR (**Figura 24D**), y se observó que los hepatocitos Tg Met presentan unos mayores niveles del receptor fosforilado que los hepatocitos Wt.

Por último, se analizó la respuesta al HGF en hepatocitos Wt y Tg Met. Los hepatocitos fueron tratados con HGF a una concentración de 40 ng/ml durante 10, 30 y 60 minutos. Se incluyeron hepatocitos cultivados en condiciones basales, es decir, en medio con 10% FBS, sin tratamiento con el factor. Tal y cómo se muestra en la **figura 25**, en los hepatocitos Tg Met, la fosforilación del receptor Met se produce de forma temprana (10 min) y más marcada que en células Wt. En consonancia con esto, la fosforilación de ERK/MAPKs, una ruta activada por Met (Fan Y. et al., 2017) está acentuada en los hepatocitos Tg Met a los tiempos estudiados.

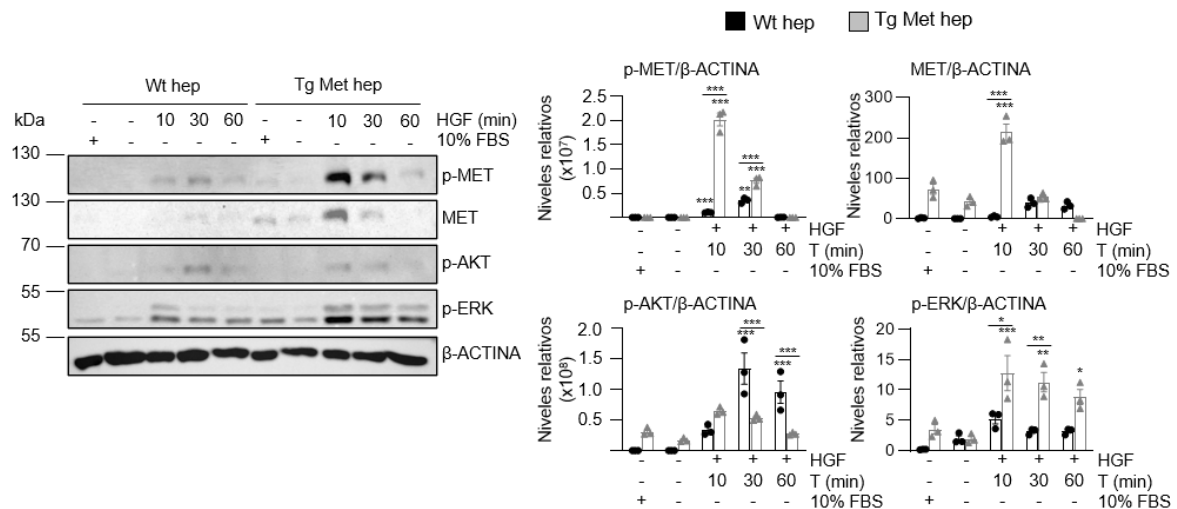


Figura 25. Análisis de la señalización de la vía HGF/Met en hepatocitos Wt y Tg Met. Niveles de Met total y fosforilado (p-Met), P-AKT y P-ERK en hepatocitos Wt y Tg Met tratados con HGF (40 ng/ml) a diferentes tiempos. Se muestra un experimento representativo (panel izquierdo) y el análisis cuantitativo (panel derecho). T: tiempo de tratamiento. Se representa la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. Los datos fueron comparados respecto del control sin tratamiento o según se indica en la figura. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Sin embargo, contrariamente a lo esperado, los niveles de P-AKT no siguen esta tendencia, encontrándose mayores niveles en las células Wt que en las Tg Met. Por otro lado, se puede apreciar de forma basal (sin tratamiento con HGF) en los hepatocitos Tg Met tanto en ausencia como en presencia de 10% FBS, niveles detectables de fosforilación de Met. Por tanto, en conjunto, estos datos ponen de manifiesto mayores niveles de expresión de Met, que resultan en una mayor activación del receptor, tanto de forma basal, como en respuesta a HGF, en el modelo transgénico de Met, tanto *in vivo* (tejido hepático) como *in vitro* (hepatocitos en cultivo).

Una vez validado el modelo experimental (tanto el modelo de ratón, *in vivo*, como el modelo celular, *in vitro*, derivado del anterior), se analizó el efecto de la dieta DDC en ratones Wt y Tg Met. La dieta DDC está ampliamente empleada como modelo de daño hepático colestático (Preisegger K. H. et al., 1999). La alimentación suplementada con 0,1 % de 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) se ha propuesto como un modelo *in vivo* para la enfermedad colestásica debido a la formación de tapones de porfirina intraductales. La alimentación crónica con DDC en ratones reproduce las principales características histopatológicas de la enfermedad colestásica humana, con remodelación de los compartimentos biliares que da lugar a una reacción ductular, fibrosis periductular e infiltrado inflamatorio (Fickert P. et al, 2010). Se analizaron los sueros de los ratones Wt y Tg Met tras tratamiento con la dieta DDC para estudiar marcadores séricos de daño colestático. Durante la colestasis, aumentan los valores en suero de bilirrubina total, fosfatasa alcalina, AST y ALT, como consecuencia del fracaso en la actividad habitual del hígado y de la aparición de daño en el tejido (EASL Clinical Practice Guidelines, 2009).

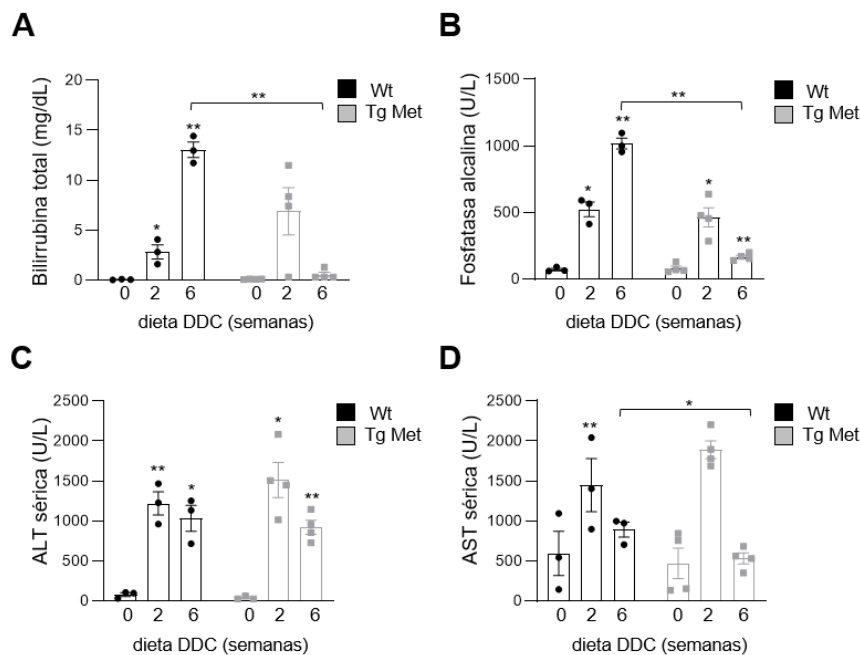


Figura 26. Análisis de marcadores séricos de daño hepático en ratones Wt y Tg Met tratados con una dieta DDC. Niveles de bilirrubina total (A), fosfatasa alcalina (B), ALT (C) y AST (D) en ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas de dieta DDC. Los datos representan la media \pm S.E.M. (n= 3-5). Los datos fueron comparados respecto del control no tratado con DDC o según se indica en la figura * = p < 0,05; ** = p < 0,01.

Ante una destrucción de células del parénquima hepático se liberan al suero las transaminasas AST y ALT, que en condiciones normales tendrían una localización intracelular, incrementando por tanto sus niveles circulantes. La obstrucción biliar durante el proceso de colestasis conlleva asimismo un aumento de los niveles séricos de fosfatasa alcalina. La bilirrubina total aumenta también debido a la falta de liberación y la alteración del metabolismo en el hígado dañado (Kwo P.Y., 2017). Tras 6 semanas de dieta DDC, se pueden observar diferencias significativas entre los ratones Wt y Tg Met, de forma que los ratones Tg Met tienen unos valores de bilirrubina total, fosfatasa alcalina y AST menores que los de ratones Wt, datos compatibles con un menor daño hepático. En el caso de la ALT, los valores no muestran diferencias significativas entre los dos genotipos (**Figura 26**).

Adicionalmente, se analizaron los pesos de los hígados y de los ratones con el fin de buscar diferencias entre los diferentes grupos experimentales en respuesta a la dieta colestásica. El análisis de la relación peso hígado/peso animal puede emplearse como un indicador de daño en el hígado, ya que existe una pérdida del volumen celular durante un daño (Kumamoto R. et al., 2013). Tal y como puede observarse en la **figura 27**, a 6 semanas de dieta DDC, la ratio peso del hígado respecto del peso corporal es mayor en ratones Tg Met. El análisis individual del peso del hígado y corporal reflejan una pérdida de peso corporal en los ratones Wt que no se observa en los Tg Met. Además, los ratones Tg Met muestran un claro aumento en el peso del hígado que no se ve en los Wt, probablemente debido a una mayor destrucción de tejido inducida por el daño colestásico. De forma global, estos datos podrían ser consistentes con un menor daño, y/o una repuesta regenerativa más eficaz (Cienfuegos J. A. et al., 2014) en los ratones Tg Met.

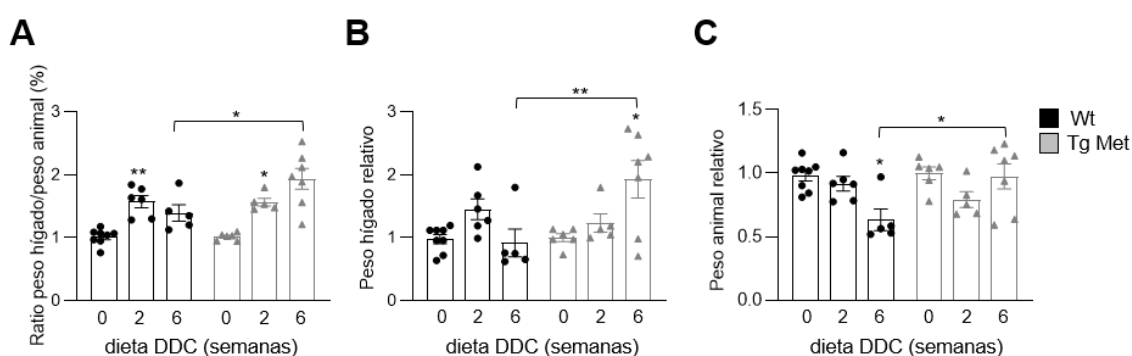


Figura 27. Análisis del peso del hígado y corporal y su relación en ratones Wt y Tg Met sometidos a una dieta DDC. (A) Relación peso del hígado frente al peso total del cuerpo (Ratio hígado/peso animal); **(B)** peso del hígado; y **(C)** peso del animal, analizados en ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas con dieta DDC. Datos de entre 5 y 7 ratones por grupo experimental (media \pm S.E.M.). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ respecto de su control no tratado con DDC.

Durante un daño hepático colestásico crónico puede aparecer fibrosis derivada de un proceso de lesión tisular mantenido en el tiempo (Pose E., 2019). En este contexto se liberan factores profibróticos como TGF- β , PDGF y VEGF, que contribuirán al depósito de fibras de colágeno y a la remodelación de la matriz extracelular.

De este modo, se decidió estudiar los niveles de expresión génica y/o proteica de componentes esenciales de la matriz (COL1A1), y reguladores conocidos del proceso fibrótico hepático, como la MMP9, una de las principales metaloproteinasas implicadas en remodelación de matriz extracelular (Tsomidis I. et al., 2022) y su inhibidor *Timp-1*; el activador tisular de plasminógeno tPA (*tissue-type plasminogen activator*, codificado

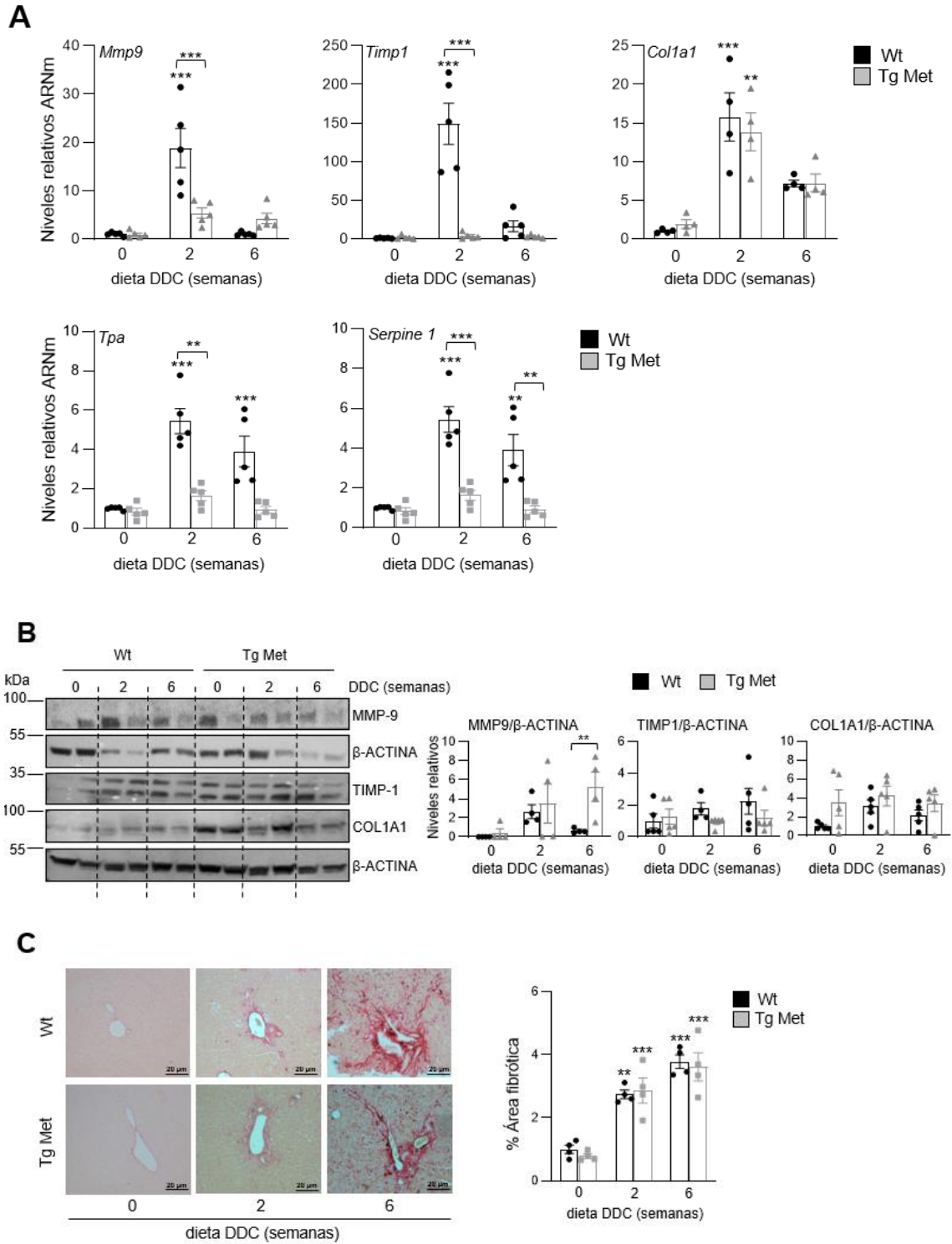


Figura 28. Análisis de la fibrosis hepática en hígados de ratones Wt y Tg Met sometidos a una dieta DDC. A. Niveles de expresión de *Mmp9*, *Timp-1*, *Col1A1*, *Tpa* y *Serpine 1* analizados

por RT-qPCR en ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas en dieta DDC. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Se representa la media \pm S.E.M. (n=3-5). **B.** Niveles de proteína de MMP9, TIMP-1 y COL1A1 medidos mediante western blot en extractos proteicos de hígados de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas con dieta DDC. Se usó β -ACTINA como control de carga. Se muestra un experimento representativo (panel izquierdo) y el análisis cuantitativo por densitometría (panel derecho) correspondiente a datos de 5 ratones por grupo (media \pm S.E.M.). **C.** Análisis de los niveles de colágeno mediante tinción con *Sirius Red* en cortes de tejido hepático de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas con dieta DDC. Se muestran imágenes de microscopía representativas. Barra de escala: 20 μ m. Aumento: 20X (panel izquierdo). Se midió el área fibrótica (panel derecho) usando el software Image J, en 10 regiones periportales por animal. Los datos se expresan como % promedio del área fibrótica y son la media \pm S.E.M. (n=3-5). ** = p < 0,01; *** = p < 0,001 respecto de su control no tratado con DDC o como se indica.

por el gen *Tpa* y su inhibidor PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor-1*), codificado por el gen *Serpine 1*, que también se han relacionado con el proceso de regeneración hepática y la disminución de fibrosis. Se puede observar en la **figura 28A**, que a 2 semanas de tratamiento con DDC, los niveles de expresión de *Mmp9* y *Timp-1* se inducen significativamente en los hígados de ratones Wt, mientras que en Tg Met la inducción es significativamente inferior o ausente. Algo similar ocurre con la expresión de *Tpa* y *Serpine1*, que se induce con la dieta DDC en ambos tiempos de tratamiento en los ratones Wt, pero no en los ratones Tg Met. Los niveles de *Col1A1* también aumentan con el tratamiento de DDC, especialmente a 2 semanas, pero curiosamente no se observan diferencias entre ratones Wt y Tg Met. Para completar estos datos, se realizó un estudio de expresión proteica en tejido hepático de los marcadores MMP9, TIMP-1 y COL1A1 (**Figura 28B**). Aunque en general se ve un aumento de los tres marcadores con la dieta en los hígados Wt, los cambios son mucho más sutiles que los observados a nivel de ARNm y no se alcanza significatividad estadística. En el caso de TIMP-1, los niveles son inferiores en hígados Tg Met respecto de Wt, como se observaba a nivel de ARNm, pero de nuevo se pierde la significatividad. Sin embargo, MMP9, al contrario de lo observado en el ARNm, presenta niveles superiores en hígados Tg Met con la dieta DDC a 6 semanas de tratamiento, siendo las diferencias con Wt significativas. Se requerirían estudios adicionales para clarificar la aparente inconsistencia entre expresión génica y expresión proteica, pero podría ser debido a una regulación postranscripcional diferencial, dado que aunque la regulación principal es transcripcional, se han descrito mecanismos de regulación postranscripcional para algunos miembros de la familia de MMPs y TIMPs (Clark I. M., et al, 2008). La expresión proteica de COL1A1 muestra una tendencia a un incremento en los niveles en hígados Wt a 2 y 6 semanas de DDC, que no se observan en Tg Met, aunque hay que señalar que los hígados Tg Met tienden a tener los niveles basales incrementados.

Como abordaje adicional para estudiar el estado de fibrosis inducida por DDC, se analizó el depósito de fibras de colágeno tipo I y III mediante la tinción de *Sirius Red* (**Figura 28C**). Los resultados muestran una mayor acumulación de fibras de colágeno en las áreas periportales durante el tratamiento, a 2 y 6 semanas de dieta DDC, sin embargo, no se observan diferencias significativas entre ratones Wt y Tg Met. En conjunto, los análisis del proceso fibrótico no son concluyentes. Aunque los datos a nivel de expresión de marcadores parecen reflejar diferencias en el proceso de remodelación de la matriz entre hígados Wt y Tg Met, que podrían apoyar los datos previos de un

menor daño en ratones Tg Met, no se observan diferencias entre ellos en cuanto a la acumulación hepática de colágeno.

Adicionalmente, se estudió la expresión de los diferentes transportadores de sales biliares, con el fin de profundizar en la regulación del transporte de sales biliares en los hígados de ratones Wt y Tg Met en respuesta a la dieta DDC (Figura 29A). El gen *Abcb11* codifica para el receptor BSEP, localizado en la membrana canalicular del hepatocito, pertenece a la familia de transportadores de tipo ABC, transporta tanto sales biliares conjugadas como no conjugadas. Mutaciones en BSEP se han relacionado con diversas enfermedades colestásicas (Kubitz R. et al., 2012). El gen *Slc10a1* codifica para el transportador NTCP, que se expresa en la membrana basolateral (sinusoidal)

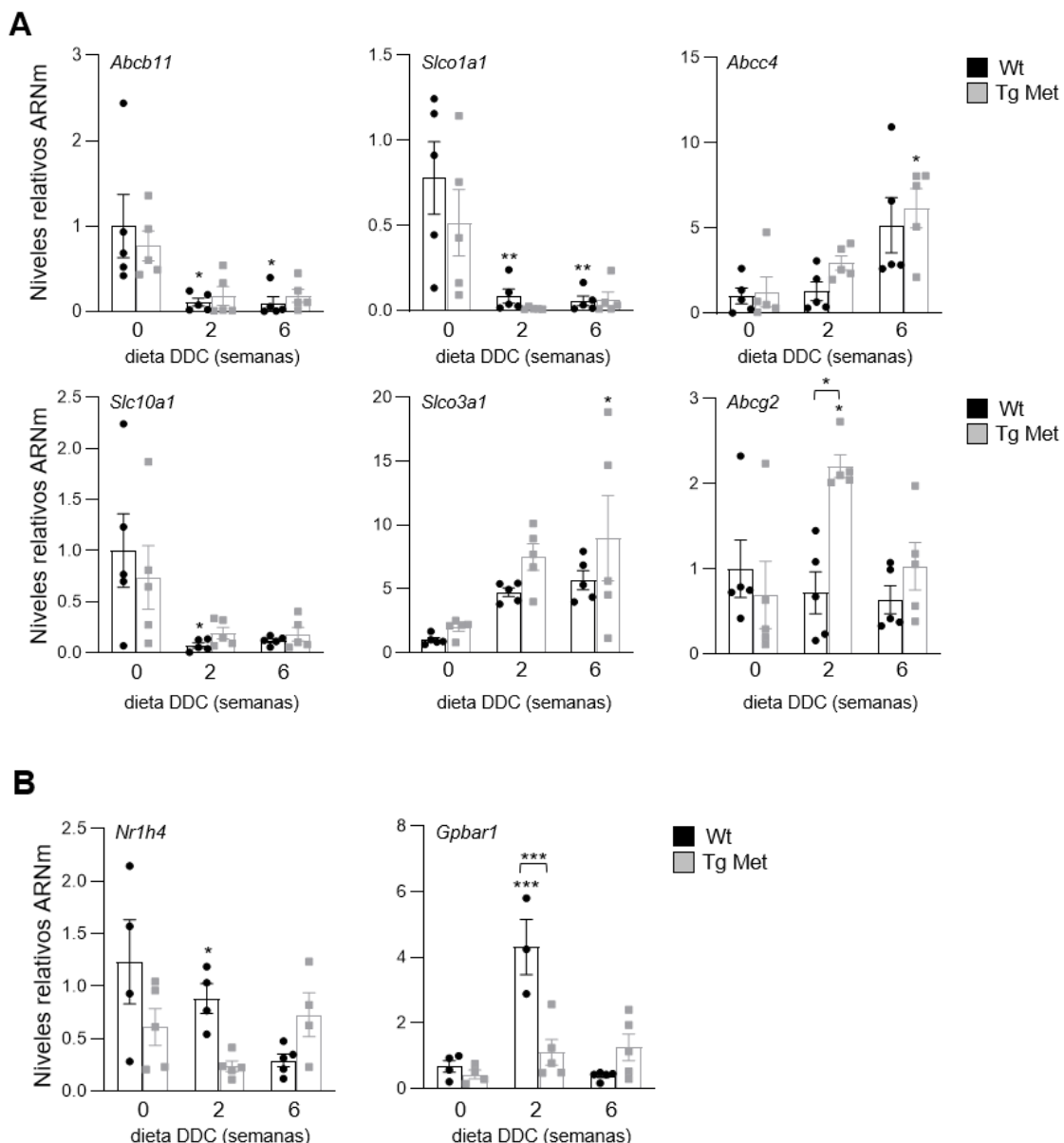


Figura 29. Análisis de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de sales biliares en hígados de ratones Wt y Tg Met sometidos a una dieta DDC. Niveles de expresión de transportadores de sales biliares, *Abcb11*, *Slco1a1*, *Abcc4*, *Slc10a1*, *Slco3a1* y *Abcg2* (A); y receptores de sales biliares, *Nr1h4* y *Gpbar1* (B), determinados mediante RT-qPCR, en extractos de ARNm total de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas de dieta DDC. Se usó *Gusb* como

gen normalizador. Se representa la media \pm S.E.M. (n= 3-5). * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001 respecto de su control no tratado con DDC o como se indica.

del hepatocito y es uno de los transportadores más importantes asociado al transporte de sales y ácidos biliares que provienen de la circulación enterohepática. Los sustratos principales del NTCP son las sales biliares conjugadas con glicina y taurina, mediante

cotransporte pasivo con Na⁺. El gen *Slco1a1* codifica para el transportador OATP1, que pertenece a una familia de transportadores de aniones orgánicos expresados en los enterocitos y en los hepatocitos para el transporte de sales biliares (Geier A., 2005). Estos tres genes, *Abcb11*, *Slco1a1* y *Slc10a1* muestran un perfil de expresión similar de disminución a 2 y 6 semanas de dieta DDC, que solo alcanza significatividad en el hígado de los ratones Wt, pero sin diferencias significativas entre Wt y Tg Met.

El gen *Abcc4* que codifica para la proteína de transporte MRP4 expresada en la membrana basolateral del hepatocito con consumo de energía en forma de ATP para el transporte de sustancias endógenas y xenobióticos, presenta un aumento en sus niveles en respuesta a la dieta tanto en ratones Wt como en Tg Met, pero el aumento solo es significativo en Tg Met tras 6 semanas de dieta DDC. El gen *Slco3a1* codifica para el transportador OATP3A1 que forma parte de la misma familia de polipéptidos que el transportador OATP1, y también transporta sales biliares hacia la circulación sanguínea (Li M. et al., 2022). Este gen muestra un perfil de expresión similar a *Abcc4*, con un aumento tras la dieta DDC, que es significativo en hígados Tg Met a 6 semanas de tratamiento. Este hallazgo puede asociarse con una eliminación de sales biliares hacia circulación periférica para su excreción renal con el fin de aclarar las altas concentraciones de sales biliares durante la colestasis (Pan Q. et al., 2018).

El gen *Abcg2* codifica para el transportador ABCG2, que se expresa en la membrana basolateral del hepatocito, y que también recibe el nombre de BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) y transporta una gran variedad de productos sulfatados de esteroides y xenobióticos (Blazquez A. G. et al., 2012). Se ha descrito que esta proteína transporta sales biliares que provienen de la circulación enterohepática hacia el ducto biliar (Blazquez A. G. et al., 2012). La expresión de *Abcg2* no muestra cambios claros en hígados Wt tras la dieta, pero sí muestra una inducción significativa en Tg Met, y por tanto una regulación diferencial entre Wt y Tg Met, a 2 semanas de dieta DDC.

Paralelamente se estudió la expresión de *Nr1h4* y *Gpbar1*, receptores de sales biliares que participan como mediadores del metabolismo de las mismas (**Figura 29B**). El gen *Nr1h4* codifica para la proteína FXR, la cual está implicada en la regulación del metabolismo de la glucosa, de lípidos, del colesterol y en la formación de sales biliares en el hígado. Su expresión muestra un descenso significativo a 2 semanas en respuesta a la dieta, en hígados de ratones Wt, pero no en los Tg Met. *Gpbar1* codifica para el receptor TGR5, el cual se ha relacionado con el control de los niveles de sales biliares, la hepatoprotección durante la colestasis y la regulación de moduladores de la inflamación cuando se unen a él las sales biliares (Klindt C. et al., 2019; Chiang J.Y.L. & Ferrell J. M., 2020). Tras 2 semanas de DDC, la expresión de *Gpbar1* aumenta de forma significativa en hígados Wt, pero no en los Tg Met, presentado así una regulación diferencial entre ambos genotipos. En conjunto, el patrón de regulación de expresión de los genes relacionados con el transporte y metabolismo de sales biliares, por la dieta DDC, es similar en Wt y Tg Met. Solo el transportador *Abcg2* (BCRP) y el receptor

Gpbar1 (TGR5) muestran una regulación diferencial. En un contexto tumoral, se ha descrito también un aumento de expresión de *Abcg2* dependiente de la sobreexpresión de Met, lo que está asociado a la resistencia a fármacos como la doxorubicina (Jung K. A., 2015). También se ha demostrado que una disminución en la expresión de *Gpbar1* en células epiteliales biliares promueve la evolución de la colangitis esclerosante en modelos de ratón (Reich M. et al., 2021). Si las diferencias observadas en nuestro modelo están asociadas o no a una alteración en el metabolismo de sales biliares en ratones Tg Met, en el contexto del daño inducido por DDC, no está claro, y requeriría experimentos adicionales.

1.2 La sobreexpresión de Met conduce a una aminoración de la reacción ductular inducida por la dieta DDC.

Está bien establecido que el fenotipo colestásico inducido por el modelo DDC se acompaña de una reacción ductular y una expansión de las CPH/OC que se propone que participan en la regeneración hepática (Fickert P. et al., 2007). Como se comentó en el apartado de introducción de esta memoria, las CPH/OC son células bipotenciales que constituyen una fuente celular alternativa para la repoblación hepática cuando se agota el potencial regenerativo de los hepatocitos maduros.

Quisimos evaluar la participación de estas células y la reacción ductular en respuesta al daño inducido por DDC en nuestro modelo de ratones Wt y Tg Met. Para ello se empleó la tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E). Así, este análisis histológico reveló que tanto en hígados de los ratones Wt como de los ratones Tg Met tratados con DDC se producía una reacción ductular, caracterizada por la expansión desde las regiones periportales de células pequeñas basofílicas que forman estructuras de tipo ductal. Se llevó a cabo una cuantificación del área de expansión de la reacción ductular en las regiones periportales. Los datos obtenidos de este análisis muestran una menor reacción ductular en los ratones Tg Met, con diferencias significativas a 6 semanas de DDC, compatible con una menor expansión de CPH/OC (**Figura 30A**).

Para confirmar estos datos, se analizó la expresión de marcadores comúnmente usados para la identificación de CPH/OC, tales como *Epcam* o *Krt19* (Miyajima A., Tanaka M., Itoh T., 2014) mediante RT-qPCR en extractos hepáticos de ratones Wt y Tg Met. En el hígado de ratones Wt se observó un aumento de la expresión de estos genes, especialmente a las 2 semanas de tratamiento, mientras que en los ratones Tg Met la inducción es menor, de hecho, no es estadísticamente significativa. También se analizó la expresión proteica de EPCAM, que siguió la misma tendencia que lo observado a nivel de ARNm (**Figura 30B y C**).

Posteriormente se realizó la tinción doble CK19-Ki67, utilizando CK19 como marcador de CPH/OC y Ki67 como marcador de célula en proliferación. Las imágenes de microscopía muestran un mayor número de células doble positivas CK19/Ki67 en hígados de ratones Wt a las 6 semanas de dieta DDC respecto del Tg Met en las zonas próximas a las áreas portales (**Figura 30D**).

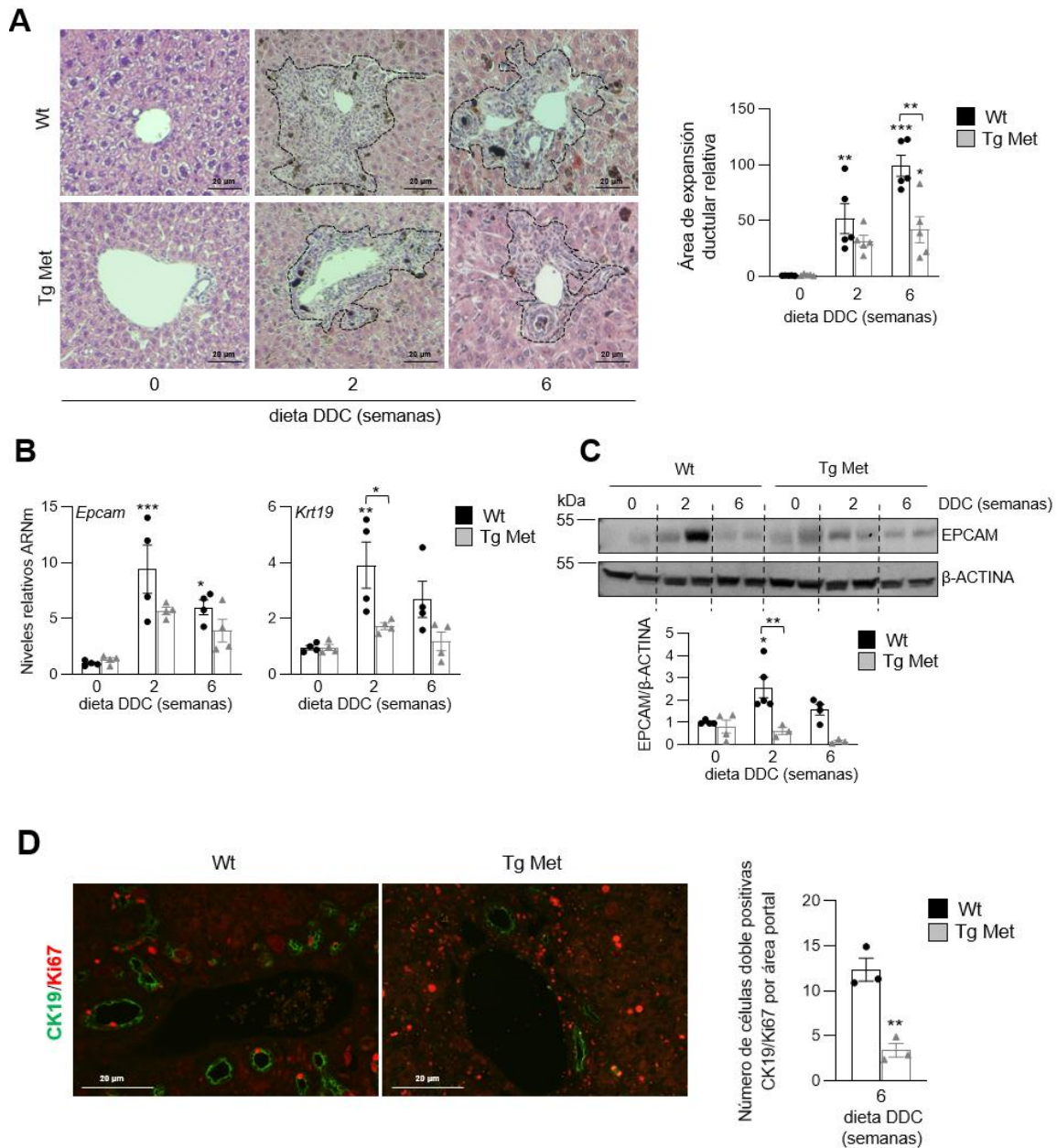


Figura 30. Análisis de la reacción ductular y expansión de CPH/OC en hígado de ratones Wt y Tg Met sometidos a una dieta DDC. **A.** Imágenes representativas de la tinción de Hematoxilina & Eosina en cortes de tejido hepático de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas con dieta DDC. Barra de escala: 20 μ m. Aumento: 20X (panel izquierdo). Se realizó un análisis morfométrico cuantitativo (panel derecho) de las áreas de expansión ductular en las proximidades de las zonas periportales en 10 regiones periportales por animal, usando el software Image J. Los datos representan la media \pm S.E.M. (n=4-9). **B.** Niveles de expresión de *Epcam* y *Krt19* como marcadores de CPH/OC, analizados mediante RT-qPCR, en extractos de ARNm total de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas de dieta DDC. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Se representa la media \pm S.E.M. (n=3-5). **C.** Niveles proteicos de EPCAM en hígados de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas con dieta DDC, analizados mediante western blot. β -ACTINA fue empleado como control de carga. Se muestra un experimento representativo (panel superior), y el análisis cuantitativo por densitometría (panel inferior). Los datos representan la media \pm S.E.M.(n=5). **D.** Análisis del índice proliferativo de las células CK19+ en hígado de ratones Wt y Tg Met no tratados y tratados 6 semanas con dieta DDC.

Imágenes representativas (panel izquierdo) de la tinción por inmunofluorescencia con anticuerpos para CK19 (marcador de CPH/OC) y Ki67 (marcador de proliferación). Barra de escala: 20 μ m, aumento: 20X. Se realizó un conteo (panel derecho) del número de células CK19+/Ki67+ en 10 regiones portales de cada animal. Los datos representan la media \pm S.E.M. (n=3). * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001 respecto de su control no tratado con DDC o como se indica.

1.3 La sobreexpresión de Met protege y mejora la capacidad regenerativa de los hepatocitos frente a un daño colestásico.

Dada el conocido papel de HGF como mitógeno en hepatocitos (Kimura M., Moteki H., Ogihara M., 2023) se analizó la tasa de proliferación en el parénquima hepático en cortes de tejido hepático de ratones Wt y Tg Met tras 6 semanas de dieta DDC mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo Ki67, y DAPI como marcador nuclear, y se cuantificó el número de núcleos de hepatocitos positivos, ya que los núcleos de los hepatocitos son fácilmente identificables debido a su gran tamaño y morfología redondeada (Figura 31A).

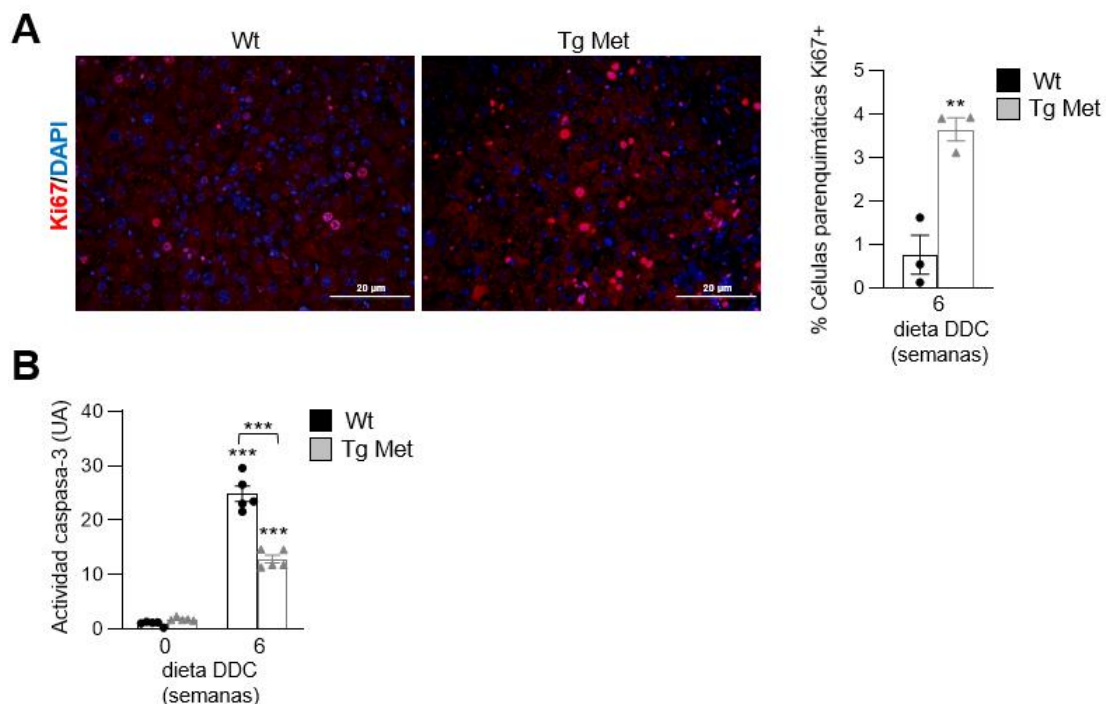


Figura 31. Análisis de la proliferación de hepatocitos en el hígado de ratones Wt y Tg Met sometidos a una dieta DDC. **A.** Número de células proliferativas (Ki67 positivas) en el parénquima hepático de ratones Wt y Tg Met tratados durante 6 semanas con dieta DDC. Imágenes representativas (panel izquierdo) de la tinción por inmunofluorescencia con Ki67 (marcador de proliferación) y DAPI (marcador nuclear). Barra de escala: 20 μ m, aumento: 20X. Se realizó un conteo (panel derecho) del número de células Ki67+ de 10 regiones parenquimáticas y se calculó el porcentaje (media \pm S.E.M.; n=3). **B.** Actividad caspasa 3 en

extractos proteicos de hígados de ratones Wt y Tg Met tras 0 y 6 semanas de dieta, medida mediante ensayo de fluorescencia. Los datos se expresan por μg de proteína y corresponden a 4-5 ratones (media \pm S.E.M.). (UA, unidades arbitrarias) ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ respecto de su control no tratado con DDC o como se indica.

Los resultados muestran valores más elevados de proliferación en hepatocitos en los ratones Tg Met tratados con DDC durante 6 semanas, lo que sugiere una ventaja proliferativa, y en consecuencia una mejor respuesta regenerativa en dicha población. Paralelamente, se analizó la actividad caspasa 3 como marcador de muerte por apoptosis en los tejidos hepáticos (**Figura 31B**). Se puede observar que hígados Tg Met presentan menores niveles de actividad caspasa-3 que los Wt tras 6 semanas de dieta DDC, lo que sugiere que la sobreexpresión de Met resulta en una menor muerte celular ante un daño colestásico.

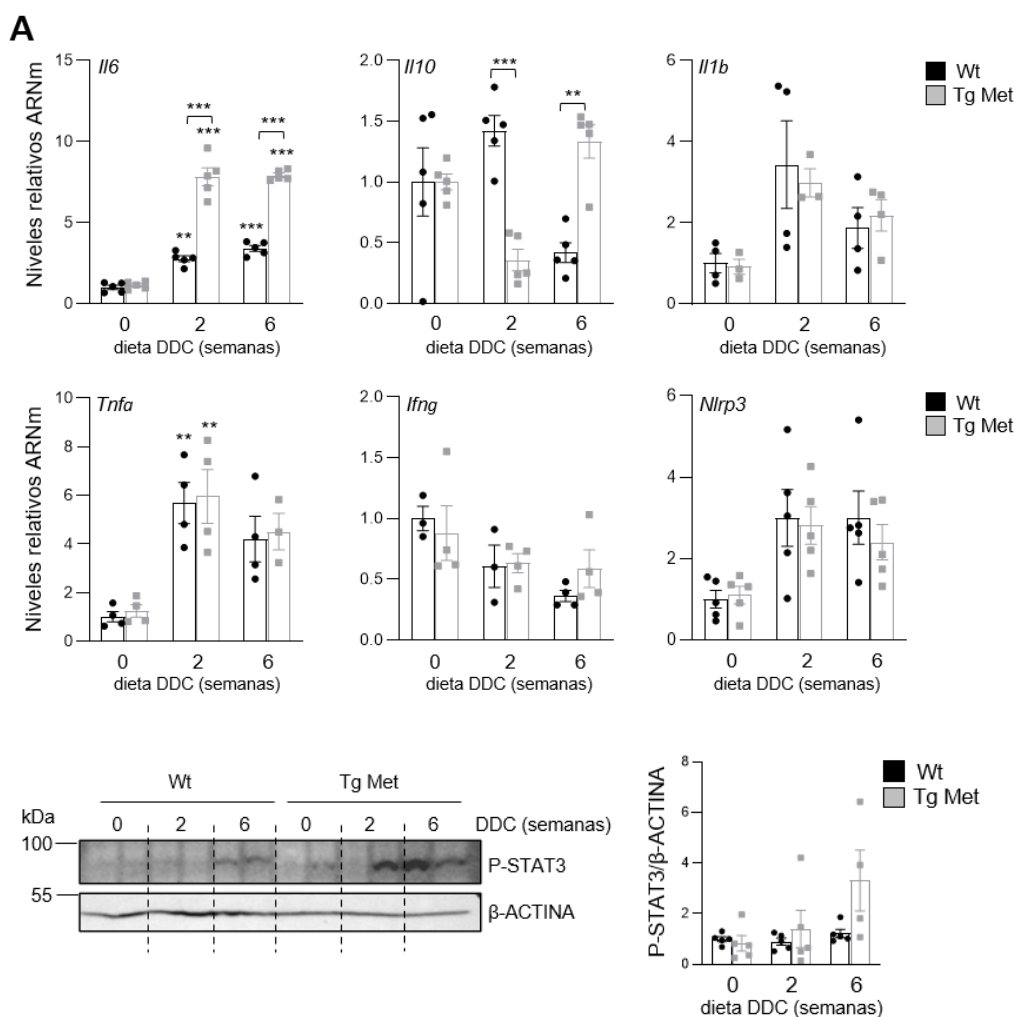


Figura 32. Análisis de mediadores y vías de inflamación en el hígado de ratones Wt y Tg Met sometidos a una dieta DDC. A. Niveles de expresión de *Il6*, *Il10*, *Il1 β* , *Tnfa*, *Ifng* y *Nlrp3*, en extractos de ARNm de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas de dieta DDC, analizados mediante RT-qPCR. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Se representa la media \pm S.E.M. (n=3-5). **B.** Niveles de activación de STAT3 (P-STAT3) en extractos proteicos de hígados de ratones Wt y Tg Met, analizados mediante western blot. β -ACTINA fue empleado como control de carga. Se muestra un experimento representativo (panel izquierdo) y el análisis cuantitativo por densitometría (panel derecho), correspondiente a datos de 3-5 ratones por condición (media \pm

S.E.M.). ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ respecto de su control no tratado con DDC o como se indica.

Durante la colestasis se establece un ambiente proinflamatorio donde participan numerosos mediadores, con participación de diferentes interleucinas y otros mediadores de la inflamación que pueden influir en el proceso regenerativo tanto positiva como negativamente (Gan C. et al., 2022). Teniendo en cuenta esto, se quiso analizar la existencia de posibles diferencias en la respuesta inflamatoria entre los animales Wt y Tg Met tratados con DDC como consecuencia de la sobreexpresión del receptor Met. De este modo, se analizaron los niveles de expresión de ARNm de interleucinas (IL) IL-6, 10, 1 β , y también de IFN γ , TNF- α y NLRP3.

En la **figura 32A** puede observarse que *Il6* aumenta tanto en Wt como Tg Met en respuesta a la dieta DDC, pero el aumento es significativamente mayor en el ratón Tg Met. Esto va acompañado de una mayor activación (aunque no se alcanza significatividad) de STAT3 en los hígados Tg Met a 6 semanas de DDC (**Figura 32B**), y podría relacionarse con una respuesta regenerativa más eficaz, ya que se ha descrito a IL-6 como un potente regulador de la homeostasis y un mitógeno de hepatocitos, con un papel muy relevante en regeneración (Schmidt-Arras D. et al., 2016). La expresión de *Il10* presenta un perfil opuesto en Wt y Tg Met, con diferencias significativas tanto a 2 como a 6 semanas. Por el contrario, la expresión de *Il1b*, *Tnfa*, *Ifng* y *Nlrp3* no muestran un patrón diferencial entre Wt y Tg Met, sin embargo, puede observarse un aumento en los niveles de *Il1b*, *Tnfa*, y *Nlrp3* principalmente a 2 semanas de DDC, lo que apoya su papel como mediadores de la inflamación durante la colestasis inducida en este modelo.

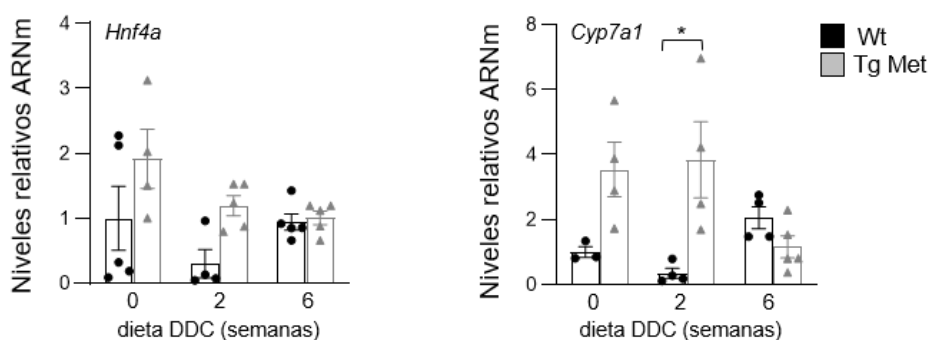


Figura 33. Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación al linaje de hepatocito en el hígado de ratones Wt y Tg Met sometidos a una dieta DDC. Niveles de expresión de *Hnf4a* y *Cyp7a1* en extractos de ARNm total de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas con dieta DDC, analizados mediante RT-qPCR. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Se representa la media \pm S.E.M. (n=3-5). * = $p < 0,05$ respecto de su control no tratado con DDC o como se indica.

Dado que entre los cambios y las alteraciones que tienen lugar como consecuencia de los mecanismos regenerativos desencadenados por una lesión en el tejido hepático se ha descrito una desdiferenciación hepatocelular transitoria (Berasain C., 2022), se analizaron marcadores de diferenciación celular de linaje hepático en los tejidos, concretamente *Hnf4a* y *Cyp7a1*, siendo ambos marcadores expresados en hepatocitos.

Hnf4a es un gen requerido en el proceso de diferenciación celular del hepatocito (Dubois V. et al., 2020). *Cyp7a1* se expresa en hepatocitos adultos y se ha relacionado con diversas funciones, entre las que cabe destacar su papel en la regulación del metabolismo y producción de ácidos biliares, en el proceso de regeneración hepática, y recientemente se ha descrito su papel protector frente a la inflamación y desarrollo de fibrosis derivado del control homeostático del colesterol (Zhang L. et al., 2009; Liu H. et al., 2016).

En la **figura 33** se observa una caída transitoria (aunque no se alcanza significatividad estadística) en la expresión de ambos genes en hígados Wt tras 2 semanas de tratamiento con DDC, caída que no se observa o es menor en los hígados de los ratones Tg Met. En el caso de *Cyp7a1* las diferencias entre Wt y Tg Met son estadísticamente significativas. Hay que destacar que los niveles de expresión basal también tienden a ser mayores en los ratones Tg Met. Este resultado apoyaría de nuevo la idea de un menor daño en los hepatocitos de ratones Tg Met.

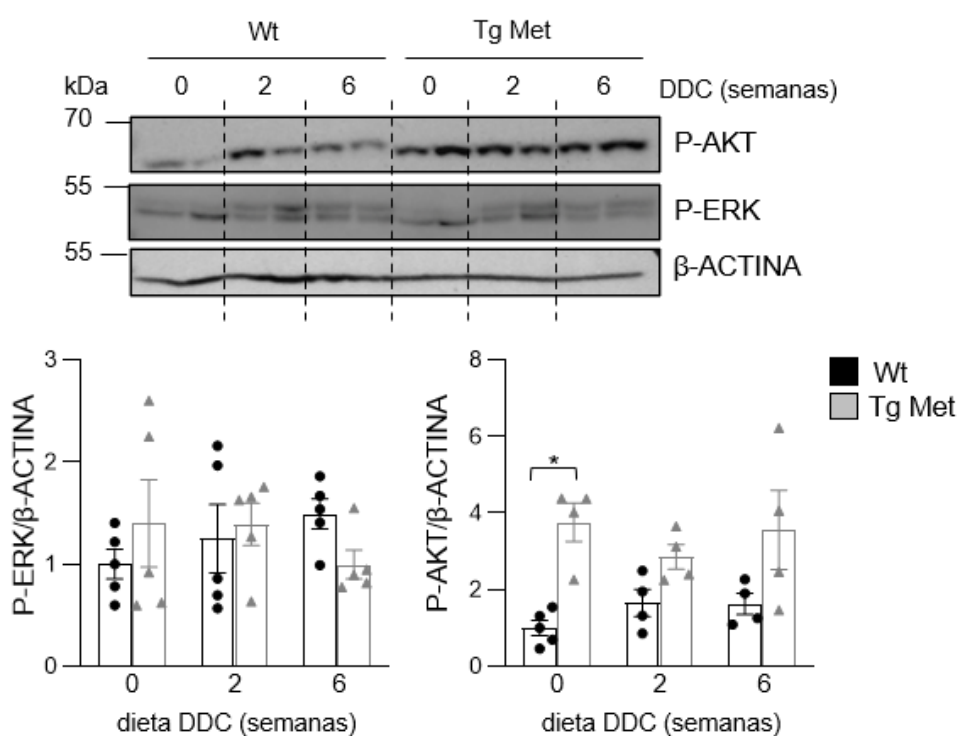


Figura 34. Análisis de la activación de AKT y ERK/MAPKs en el hígado de ratones Wt y Tg Met sometidos a una dieta DDC. Niveles de P-AKT y P-ERK en extractos proteicos de hígados de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas de dieta DDC, analizados mediante western blot. β-ACTINA fue empleado como control de carga. Se muestra un experimento representativo (panel superior) y el análisis cuantitativo por densitometría (panel inferior), correspondiente a datos de 3-5 ratones por condición (media ± S.E.M.). * = $p < 0,05$ respecto de su control no tratado con DDC o como se indica.

HGF, a través de su receptor Met, dispara diferentes vías de señalización, entre ellas, las vías de PI3K/AKT y de ERK. La activación por HGF de la ruta mediada por AKT desencadena principalmente una respuesta regenerativa (Shamsan E. et al., 2024). Por otra parte, la activación de la cascada ERK/MAPKs está implicada en procesos de proliferación, crecimiento y migración en hepatocitos (González M. N. et al., 2017). Con

todo ello, se analizaron los niveles de P-AKT y P-ERK en ratones Wt y Tg Met sometidos a una dieta DDC. En la **figura 34** puede observarse que de forma general en ambos tipos de ratón los niveles de P-ERK se mantienen constantes durante el proceso de colestasis, sin cambios significativos entre condiciones ni entre los genotipos. Sin embargo, en el caso de P-AKT puede observarse que los hígados Tg Met muestra una mayor activación de AKT con respecto al Wt, tanto basalmente como bajo tratamiento con DDC, que sugiere que la sobreexpresión de Met en hepatocitos favorece la activación de algunas vías proregenerativa en el hígado.

1.4 La sobreexpresión de Met produce una alteración en la vía de TGF- β en el hígado de ratones sometidos a un daño colestásico.

La relevancia del TGF- β durante el daño hepático, su efecto apoptótico, y su papel clave en el desarrollo de fibrosis (Dewidar B., et al, 2019) lo convierten en una importante diana de estudio. Además, se han descrito regulaciones cruzadas entre la vía de HGF/Met y la vía del TGF- β . Así, algunas de las acciones hepatoprotectoras de HGF/Met se han asociado con acción inhibitoria sobre las acciones profibrogénicas de TGF- β (Giebler A. et al., 2009; Marquardt J. U. et al., 2012; Inagaki Y. et al., 2008). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito el papel de la vía de HGF/Met en la regulación de la respuesta al TGF- β en CPH/OC, lo que apunta a que existe un *crosstalk* HGF/Met y TGF- β que repercute en el comportamiento de las CPH/OC y en su capacidad regenerativa *in vivo* (Almalé L. et al., 2019). Por todo ello, decidimos analizar si la sobreexpresión de Met podría impactar en la vía de señalización de TGF- β en el hígado en un contexto de colestasis. Para ello, en primer lugar, se analizaron los niveles de expresión de ARNm de los diferentes ligandos y receptores de TGF- β con el fin de obtener una visión general de la implicación de esta vía en el modelo de estudio (**Figura 35**).

Los niveles de *Tgfb1* y *2* (que codifican para TGF- β 1 y TGF- β 2, respectivamente) aumentan durante la dieta DDC, principalmente a 2 semanas, obteniéndose en hígados Wt unos niveles diferencialmente significativos para *Tgfb2* respecto del basal, sin embargo, no se observan grandes diferencias entre genotipos, siendo las modulaciones observadas relativamente semejantes en ambos. Son llamativos los datos obtenidos del análisis de *Tgfb3* (que codifica para TGF- β 3): los ratones Tg Met muestran unos niveles significativamente superiores a los de ratones Wt, de forma basal, sin embargo, durante la colestasis sus niveles caen de forma significativa, mientras que en ratones Wt, los niveles de *Tgfb3* no se modulan con el tratamiento. Paralelamente se analizaron los niveles de expresión de ARNm de los receptores de TGF- β . Como se muestra en la **figura 35**, los tres receptores presentan un aumento en la expresión con la dieta DDC, aumento no observado en ratones Tg Met. Las diferencias entre Wt y Tg Met son significativas para *Tgfbr1* (que codifica para T β RI) a 2 semanas y para *Tgfbr3* (que codifica para T β RIII o betaglicano) tanto a 2 como a 6 semanas de dieta. Por otra parte, se observan diferencias basales, concretamente niveles de expresión superiores para *Tgfbr2* (que codifica para T β RII) y *Tgfbr3*, en ratones Tg Met. Tanto T β RI como T β RII, forman el complejo heterotetramérico para interactuar con las proteínas R-Smads.

Betaglicano se considera un co-receptor, no tiene actividad quinasa, pero sí dimeriza e interactúa con otros receptores a nivel de la superficie celular cumpliendo una función como reservorio o captador de ligandos disponibles para los receptores T β RI y T β RII (Dreyfuss J. L. et al., 2009). De forma general, los resultados muestran que los tres receptores tienen niveles superiores de expresión en los hígados de ratones Wt en comparación con los de Tg Met durante el tratamiento con la dieta colestásica.

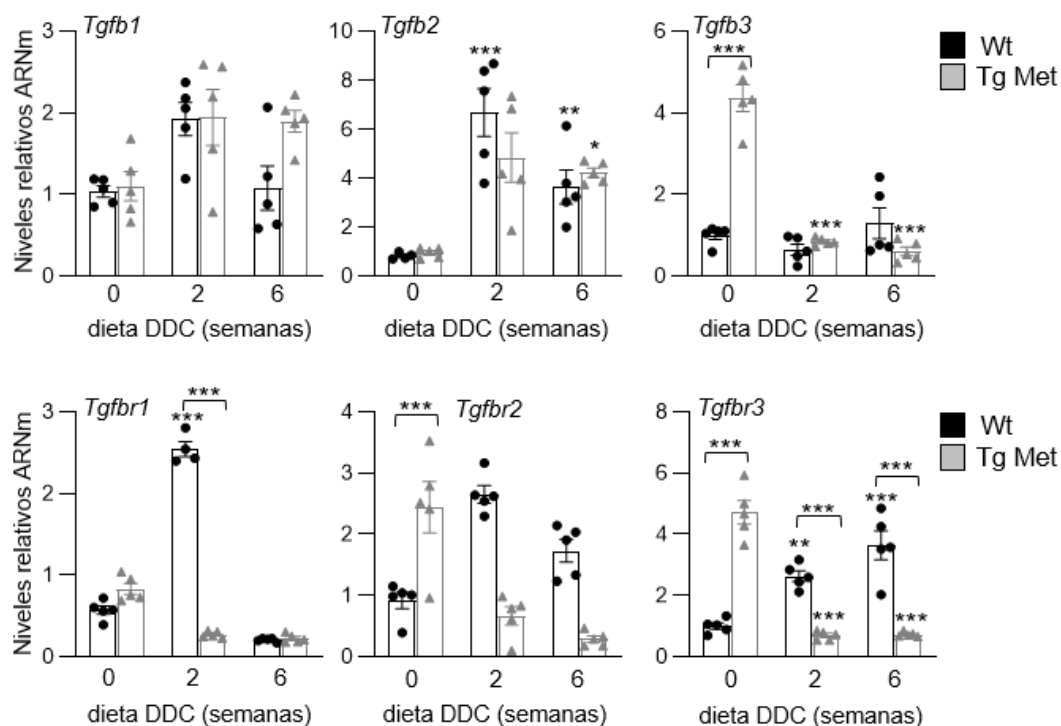


Figura 35. Análisis de la expresión de ligandos y receptores de la vía de TGF- β en el hígado de ratones Wt y Tg Met sometidos a una dieta DDC. Niveles de expresión de *Tgfb1*, *Tgfb2*, *Tgfb3*, *Tgfb1*, *Tgfb2* y *Tgfb3* en extractos de ARNm total de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas con dieta DDC, determinados mediante RT-qPCR. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Se representa la media \pm S.E.M. (n=4-5). ** = p < 0,01; *** = p < 0,001 respecto de su control no tratado con DDC o como se indica.

Para completar esta información, se analizó la activación de la ruta de TGF- β mediante el análisis de los niveles de fosforilación de SMAD2 y la posible modulación de algunos genes diana de TGF- β en el hígado de ratones Wt y Tg Met tratados con DDC.

A 2 semanas de tratamiento con la dieta DDC se observa un aumento de los niveles de P-SMAD2 en ratones Wt, lo que no sucede en ratones Tg Met (Figura 36A). Estos resultados son consistentes con la inducción, en los hígados Wt, de *Smad7* y *Serpine 1* (Figura 36B). SMAD7 es un regulador negativo de la activación de la vía canónica de TGF- β , y PAI-1 (codificado por el gen *Serpine1*) está estrechamente relacionado con las acciones del TGF- β mediante procesos de fibrosis y remodelado de la matriz extracelular, siendo ambos genes dianas de la vía canónica del TGF- β (Bárcena C. et al., 2019; Sentíes-Gómez M. D. et al., 2005). En conjunto, estos resultados sirven como evidencia de que la vía canónica de TGF- β está menos activa en hígados de ratones Tg Met durante la colestasis inducida por la dieta DDC.

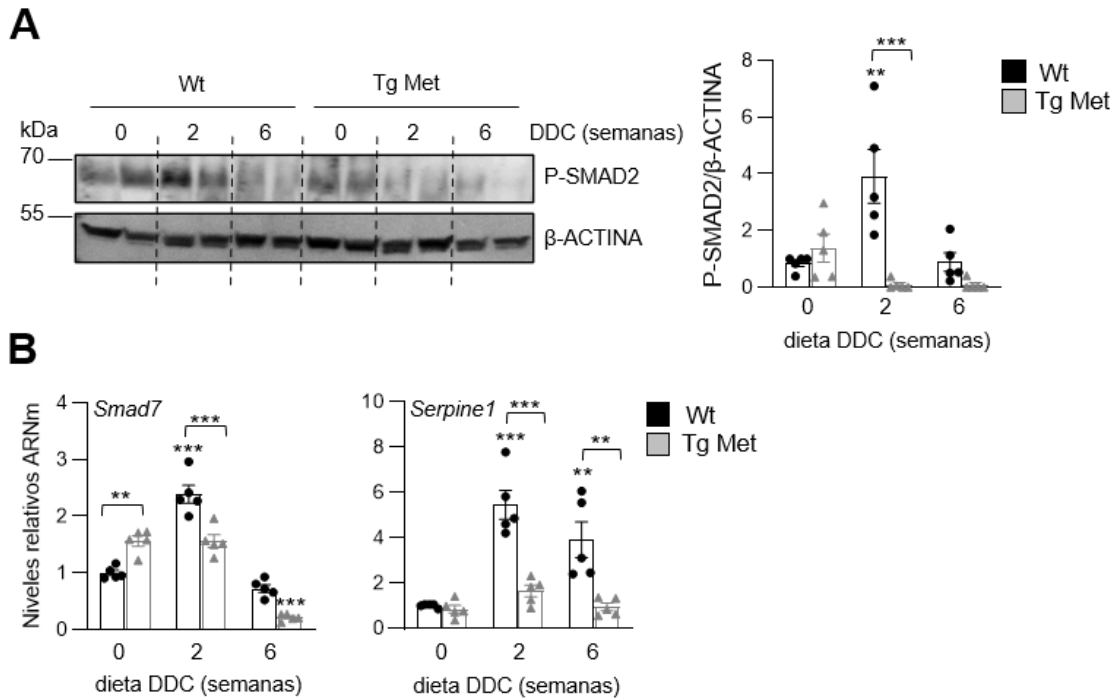


Figura 36. Análisis de la vía de señalización de TGF-β en el hígado de ratones Wt y Tg Met sometidos a una dieta DDC. **A.** Niveles de SMAD2 activada (P-SMAD2) en extractos proteicos de hígados de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas de dieta DDC, determinados mediante western blot. La β-ACTINA fue usada como control de carga. Se muestra un experimento representativo (panel izquierdo) y el análisis cuantitativo por densitometría (panel derecho). Se muestra la media ± S.E.M. (n=3-5). **B.** Niveles de expresión de *Smad7* y *Serpine1* en extractos de ARNm total de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas con dieta DDC, determinados mediante RT-qPCR. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Se representa la media ± S.E.M. (n=4-5). ** = p < 0,01; *** = p < 0,001 respecto de su control no tratado con DDC o como se indica.

Para estudiar con más detalle los mecanismos implicados en la diferente respuesta de los ratones Tg Met al daño inducido por la dieta DDC, y dados los hallazgos de una alteración en la activación de la vía del TGF-β en los hígados Tg Met, quisimos profundizar en el análisis de esta vía, realizando estudios con las líneas de hepatocitos derivadas de los ratones Wt y Tg Met, descritas en el apartado de material y métodos. Se trataron hepatocitos Wt y Tg Met con TGF-β a concentraciones de 1, 2 y 5 ng/ml durante 24 y 48h para explorar si realmente había una respuesta diferencial frente a este factor entre ambos genotipos que pudiera asociarse a una atenuación de la señalización de TGF-β (**Figura 37**).

Los resultados mostrados en la **figura 37A** indican que solo la dosis más alta (5 ng/ml) afecta a la viabilidad de estas células, y la caída en la viabilidad en hepatocitos WT es ligera pero significativamente superior a la observada en los Tg Met a 48h de tratamiento. Por otro lado, se estudió la activación de la ruta de TGF-β, analizando los niveles de P-SMAD2. Para ello, hepatocitos Wt y Tg Met fueron tratados con 2 ng/ml de TGF-β durante 10, 30 y 60 minutos (**Figura 37B**). Los niveles de P-SMAD2 en respuesta al TGF-β en hepatocitos Tg-Met tendían a ser incluso superiores a los observados en los Wt, en cualquier caso, los datos no alcanzan significatividad estadística debido a la alta variabilidad.

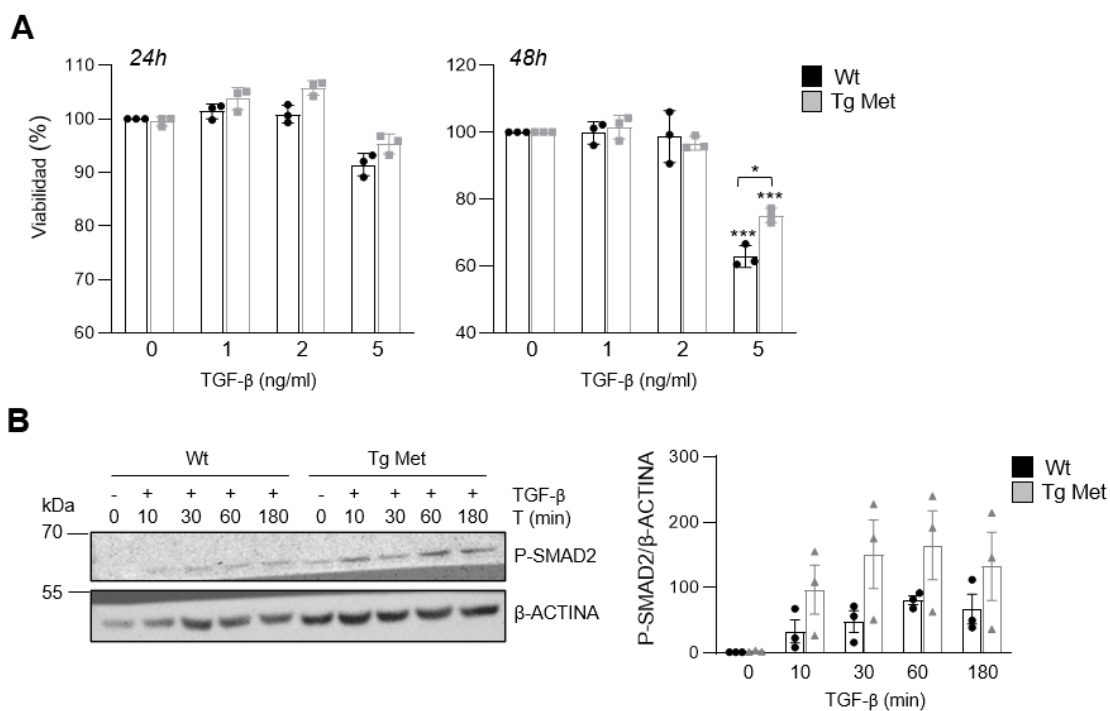


Figura 37. Estudio de la respuesta a TGF-β de los hepatocitos Wt y Tg Met. **A.** Viabilidad celular en hepatocitos Wt y Tg Met tratados con 1, 2 y 5 ng/ml de TGF-β durante 24h (panel izquierdo) y 48h (panel derecho) analizada mediante tinción con cristal violeta. Los datos son la media ± S.E.M de 3 experimentos independientes. **B.** Niveles de activación de SMAD2 (P-SMAD2) en extractos proteicos de hepatocitos Wt y Tg Met tratados con 2 ng/ml de TGF-β analizados mediante western blot. β-ACTINA fue empleado como control de carga. T: tiempo de tratamiento. Se muestra un experimento representativo (panel izquierdo) y el análisis cuantitativo por densitometría (panel derecho), correspondiente a datos de 3 experimentos independientes (media ± S.E.M.). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ respecto de su control no tratado o como se indica.

Por tanto, estos datos mostraban una diferencia de respuesta a TGF-β *in vitro* debida a la sobreexpresión de Met en hepatocitos limitada en términos de viabilidad e inexistente en términos de señalización, resultados que no reflejaban lo observado *in vivo* durante el proceso de colestasis. Por ello decidimos tratar de imitar *in vitro* el modelo de colestasis por DDC, tratando los hepatocitos en cultivo con TCDC, sal biliar predominante en la bilis del ratón (Kister B. et al., 2023).

Para poner a punto el modelo de “colestasis *in vitro*”, en primer lugar, tratamos los hepatocitos Wt y Tg Met con diferentes concentraciones de TCDC durante 24 y 48h para estudiar cómo esta sal biliar afectaba a la viabilidad. En la **figura 38B** se puede observar cómo el TCDC provoca una pérdida de viabilidad, de forma dependiente de la dosis, y que no hay diferencias a este nivel entre ambos genotipos, aunque en hepatocitos Tg Met la respuesta está algo retrasada, particularmente con las dosis más bajas (datos de 24h). Decidimos seleccionar la concentración de 75 μM para los estudios posteriores, ya que induce una disminución del número de células en torno al 20%, una pérdida de viabilidad moderada y factible para trabajar en condiciones de cultivo que no causaran un estrés excesivo en las células. Con esta dosis diseñamos un protocolo (**Figura 38A**) consistente en el mantenimiento de los hepatocitos en medio al 10% FBS con TCDC durante al menos 24 horas, tras este tiempo se procedía a la renovación del medio (0%

FBS y con TCDC) para la realización de los diferentes estudios posteriores (principalmente para el tratamiento con TGF- β), tras 2h de privación de suero.

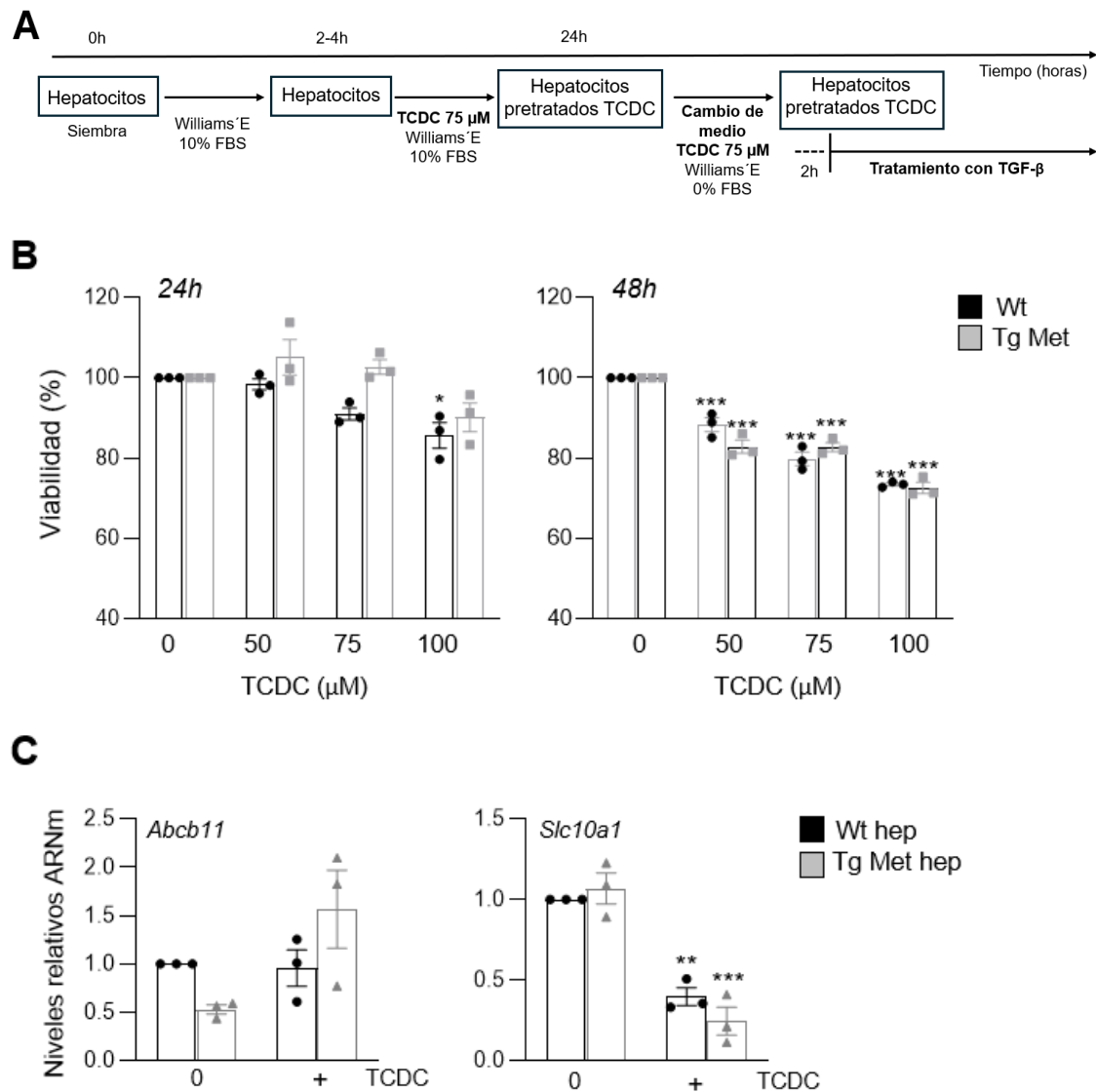


Figura 38. Presentación y validación del modelo de hepatocitos Wt y Tg Met *in vitro* pretratados con TCDC 75 μM . **A.** Esquema gráfico del protocolo de tratamiento de los hepatocitos con TCDC a 75 μM . **B.** Viabilidad celular en hepatocitos Wt y Tg Met tratados con TCDC a 50, 75 y 100 μM durante 24h (panel izquierdo) y 48h (panel derecho) analizada mediante tinción con cristal violeta. Los datos son la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. **C.** Niveles de expresión de *Abcb11* y *Slc10a1* en extractos de ARNm total de hepatocitos Wt y Tg Met tratados con TCDC durante 24h, determinados mediante RT-qPCR. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Los datos son la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. *** = $p < 0,001$ respecto de su control no tratado o como se indica.

Se estudió la expresión de genes de transportadores de sales biliares *Abcb11* (que codifica para BSEP) y *Slc10a1* (que codifica para NTCP) con el fin de evaluar su modulación durante 24h con 75 μ M de TCDC (**Figura 38C**) como prueba de la respuesta a la sal biliar *in vitro*. Durante el tratamiento de los hepatocitos con TCDC no se observan cambios estadísticamente significativos en la expresión de *Abcb11* entre ambos tipos celulares. Sin embargo, el gen *Slc10a1* a 24h de tratamiento con TCDC muestra una disminución significativa de sus niveles en ambos tipos de hepatocitos.

Una vez puesto a punto este modelo de colestasis *in vitro*, estábamos en disposición de analizar si en este contexto, en presencia de TCDC, podríamos observar los cambios a nivel de respuesta a TGF- β debido a la sobreexpresión de Met que observamos *in vivo*.

En primer lugar, se analizó la expresión de receptores de TGF- β en los hepatocitos Wt y Tg Met pretratados con TCDC y tratados con TGF- β durante 24h (**Figura 39A**). La expresión de los tres receptores analizados, *Tgfr1*, *Tgfr2* y *Tgfr3*, sigue un patrón similar en hepatocitos Wt, observándose un aumento (aunque no alcanza significatividad) en la expresión por el tratamiento con TCDC+TGF- β , que no se observa en los hepatocitos Tg Met, y que da lugar a una regulación diferencial significativa entre Wt y Tg Met para *Tgfr1* y *Tgfr3*. A continuación se analizaron *Smad7* y *Serpine1*, en estas mismas condiciones, como genes diana de la vía de TGF- β (**Figura 39B**). En los hepatocitos tratados con TCDC y TGF- β los niveles de *Smad7* y de *Serpine1* aumentaban con respecto a los controles en los hepatocitos Wt, mientras que la sobreexpresión de Met impedía o aminoraba este efecto, siendo las diferencias entre Wt y Tg Met estadísticamente significativas en el caso de *Serpine1*.

Para evaluar si la atenuación de la señalización de TGF- β en hepatocitos Tg Met pretratados con TGF- β podría tener una correlación con cambios a nivel funcional, se analizó la inducción de apoptosis por TGF- β . Para ello, se trataron hepatocitos Wt y Tg Met con TCDC y con TGF- β y se determinó la actividad caspasa-3. Los datos mostrados en la **figura 39C** indican que el tratamiento conjunto de TCDC + TGF- β aumenta la actividad caspasa-3 en hepatocitos Wt, estando este efecto impedido en hepatocitos Tg Met. De acuerdo con estos datos, el análisis de viabilidad tras la adición de TGF- β tanto a 2 como a 5 ng/ml sobre los hepatocitos pretratados con TCDC evidencia una reducción de la viabilidad con diferencias estadísticamente significativas entre hepatocitos Wt y Tg Met, siendo la reducción de viabilidad en los hepatocitos Wt mayor que en los Tg Met (**Figura 39D**).

En conjunto, estos datos *in vitro* demuestran que en condiciones de daño colestásico los hepatocitos Tg Met son más resistentes a muerte que los Wt, apoyando los resultados obtenidos *in vivo* en ratones tratados con la dieta DDC, que indicaban un mayor daño en ratones Wt.

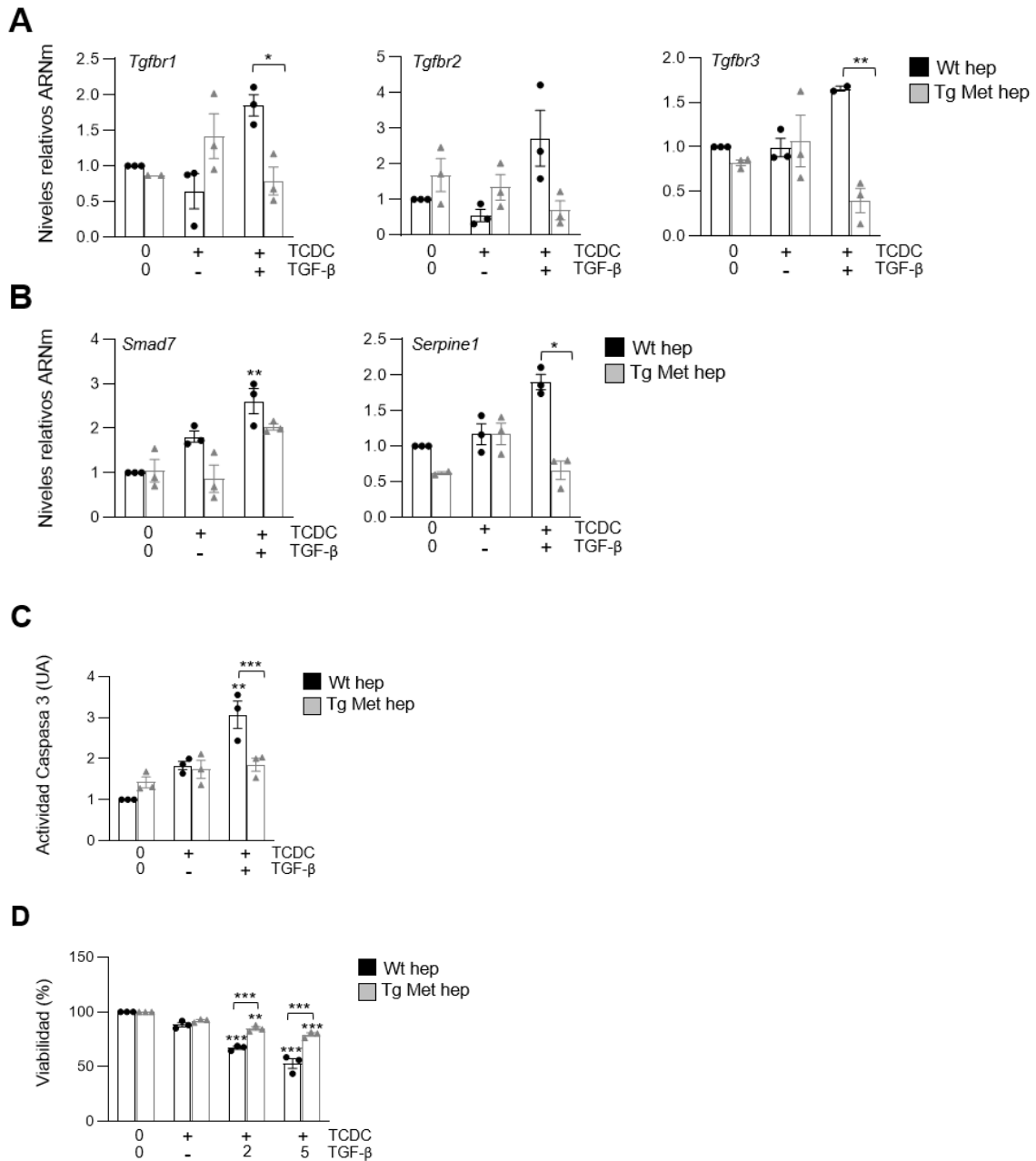


Figura 39. Análisis de la vía de TGF-β en hepatocitos Wt y Tg Met pretratados con TCDC y TGF-β. **A.** Niveles de expresión de *Tgfb1*, *Tgfb2* y *Tgfb3* en extractos de ARNm total de hepatocitos Wt y Tg Met tratados con TCDC 75 μM y 5 ng/ml de TGF-β durante 24h, determinados mediante RT-qPCR. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Los datos son la media ± S.E.M. de 3 experimentos independientes. **B.** Niveles de expresión de *Smad7* y *Serpine1* en extractos de ARNm total de hepatocitos Wt y Tg Met tratados con TCDC 75 μM y 5 ng/ml de TGF-β durante 8h (*Smad7*) y 24h (*Serpine1*), determinados mediante RT-qPCR. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Los datos son la media ± S.E.M. de 3 experimentos independientes. **C.** Actividad caspasa 3 en extractos proteicos de hepatocitos Wt y Tg Met tratados con TCDC 75 μM y 5 ng/ml de TGF-β analizada mediante ensayo de fluorescencia. Los datos se normalizaron con respecto a la concentración de proteínas de cada extracto y son la media ± S.E.M. de 3 experimentos independientes. **D.** Viabilidad celular de hepatocitos Wt y Tg Met tratados con TCDC 75 μM y 2 o 5 ng/ml de TGF-β durante 24h. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001 respecto de su control no tratado o como se indica.

1.5 La sobreexpresión de Met promueve una respuesta antioxidante potente frente al daño colestásico.

Dada la importancia de los fenómenos de estrés oxidativo descritos en enfermedad colestásica y daño hepático (He F. et al., 2020; Zhang Y. et al., 2020)., y dado que nuestro grupo y otros han descrito que el TGF- β es un potente inductor de ROS en células hepáticas, y la ruta de HGF/Met protege frente al daño oxidativo (Sánchez A., et al., 1996; Herrera B. et al., 2001; Carmona-Cuenca I. et al., 2008; Gómez-Quiroz L. E., et al., 2008; Martínez Palacian A. et al., 2013; Crossas-Molist E. et al., 2015), decidimos evaluar el status de estrés oxidativo en hepatocitos *in vitro* en las condiciones experimentales descritas previamente. Para empezar, se realizó un análisis de la producción de ROS en hepatocitos Wt y Tg Met tratados con TGF- β durante diferentes periodos de tiempo para lo que se usó la sonda DCFH-DA (**Figura 40**).

Los datos reflejan que el TGF- β no provocaba grandes cambios en la producción de ROS en ninguno de los tipos celulares objeto de estudio, solo se detectó un pequeño pico de producción de ROS a 8h de tratamiento en ambos tipos celulares que no llegó a presentar significatividad estadística (**Figura 40A**). Cuando se realizó el mismo abordaje, pero con hepatocitos pretratados con TCDC, los hepatocitos Wt presentaron un pico de producción de ROS a los 30 minutos de tratamiento con TGF- β , pico que no se observó en los hepatocitos Tg Met (**Figura 40B**). Se muestran imágenes representativas de microscopía de fluorescencia correspondientes a hepatocitos tratados durante 30 minutos con TGF- β (5 ng/ml) con o sin pretratamiento con TCDC (75 μ M) (**Figura 40C**).

Como aproximación experimental complementaria para confirmar el papel esencial de la vía de Met en las diferencias observadas en la producción de ROS en respuesta a TGF- β entre los hepatocitos Wt y Tg Met, se trataron hepatocitos Wt de forma crónica con HGF (40 ng/ml, durante 7 días), y posteriormente se trataron con TGF- β y se evaluó el contenido intracelular de ROS (**Figura 40D**). Los hepatocitos mantenidos en presencia de HGF no muestran diferencias significativas respecto de los no tratados (condición basal) en cuanto a sus niveles de ROS en respuesta al TGF- β . Sin embargo, cuando se realizó el mismo experimento, pero en presencia de TCDC, se pudo comprobar que el tratamiento crónico con HGF evita el pico de ROS producido por TGF- β en los hepatocitos Wt (**Figura 40E**). Paralelamente, se analizaron los niveles de proteínas carboniladas como marcador de daño oxidativo (**Figura 40F**). Los niveles de proteínas carboniladas son superiores en hepatocitos Wt en comparación con los Tg Met cuando los hepatocitos son pretratados con TCDC e incubados con TGF- β , siendo esta diferencia estadísticamente significativa. De este modo, se puede concluir que la activación de la vía de Met, bien por sobreexpresión de Met o por pretratamiento con HGF, contribuye a la protección frente al daño oxidativo inducido en hepatocitos por TGF- β en condiciones de daño colestásico.

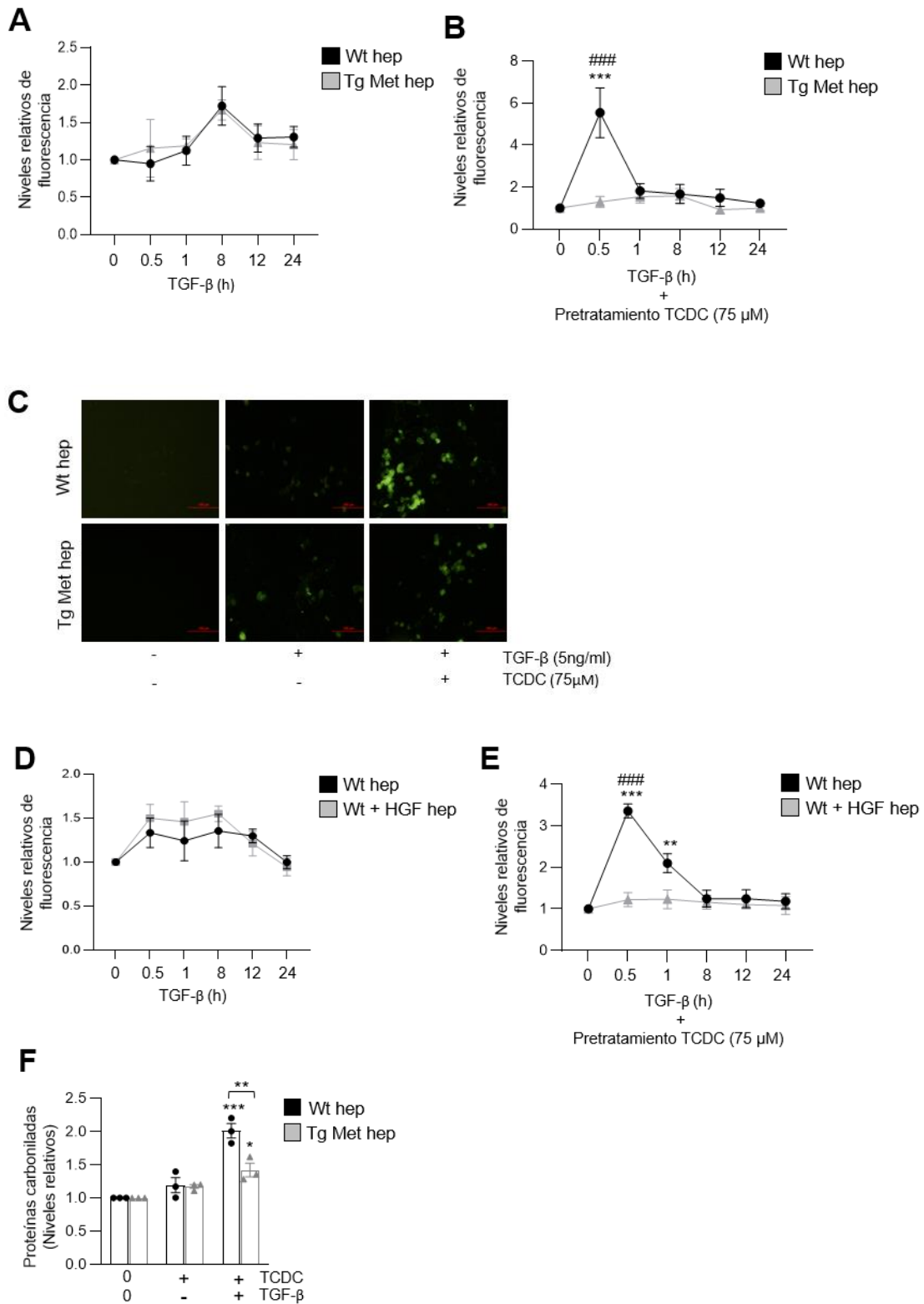


Figura 40. Análisis del estrés oxidativo inducido por TGF-β en hepatocitos Wt y Tg Met. A-B. Intensidad de fluorescencia tras incubación con DCFH-DA en hepatocitos Wt y Tg Met tratados con TGF-β (5 ng/ml) a diferentes tiempos, en un intervalo total de 24h, sin pretratamiento (A) o con pretratamiento con TCDC (75 μM) (B). Los datos se expresan por μg de proteína, y son la media ± S.E.M de 6 experimentos independientes. C. Se muestran imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (panel izquierdo) correspondientes a hepatocitos tratados durante

30 minutos con TGF- β (5 ng/ml) con o sin pretratamiento con TCDC (75 μ M). Barra de escala: 100 μ m. **D-E.** Intensidad de fluorescencia tras incubación con DCFH-DA en hepatocitos Wt tratados crónicamente con HGF (40 ng/ml durante 7 días) y posteriormente tratados con TGF- β (5 ng/ml) durante diferentes periodos de tiempo, en un intervalo total de 24h, sin pretratamiento (**D**) o con pretratamiento con TCDC (75 μ M) previo a la adición del TGF- β (**E**). Los datos se expresan por μ g de proteína, y son la media \pm S.E.M de 6 experimentos independientes. **F.** Niveles de proteínas carboniladas en hepatocitos Wt y Tg Met pretratados con TCDC (75 μ M) y tratados con TGF- β (5 ng/ml) durante 24 h. Los datos se expresan por μ g de proteína, y son la media \pm S.E.M de 6 experimentos independientes * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ respecto de su control no tratado o como se indica. En (**E**) ***/### = $p < 0,001$ respecto de su control no tratado (*) o en la misma condición Wt vs Tg Met (#).

Estos hallazgos nos impulsaron a analizar más en profundidad el mecanismo por el cual Met promueve la protección frente al estrés oxidativo inducido por TGF- β en estas condiciones. Así, se analizó la expresión del gen *Nox4*, que codifica para la enzima NADPH oxidasa 4, implicada en procesos de proliferación, formación de ROS y regeneración hepática (Herranz-Iturbide M., et al., 2020). Además, se ha descrito que el HGF regula los niveles de NADPH oxidasas en hepatocitos (Clavijo-Cornejo D. et al., 2013). Sin embargo, en nuestro modelo experimental no se observaron cambios significativos tras tratamiento con TGF- β en presencia de TCDC (**Figura 41**).

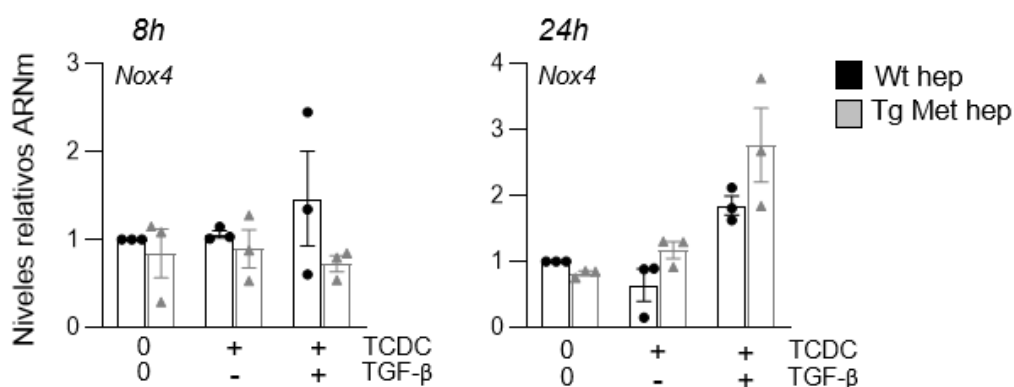


Figura 41. Análisis de la expresión de *Nox4* en hepatocitos Wt y Tg Met pretratados con TCDC. Niveles de expresión de *Nox4* en extractos de ARNm total de hepatocitos Wt y Tg Met pretratados con TCDC 75 μ M y tratados con TGF- β (5 ng/ml) durante 8h (panel izquierdo) y 24h (panel derecho), analizados mediante RT-qPCR. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Datos de 3 experimentos independientes (media \pm S.E.M.).

Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de genes de enzimas antioxidantes y del gen *Nfe2l2* (NRF2) para evaluar el estado de las vías y los mecanismos antioxidantes en los hepatocitos pretratados con TCDC y tratados con TGF- β (5 ng/ml) durante 24h (**Figura 42**).

Los niveles de expresión de *Sod1* y *Sod2*, genes que codifican para las enzimas superóxido dismutasa tipo 1 y 2 (SOD1 y SOD2), respectivamente, no muestran cambios estadísticamente significativos en las condiciones analizadas. Sin embargo, la expresión de *Gsr*, que codifica para la enzima glutatión S reductasa (GSR), así como de *Gclc* (que codifica para la GCLC: subunidad catalítica de la enzima γ -glutamyl cisteína ligasa) y *Gss*, que codifica para la enzima glutatión sintetasa (GS), muestra un aumento

en los hepatocitos Tg Met pretratados con TCDC y tratados con TGF- β , con respecto al control, que se observa más notablemente en el caso de *Gclc* y *Gss*.

También se analizó el gen *Nfe2l2*, que codifica para el factor NRF2, como elemento clave en la regulación de la respuesta antioxidante. La expresión de este gen aumenta significativamente cuando se expone a los hepatocitos a TGF- β bajo pretratamiento con TCDC, pero este aumento es mucho mayor en los hepatocitos Tg Met, en comparación a los Wt.

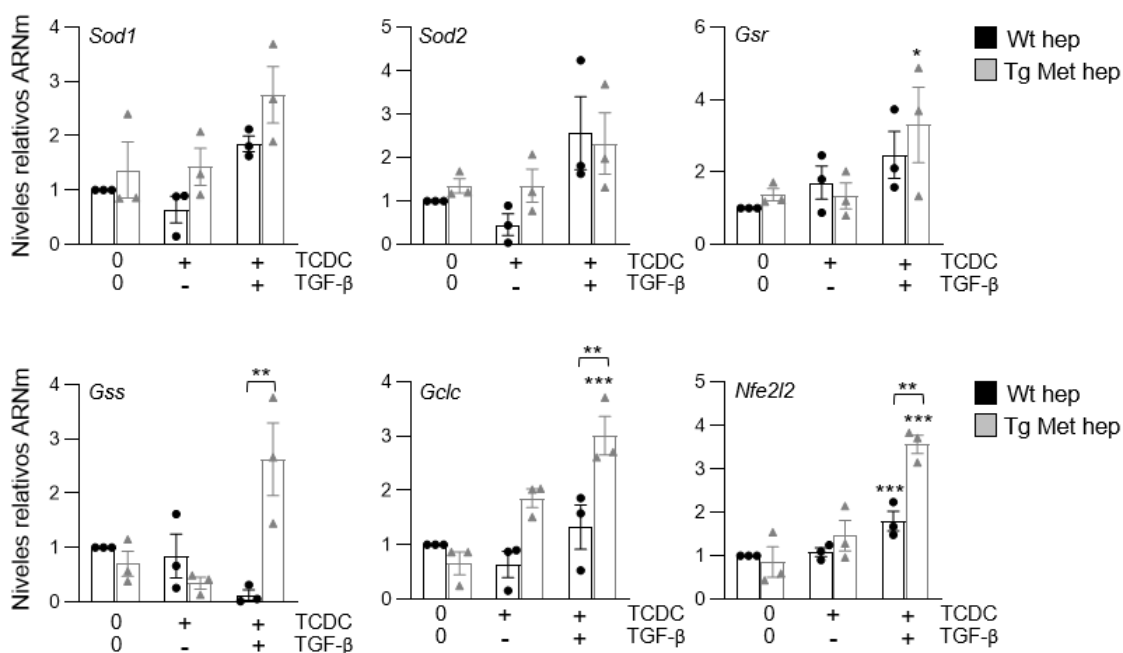


Figura 42. Análisis de la expresión de genes antioxidantes en hepatocitos Wt y Tg Met pretratados con TCDC. Niveles de expresión de genes antioxidantes, *Sod1*, *Sod2*, *Gsr*, *Gcs*, *Gclc* y *Nfe2l2* en extractos de ARNm total de hepatocitos Wt y Tg Met pretratados con TCDC 75 μ M y tratados con TGF- β (5 ng/ml) durante 24h analizados mediante RT-qPCR. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Se representa la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ respecto de su control no tratado o como se indica.

Para un análisis más exhaustivo, se analizó la actividad enzimática de algunas de las enzimas antioxidantes que se habían analizado a nivel de expresión. Sin embargo, ninguna de las actividades analizadas (SOD, Catalasa y GSR) mostró diferencias significativas entre hepatocitos Wt y Tg Met (Figura 43A), en consonancia con los resultados obtenidos de expresión génica.

Por último, se quiso determinar si los cambios a nivel de la expresión génica observados en el sistema antioxidante de glutatión se veían reflejados en cambios en el contenido intracelular de este tripéptido. Al analizar el contenido de glutatión total (GSH+GSSG) (Figura 43B), se pudo observar que los hepatocitos Wt presentaban una reducción significativa de los niveles de glutatión total cuando eran tratados con TCDC y TGF- β . Sin embargo, esto no ocurre en hepatocitos Tg Met en las mismas condiciones, por el contrario, en éstos los niveles aumentan respecto de su control y son marcadamente superiores a los observados en los hepatocitos Wt.

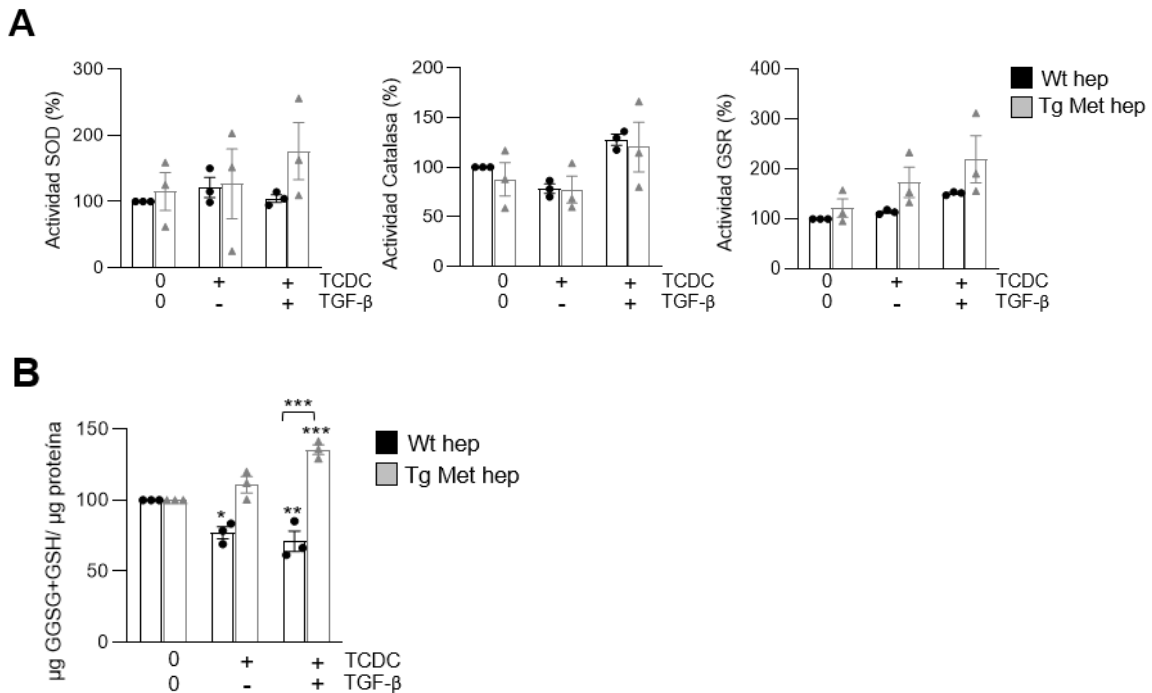


Figura 43. Análisis de la actividad de enzimas antioxidantes y los niveles de glutatión total en hepatocitos Wt y Tg Met pretratados con TCDC. **A.** Actividad enzimática de Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa, y Glutatión S reductasa (GSR) en hepatocitos Wt y Tg Met pretratados con TCDC (75 μ M) y posteriormente tratados con TGF- β (5 ng/ml) durante 24 horas, determinada mediante espectrofotometría. Los datos se expresan por μ g de proteína, y son la media \pm S.E.M de 3 experimentos independientes. **B.** Niveles de glutatión total (GSH+GSSG) en hepatocitos Wt y Tg Met pretratados con TCDC (75 μ M) y posteriormente tratados con TGF- β (5ng/ml) durante 24 horas, determinados mediante ensayo de fluorescencia. Los datos se expresan por μ g de proteína, y son la media \pm S.E.M de 3 experimentos independientes * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ respecto de su control no tratado o como se indica.

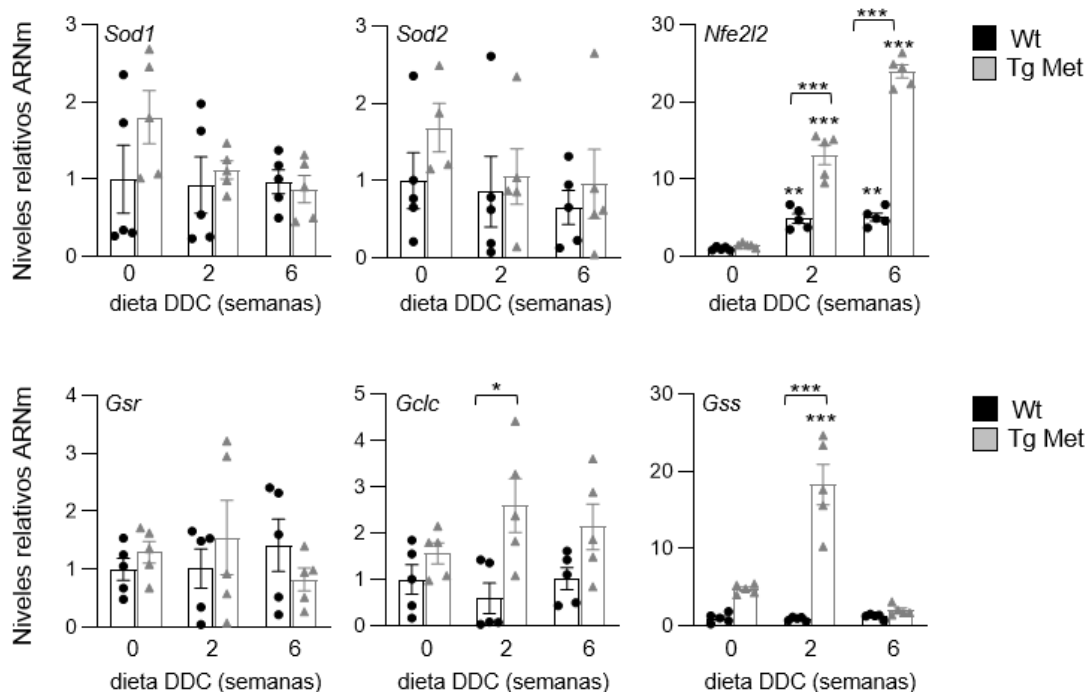
En conjunto, los análisis realizados en hepatocitos Wt y Tg Met, *in vitro*, indicaban que la sobreexpresión de Met aumenta la capacidad antioxidante de los hepatocitos en las condiciones estudiadas. Estos hallazgos nos llevaron a analizar si esto también podría estar ocurriendo *in vivo* en nuestro modelo de colestasis inducida por DDC.

Para evaluar esta hipótesis, se analizaron los niveles de expresión de genes de enzimas antioxidantes y el factor de transcripción *Nfe2l2* en hígados de ratones Wt y Tg Met sometidos a la dieta DDC durante 2 o 6 semanas. En la **figura 44A** puede observarse que no hay una modulación diferencial en la expresión de *Sod1* y *Sod2* durante la dieta colestásica ni tampoco entre ratones Wt y Tg Met. Sin embargo, la expresión de *Nfe2l2*, (NRF2) aumenta en los hígados de ratones tratados, siendo este aumento significativamente superior en hígados Tg Met, que alcanzan, a 2 semanas de tratamiento, niveles hasta 12-15 veces superiores a su expresión basal, y hasta 23 veces superiores a la condición basal, a 6 semanas. En cuanto a las enzimas involucradas en el metabolismo del glutatión, la expresión de *Gsr* no sufre cambios, mientras que los niveles de *Gclc* y *Gss* a 2 semanas de dieta DDC están aumentados en los hígados Tg Met siendo este cambio estadísticamente significativo frente al Wt.

Para completar este análisis se procedió a la determinación del contenido hepático de GSH, GSSG, glutatión total (GSH+GSSG) y la relación GSH/GSSG en nuestro modelo experimental (**Figura 44B**). En hígados Wt se observa un aumento de los niveles de glutatión total, pero no de la relación GSH/GSSG, que incluso tiende a disminuir, debido a que hay un predominio de GSSG frente a GSH. Sin embargo, los hígados Tg Met muestran niveles basales de glutatión total superiores a los Wt, y además se observa un aumento significativo del GSH, pero no GSSG, con la dieta DDC, que se traduce en un aumento en los niveles de glutatión total y la ratio GSH/GSSG, con respecto a los hígados Wt. Finalmente, se analizó el contenido en ROS en extractos de tejidos hepático, mediante ensayo de fluorescencia con la sonda DCFH-DA (**Figura 44C**). Se observa un aumento de los niveles hepáticos de ROS tras la dieta, alcanzándose diferencias significativas a 6 semanas de tratamiento en los hígados Wt. Este aumento significativo de los ROS no se observa en el hígado de ratones Tg Met, por lo que a 6 semanas de dieta las diferencias entre los hígados Wt y Tg Met son también significativas.

En resumen, el estudio realizado en los hígados de ratones Wt y Tg Met sometidos a daño colestásico por la dieta DDC evidencia que la sobreexpresión de Met promueve una respuesta antioxidante más eficiente que contribuye a la defensa frente al estrés oxidativo inducido durante el daño, destacando en particular un cambio en la ratio GSH/GSSG, en favor del GSH, que podría contrarrestar el daño oxidativo inducido por TGF- β en hepatocitos, y ser así el responsable de la reducción del daño hepático en ratones Tg Met.

A



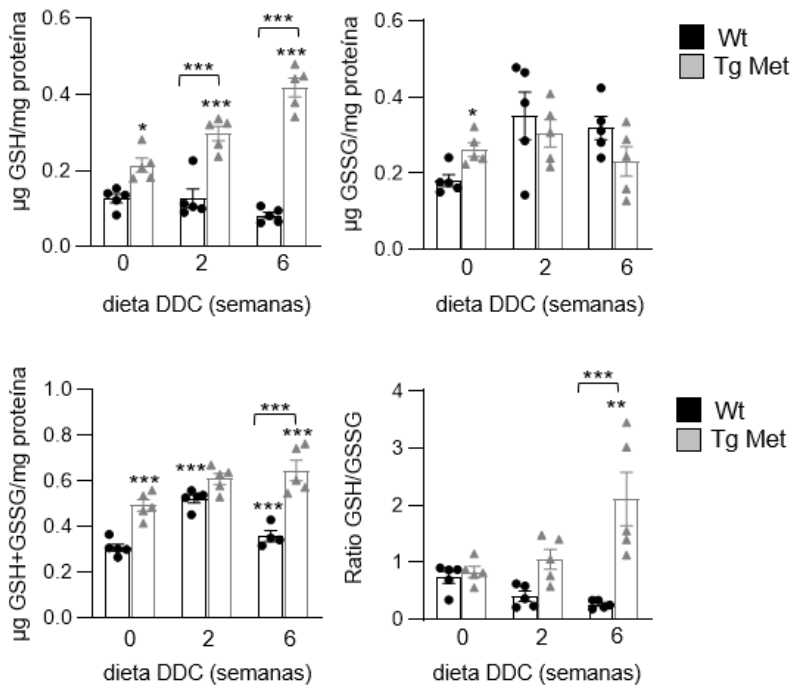
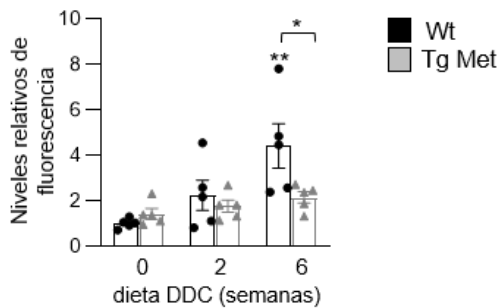
B**C**

Figura 44. Análisis del estado oxidativo en el hígado de ratones Wt y Tg Met sometidos a una dieta DDC. A. Niveles de expresión de genes antioxidantes, *Sod1*, *Sod2*, *Nfe2l2*, *Gsr*, *Gclc* y *Gss*, en extractos de ARNm total de hígado de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas con dieta DDC, determinados mediante RT-qPCR. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Se representa la media \pm S.E.M. (n= 3-5). **B.** Niveles de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), glutatión total (GSH+GSSG) y la ratio GSH/GSSG en extractos proteicos de hígados de ratones Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas con dieta DDC, determinados mediante ensayo de fluorescencia. Los datos se expresan por mg de proteína. Se representa la media \pm S.E.M. (n= 3-5). **C.** Niveles de ROS en hígados Wt y Tg Met tras 0, 2 y 6 semanas de dieta DDC. Se empleó la sonda DCFH-DA para la detección de ROS mediante ensayo de fluorescencia. Los datos se expresan por mg de proteína. Se representa la media \pm S.E.M. (n= 3-5). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ respecto de su control no tratado o como se indica.

2. Determinación de genes regulados por la vía HGF/Met en CPH/OC.

2.1 Análisis transcriptómico de los genes modulados por HGF en células ovas.

Diferentes trabajos, incluyendo algunos de nuestro grupo de investigación han evidenciado el papel clave de la vía de HGF/Met en la regulación de las CPH/OC (del Castillo G. et al., 2008; Martínez-Palacián A. et al., 2013; Suárez-Causado A., et al, 2015; Almalé L. et al., 2019; Addante, A. et al., 2020; Huang Y. et al., 2019). Estas evidencias abren un amplio campo de estudio, ya que esta vía de señalización puede modular el comportamiento de estas células en diferentes contextos fisiopatológicos, como la respuesta regenerativa frente a un daño colestásico, e impactar de forma significativa en la evolución y el desenlace del proceso.

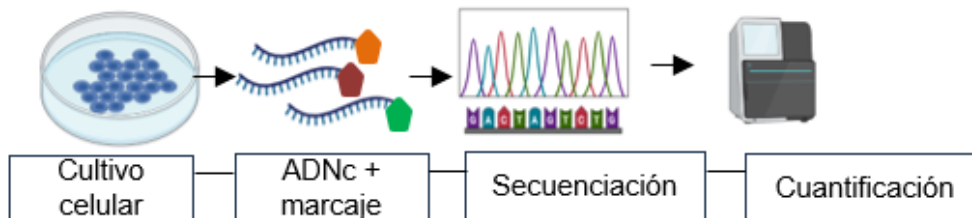


Figura 45. Esquema modelo de análisis de la expresión génica mediante MACE. Los diferentes tipos celulares se cultivaron y se trataron o no con HGF (40 ng/ml) durante 24h, posteriormente se extrajo el ARNm total de las células; convertido a ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa. El ADNc se ancla a una matriz de estreptavidina por el extremo 3'-biotina. Los ADNc se rompen en fragmentos de tamaño comprendido entre 50-500 pb y los fragmentos no anclados se descartan. Posteriormente son secuenciados por secuenciación de última generación (NGS) empezando por el sitio de fragmentación, generando secuencias (*tags*) de 50 a 500 pb. Las *tags* son ensambladas en *contigs* (conjunto de segmentos o secuencias de ADN que se superponen de forma parcial de tal forma que colectivamente forman una representación continua de una región genómica), de manera que todas las secuencias se pueden anotar a entradas de bases de datos y cuantificarlo. Este proceso se realizó por el propio laboratorio externo (GenXPro).

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la regulación de estas células, entender y clarificar su participación durante el daño colestásico y su implicación en la respuesta regenerativa hepática, nos propusimos determinar qué genes eran modulados por la vía de HGF/Met en las CPH/OC. Para ello, se propuso un análisis de expresión génica masivo mediante la tecnología MACE (*Massive Analysis of cDNA Ends*) (Figura 45), previamente descrita en el apartado de materiales y métodos, y llevada a cabo en un laboratorio externo (GenXPro), tecnología que permite estudiar con alta resolución los transcritos de expresión baja y media, que son generalmente indetectables mediante microarrays y otras técnicas convencionales de RT-qPCR. Este análisis podría proporcionar dianas específicas de acción para la modulación de las CPH/OC y por tanto la modulación de la respuesta hepática en diferentes contextos.

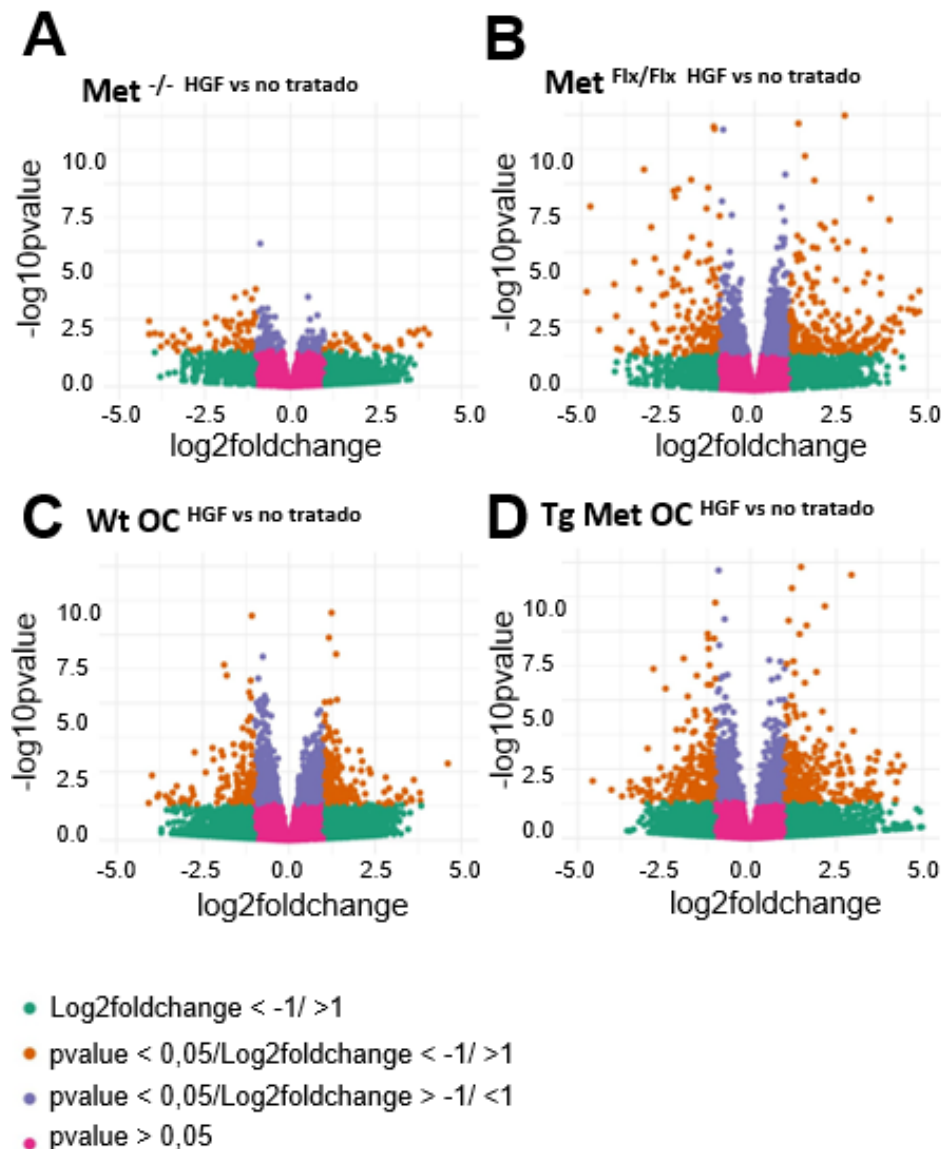


Figura 46. Diagrama de puntos. Análisis de la regulación de genes en CPH/OC por el tratamiento con HGF. Expresión de genes en CPH/OC $Met^{-/-}$ (A), $Met^{flx/flx}$ (B), Wt (C) y Tg Met (D) tras tratamiento con HGF (40 ng/ml) durante 24h. Se muestran los valores de Log_2 foldchange (eje X) y $-\log_{10}$ p valor (p value) (eje Y).

Para dicho análisis se seleccionaron diferentes tipos de células ovales: $Met^{-/-}$, $Met^{flx/flx}$, Wt y Tg Met OC que se trataron o no con HGF durante 24h (Figura 46). Las células $Met^{flx/flx}$ son células que tienen un receptor Met intacto, y perfectamente funcional, y se han validado funcionalmente en publicaciones previas del grupo (del Castillo G. et al., 2008). Las células $Met^{-/-}$ son células que carecen de la actividad tirosina quinasa del receptor Met y que proceden de las células $Met^{flx/flx}$, y se usaron como control negativo, con el fin de seleccionar genes dependientes de la activación de la vía canónica de HGF. Las células Wt se emplearon como control de las células Tg Met, y éstas últimas se emplearon con el fin de evaluar si la sobreexpresión de Met acentuaba la modulación de algunos genes durante el tratamiento con HGF respecto del Wt. De este ensayo se obtuvieron los principales genes regulados en cada condición de estudio comparados con su base de datos propia. Se identificaron gracias a este análisis un total de 22315

genes pertenecientes a la especie de *Mus musculus* potencialmente regulados en las condiciones estudiadas. Se realizó un cribado con la plataforma Galaxy.org® para seleccionar sólo aquellas diferencias significativas (con un p valor inferior a 0,05, en inglés *p value*) y que el valor de *Log2foldchange* fuera menor o igual a 1 o -1, de esta forma se seleccionan aquellos genes que al menos su expresión aumenta o disminuye 2 veces (escala logarítmica) y esta diferencia fuera significativa estadísticamente. En la **figura 46**, se muestran en un gráfico de puntos tipo volcán (*Volcano plot*) aquellos genes que cumplen el criterio anteriormente descrito.

Las CPH/OC $Met^{-/-}$ poseen un receptor Met sin actividad tirosina quinasa, por tanto, los genes regulados en este tipo celular de forma significativa son aquellos modulados independientemente de la activación y señalización canónica de este receptor. Teniendo en cuenta esto, en el siguiente cribado se eliminaron los genes que se regulaban de forma significativa en las células $Met^{-/-}$ y que también estaban regulados en cualquiera de los otros tipos celulares estudiados.

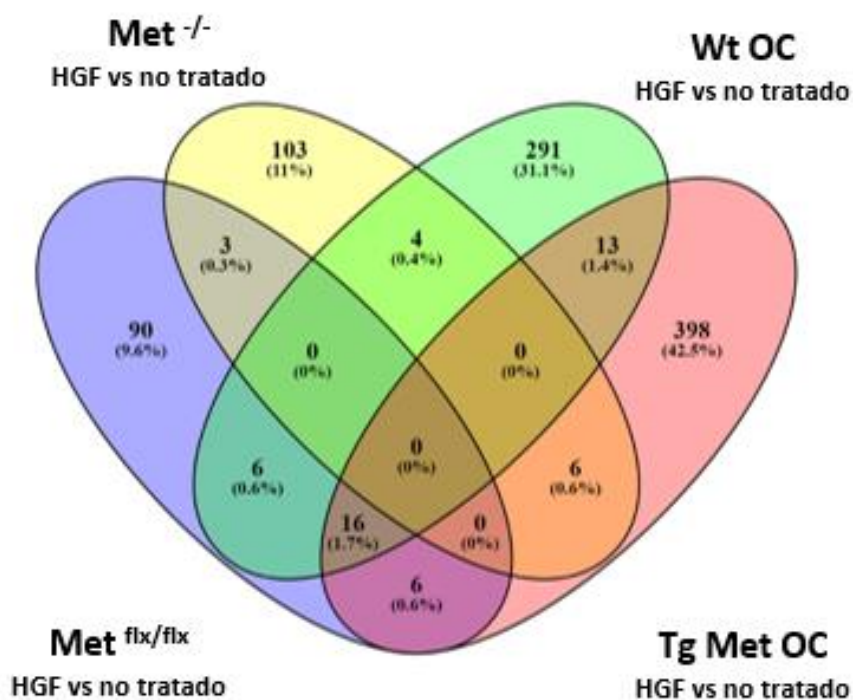


Figura 47. Diagrama de Venn. Expresión diferencial de genes en CPH/OC $Met^{-/-}$, $Met^{flx/flx}$, Wt y Tg Met en respuesta a tratamiento durante 24h con HGF (40 ng/ml) respecto de sus condiciones basales (sin tratamiento).

Se representó el siguiente cribado en un diagrama de tipo *Venn* (**Figura 47**). Se puede observar que atendiendo de forma individual a cada tipo celular (diferente de las células $Met^{-/-}$) el tratamiento con HGF regula de forma significativa numerosos genes, concretamente, 90, 291 y 398, en $Met^{flx/flx}$, Wt, y Tg Met CPH/OC, respectivamente. Además, se observó que un total de 16 genes (alrededor del 1,7% de los genes mapeados) estaban comúnmente regulados de forma significativa en las células $Met^{flx/flx}$, Wt y Tg Met CPH/OC, cuando se trataba con HGF, y no se regulaban en las células $Met^{-/-}$ (**Figura 47**).

De esta forma esos 16 genes se convertían en potenciales dianas de estudio, candidatos a posterior validación para profundizar en su regulación en las CPH/OC y en su papel en la biología de estas células. Se construyó un mapa de calor con los 16 genes diferenciados según el tipo celular y la condición de tratamiento en una gama de colores rojo-azul según su valor de $\log_2\text{Foldchange}$, todos ellos con un p valor igual o inferior a 0,05 (Figura 48).

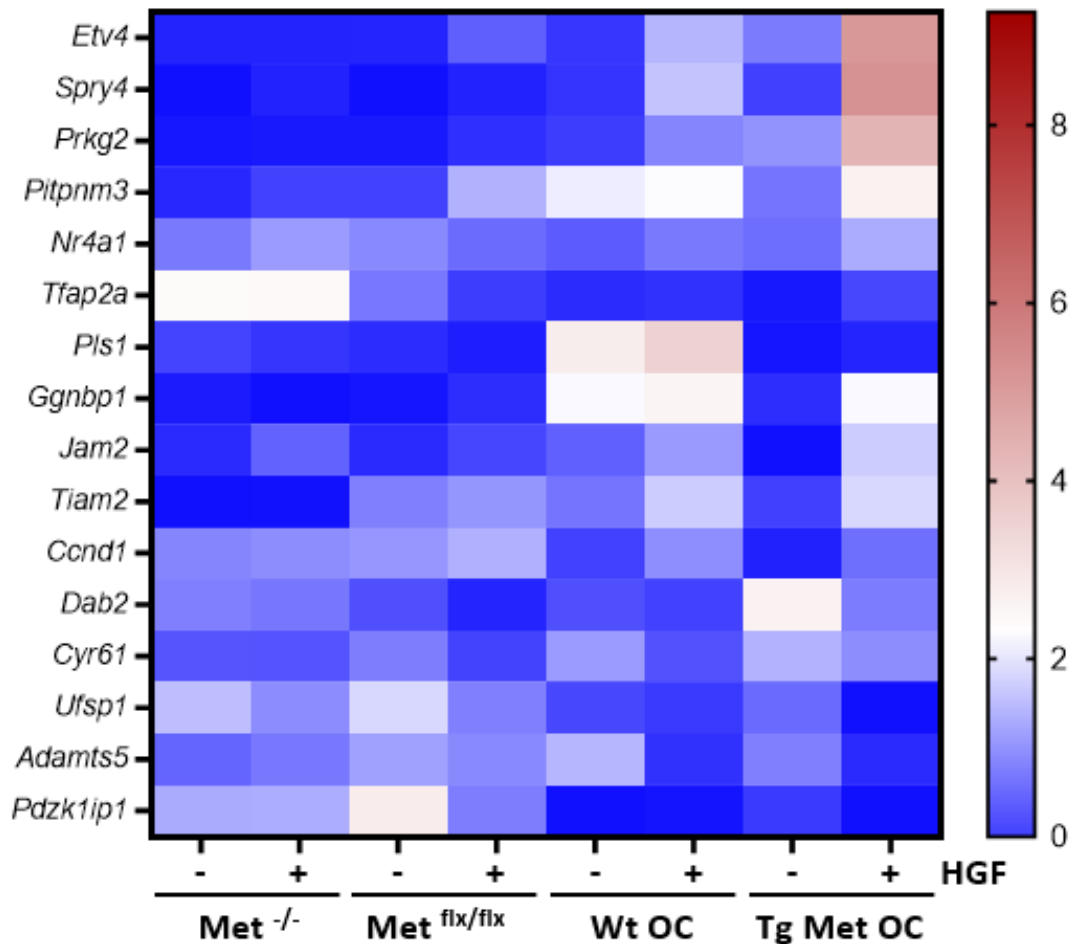
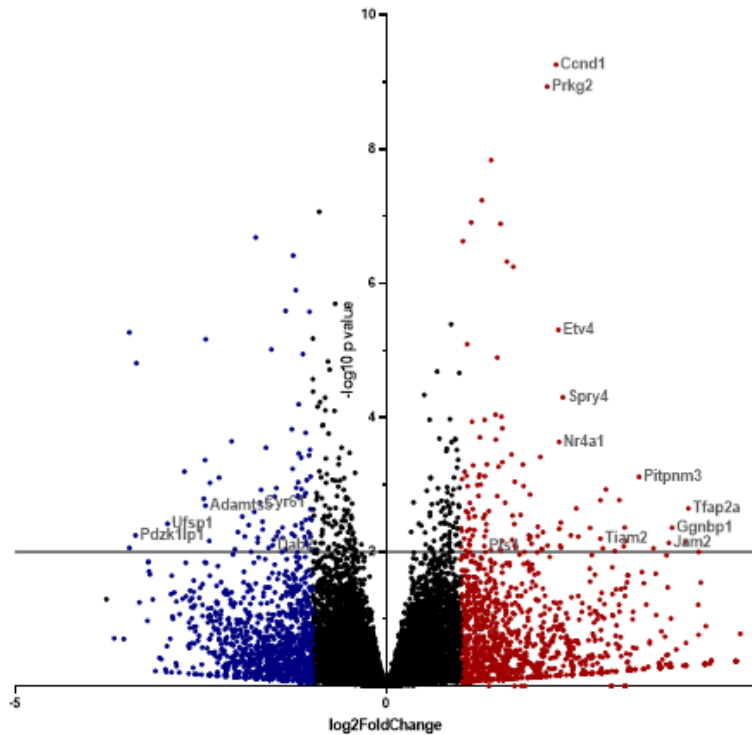
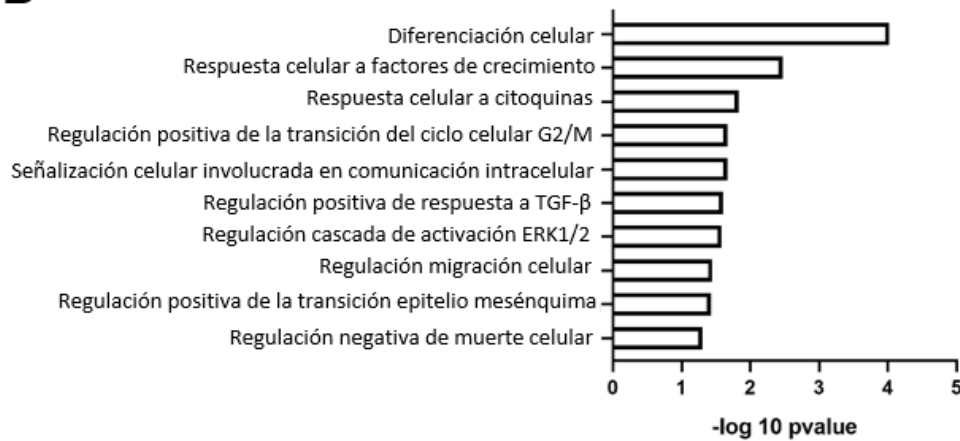


Figura 48. Mapa de calor. Análisis de los niveles de regulación significativa de genes en CPH/OC por tratamiento con HGF. Se representan los niveles de expresión de genes obtenidos mediante MACE en CPH/OC Met^{-/-}, Met^{flx/flx}, Wt y Tg Met tratadas o no con HGF durante 24h en un mapa de calor. Se muestra el valor $\text{Log}_2\text{foldchange}$ obtenido a partir de 3 experimentos independientes por tipo celular. La gama de colores (rojo-azul) está ajustada al valor $\text{Log}_2\text{foldchange}$ mostrado en cada situación respecto de su condición control en cada tipo celular con un p valor igual o inferior a 0,05.

A



B



Proceso Biológico	Genes
Diferenciación celular	<i>Ccnd1, Tfap2a, Pls1, Jam2, Dab2, Etv4, Ggnbp1, Ufsp1, Tiam2, Nr4a1 y Pdzk1ip1</i>
Respuesta celular a factores de crecimiento	<i>Dab2, Prkg2, Adamts5, Cyr61 y Nr4a1</i>
Respuesta celular a citoquinas	<i>Pls1, Spry4, Cyr61 y Adamts5</i>
Regulación positiva de la transición del ciclo celular G2/M	<i>Ccnd1 y Etv4</i>
Señalización celular involucrada en comunicación intracelular	<i>Ccnd1 y Dab2</i>
Regulación positiva de respuesta a TGF-β	<i>Dab2 and Nr4a1</i>
Regulación cascada de activación ERK1/2	<i>Dab2, Prkg2 and Spry4</i>
Regulación migración celular	<i>Tfap2a, Jam2 and Dab2</i>
Regulación positiva de la transición epitelio mesénquima	<i>Dab2, Pitpnm3</i>
Regulación negativa de muerte celular	<i>Tfap2a, Ccnd1, Dab2 and Nr4a1</i>

Figura 49. Análisis de los niveles de regulación de los 16 genes seleccionados en CPH/OC Tg Met por tratamiento con HGF. A. Expresión diferencial de los genes seleccionados, en

células Tg Met tratadas durante 24h con HGF (40 ng/ml) respecto de sus condiciones basales. La gama de colores representada está ajustada respecto de los valores diferenciales de expresión del *Log2foldchange* (azul-negro-rojo) con un p valor (p value) menor de 0,05. **B.** Esquema funcional. Gráfico de barras donde se muestran las principales rutas en las que están implicados los genes regulados de forma significativa por HGF. Eje X (-log10 p value). Eje Y (Rutas biológicas) (panel superior). Genes implicados en cada ruta biológica (panel inferior).

En la **figura 49** se muestra específicamente un *volcano plot* con los 16 genes seleccionados del análisis anterior, en las CPH/OC Tg Met (**Figura 49A**), y su participación en rutas biológicas de interés, obtenido mediante análisis con la plataforma PANTHER® (Gene Ontology) (**Figura 49B**). Se seleccionaron las células Tg Met dado que los cambios en la inducción y regulación a la baja de genes modulados de forma estadísticamente diferencial son mayores respecto a los otros tipos celulares estudiados. Posteriormente, se procedió a la validación de los hallazgos del ensayo MACE en nuestro laboratorio mediante la técnica de RT-qPCR, empleando los mismos extractos que se enviaron al laboratorio externo y nuevos extractos obtenidos en experimentos réplica de los anteriores, es decir en los que las CPH/OC Met^{-/-}, Met^{flx/flx}, Wt y Tg Met fueron tratadas o no con HGF durante 24h y se aisló el RNA total y se llevó a cabo un análisis de los niveles de expresión de los 16 candidatos seleccionados (**Figura 50A y B**).

Para ello, se emplearon cebadores específicos de los 16 genes. De los 16 genes, se encontraron 11 que durante 24h de tratamiento con HGF aumentaban sus niveles respecto de la situación control (**Figura 50A y B**); de tal forma que esos 11 genes mostraban la misma tendencia que lo obtenido mediante la tecnología MACE. Sin embargo, solo en 8 de los genes estudiados se alcanzan diferencias significativas tras el tratamiento con HGF mayoritariamente en las células Tg Met: *Etv4* (*ETS Variant Transcriptor Factor 4*), *Spry4* (*Sprouty RTK Signaling Antagonist 4*), *Prkg2* (*Protein Kinase GMPc dependent 2*), *Pitpnm3* (*Phosphatidylinositol Transfer Protein Membrane 3*), *Ggnbp1* (*Gametogenetin Binding Protein 1*), *Jam2* (*Junctional Adhesion Molecule 2*) *Tiam2* (*T-Lymphoma Invasion And Metastasis-Inducing protein 2*) y *Ccnd1* (*Cyclin D1*). *Nr4a1* (*Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 1*) no llega a presentar diferencias con significatividad estadística en su regulación por HGF, aunque hay una clara tendencia al alza en Met^{flx/flx}, Wt y Tg Met CPH/OC durante el tratamiento. Ni *Tfap2a* (*Transcription Factor Activating Enhancer binding Protein 2 Alpha*) ni *Pls1* (*Plastin 1*) muestran una regulación clara por HGF en ninguna de las líneas celulares.

Otros 5 genes de los 16 seleccionados por MACE, mostraban un patrón opuesto, es decir, se reducía su expresión durante el tratamiento con HGF (**Figura 50B**): *Dab2* (*Disabled 2, mitogen-responsive phosphoprotein*) *Cyr61* (*Cysteine-Rich angiogenic inducer 61*), *Ufsp1* (*Ubiquitin-Fold modifier 1 Specific Protease 1*), *Adamts5* (*A Disintegrin-like and Metalloprotease with Thrombospondin Type 1 Motif 5*) y *Pdzk1ip1* (*PDZK1-interacting protein 1*). En los cuatro genes analizados, se observa una clara tendencia a la disminución de sus niveles de expresión por tratamiento con HGF, en todas las líneas (excepto las células Met^{-/-}) o al menos en dos de las tres líneas de CPH/OC (Wt y Tg Met), aunque la regulación sólo llegó a alcanzar significatividad estadística en el caso de *Dab2* en las Tg Met OC.

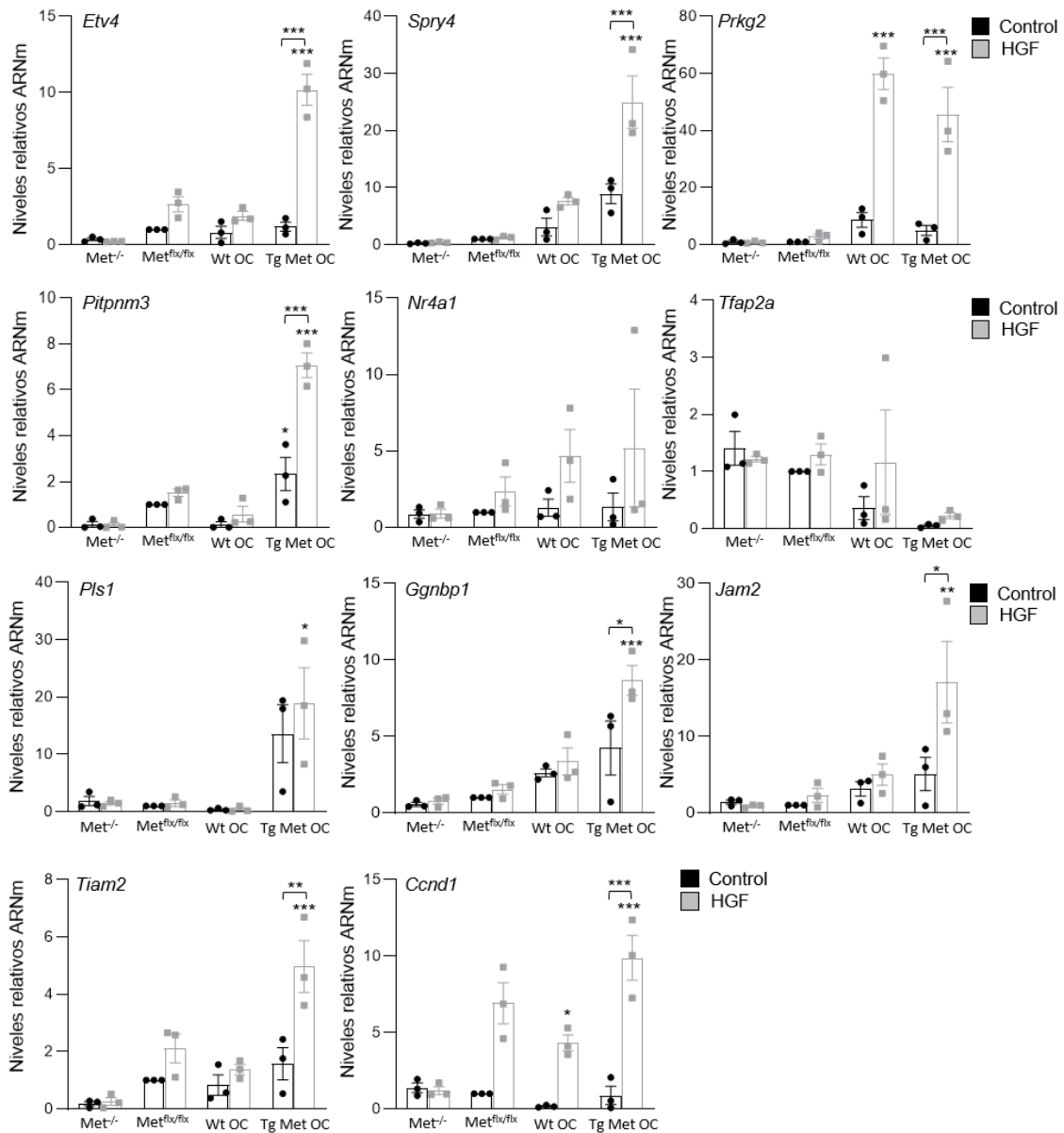


Figura 50A. Validación por RT-qPCR de los genes seleccionados por MACE, modulados por el tratamiento con HGF en CPH/OC. Niveles de expresión de *Etv4*, *Spry4*, *Prkg2*, *Pitpnm3*, *Nr4a1*, *Tfap2a*, *Pls1*, *Ggnbp1*, *Jam2*, *Tiam2* y *Ccnd1* en CPH/OC *Met*^{-/-}, *Met*^{flx/flx}, Wt y Tg *Met* tratadas o no durante 24h con HGF (40 ng/ml), determinados mediante RT-qPCR. Se usó *Gusb* como gen normalizador. Se representa la media ± S.E.M. de 3 experimentos independientes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ respecto de las WT OC control o como se indica.

De forma global, de los genes regulados al alza, 9 de los 11 genes: *Etv4*, *Spry4*, *Prkg2*, *Ggnbp1*, *Pitpnm3*, *Jam2*, *Tiam2*, *Ccnd1* y *Dab2*, muestran una regulación significativa en su expresión por tratamiento con HGF, principalmente en las células Tg *Met*, y por tanto fueron validados. Por el contrario, del resto de los genes regulados a la baja, no se consiguió validar con significación estadística, aunque los resultados sugieren que es solo una cuestión de aumentar la potencia estadística o el tamaño muestral.

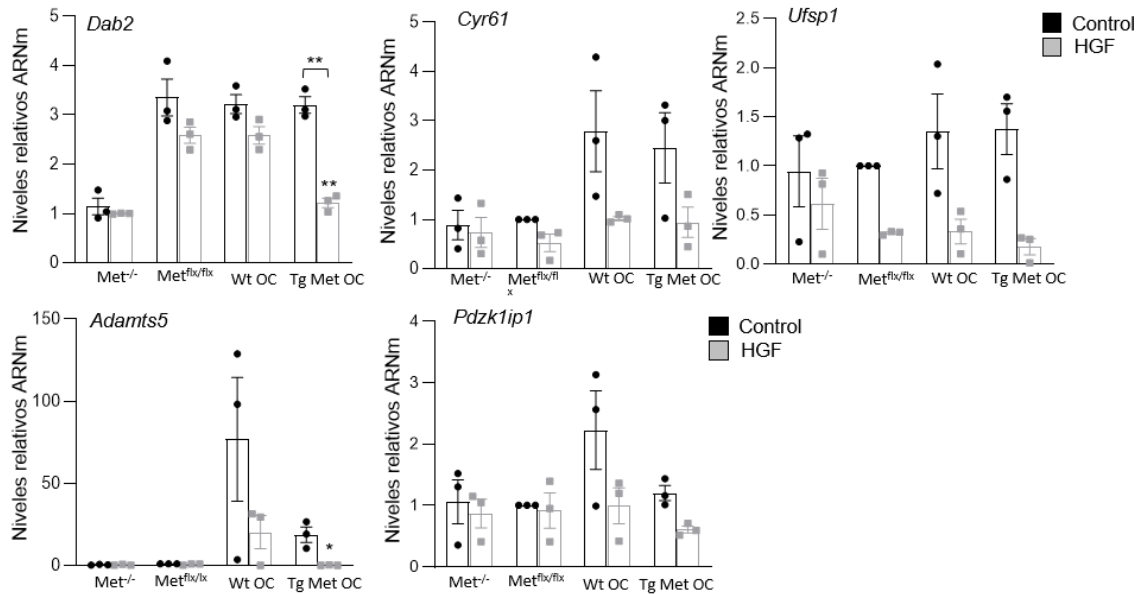


Figura 50B. Análisis de niveles de ARNm de genes durante el tratamiento con HGF. Extractos de ARNm total de CPH/OC Met^{-/-}, Met^{flx/flx}, Wt y Tg Met tratadas durante 24h con HGF a 40 ng/ml respecto de sus condiciones basales. *Dab2*, *Cyr61*, *Ufsp1*, *Adamts5*, y *Pdzk1ip1* fueron determinados mediante RT-qPCR y normalizados con *Gusb*. Se representa la media ± S.E.M. de 3 experimentos independientes. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001 comparados respecto de las Wt OC control o como se indica.

2.2 Análisis de la expresión de los genes diana de HGF en células ovales en el hígado de ratones sometidos a un daño colestásico.

Con el propósito de estudiar la potencial relevancia de los genes diana de HGF identificados en las CPH/OC, en un contexto fisiopatológico, se decidió analizar los genes seleccionados según lo descrito en el apartado anterior, en el modelo de daño colestásico inducido por dieta DDC, dado que la dieta DDC es un modelo reconocido de regeneración asociado a la expansión de CPH/OC (Preisegger K.H. et al., 1999), y además, se ha descrito que la vía de HGF/Met tiene un papel clave en la respuesta regenerativa en este modelo (Ishikawa T. et al., 2012). En la **figura 51**, se muestran los resultados del análisis de algunos genes seleccionados en este modelo *in vivo*. *Prkg2*, *Pitpnm3*, *Cyr61* y *Ccnd1* muestran una inducción de su expresión principalmente a 2 semanas de tratamiento con la dieta DDC. Por el contrario, los genes *Spry4* y *Adamts5* disminuyen sus niveles durante la dieta DDC, con diferencias significativas a 2 semanas de DDC. *Ufsp1* presenta un descenso progresivo de expresión que alcanza significatividad a 6 semanas de DDC. *Etv4* y *Dab2* no muestran cambios significativos en las condiciones analizadas. Por tanto, hay 5 genes (*Prkg2*, *Pitpnm3*, *Ccnd1*, *Adamts5* y *Ufsp1*) que muestran resultados que irían en consonancia con la regulación observada en las CPH/OC *in vitro* mostrada en el apartado anterior, dado que los tres primeros se inducen y los dos últimos se regulan a la baja durante la expansión de CPH/OC inducida por la dieta DDC. *Cyr61* y *Spry4* muestran un perfil contrario a lo observado *in vitro*.

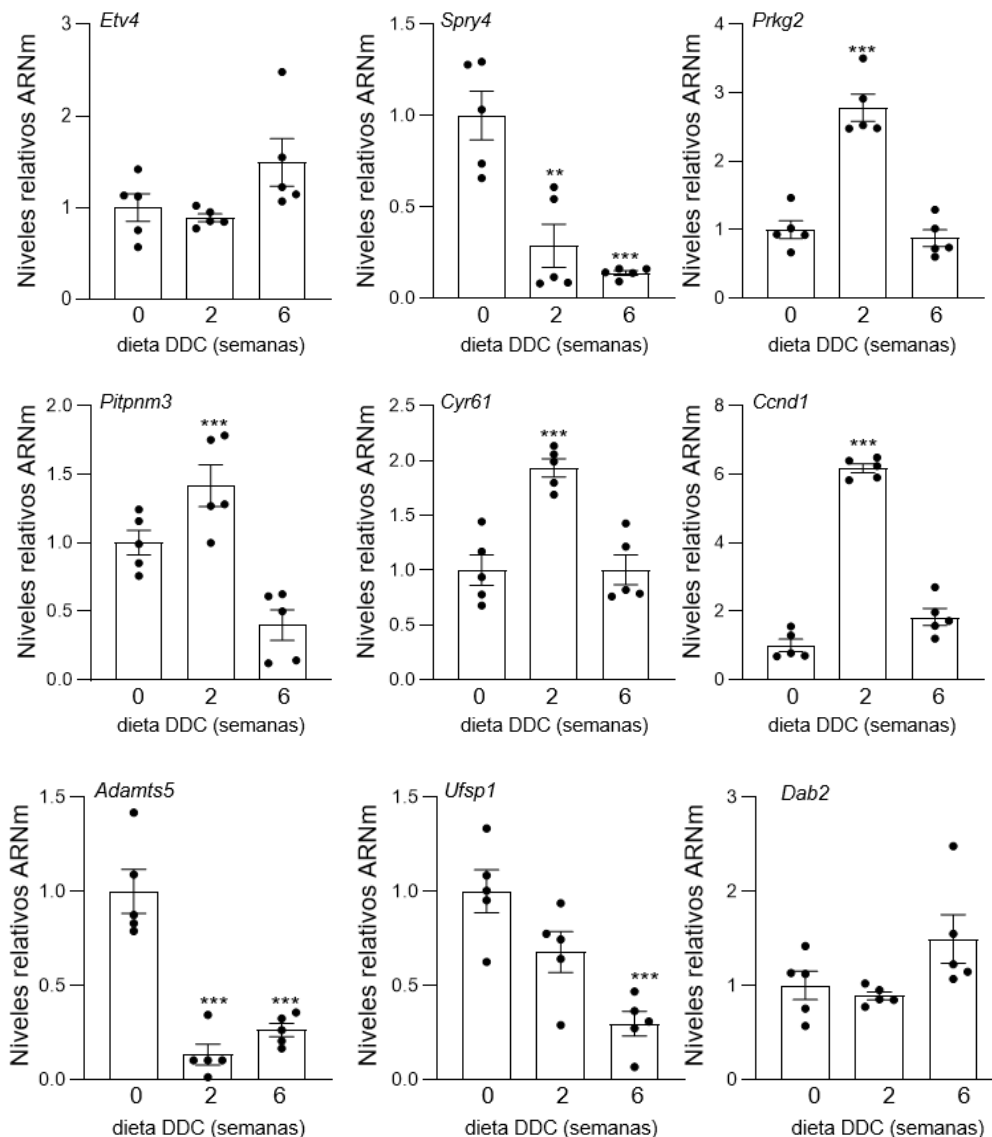


Figura 51. Análisis de la expresión de los genes diana de HGF en células ovas en el hígado de ratones Wt sometidos a una dieta DDC. Niveles de expresión de genes regulados por HGF en CPH/OC: *Etv4*, *Spry4*, *Prkg2*, *Pitpnm3*, *Cyr61*, *Adamts5*, *Dab2* y *Ufsp1* en extractos de ARNm total de ratones Wt tras 0, 2 y 6 semanas con dieta DDC, determinados mediante RT-qPCR. Se usó *GusB* como gen normalizador. Se representa la media \pm S.E.M. (n= 3-5). **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$ respecto de su control no tratado.

Este estudio revela que al menos algunos de los genes seleccionados del análisis por MACE como dianas de la vía de HGF/Met se regulan *in vivo*, durante la respuesta hepática al daño colestásico inducido por la dieta DDC. Estos genes, *Spry4*, *Prkg2*, *Pitpnm3*, *Cyr61*, *Ccnd1*, *Adamts5* y *Ufsp1* podrían estar implicados en la regulación del proceso de expansión de células ovas durante la dieta DDC modulados por HGF, y por tanto, en la regulación de la respuesta regenerativa. En consecuencia, son potenciales candidatos para abrir nuevas líneas de investigación que permitan entender el papel específico que juegan en la respuesta regenerativa mediada por las CPH/OC.





DISCUSIÓN



HGF es un factor multifuncional relevante en la fisiopatología hepática y en la biología de las células hepáticas, controlando numerosos procesos celulares, tales como la proliferación, la migración y la supervivencia celular. Este papel relevante se manifiesta durante el desarrollo, en la organogénesis (Zhao Y. et al., 2022), de hecho, los ratones que carecen de Met o de HGF no completan el proceso de desarrollo y mueren en el útero debido a una organogénesis deficiente, que afecta a la placenta, los músculos esqueléticos de las extremidades, el diafragma, y el hígado (Bladt F. et al., 1995; Schmidt C. et al., 1995; Uehara Y. et al., 1995). No obstante, es más conocido el papel de la vía HGF/Met en los procesos de regeneración hepática (Kimura M., Moteki H. & Ogihara M., 2023). De nuevo, gracias a la generación de modelos de ratón modificados genéticamente, se pudo demostrar que la ausencia de la vía conduce a un fallo regenerativo y a un agravamiento del daño, e incluso la muerte, en respuesta a distintas lesiones que inducen una respuesta regenerativa clásica, mediada por hepatocitos (Huh C. G. et al, 2004; Borowiak M. et al, 2004; Marquardt J.U. et al, 2012), o una respuesta dependiente del compartimento de células progenitoras (Ishikawa T. et al., 2012). Estos, y otros estudios (Mizuno S. & Nakamura T., 2007; Gómez-Quiroz L. E. et al, 2016; Li N. et al, 2018), han llevado a concluir que la vía HGF/Met actúa como una importante señal hepatoprotectora en diferentes contextos patológicos, incluida la enfermedad colestásica (Salas-Silva S. et al, 2020), sin embargo, los estudios en el contexto de las colangiopatías son muy limitados, y los mecanismos que median ese efecto protector son solo parcialmente conocidos. En un esfuerzo de profundizar en este aspecto y contexto específico, se utilizó un modelo de ratón (Fan Y. et al., 2017) que hemos denominado Tg Met, un modelo de sobreexpresión moderada de Met en células hepáticas que expresan albúmina de forma fisiológica, principalmente hepatocitos y en menor medida en CPH/OC, ambos tipos celulares de interés en nuestro laboratorio, y en este trabajo. Las características de este modelo, concretamente la sobreexpresión moderada del transgén, hacen que sea un modelo particularmente interesante, dado que en principio proporcionaría un contexto más fisiológico y controlado. No obstante, estudios previos han revelado que incluso esa sobreexpresión moderada de la forma salvaje (*wild type*) del receptor Met provoca el desarrollo espontáneo de tumores en el hígado (Fan Y. et al., 2017), poniendo de manifiesto el fino control de la homeostasis tisular. Esto es muy relevante desde el punto de vista del diseño de posibles estrategias terapéuticas, cuya diana sea la vía de HGF/Met, en el campo de la enfermedad crónica hepática. Todo ello justifica el interés de explorar el efecto que tendría esta sobreexpresión de Met en un contexto de daño colestásico. Como modelo experimental de daño colestásico se eligió la dieta suplementada con DDC, un modelo previamente usado en el laboratorio (Addante A. et al, 2018; Lazcanoiturburu N. et al, 2022), y que es reconocido como un buen modelo de colangiopatía (Pose E. et al., 2019), y más en particular, CEP, dado que el DDC es un compuesto químico porfirógeno promotor de la acumulación de protoporfirinógeno en los ductos biliares. Tras alrededor de dos semanas de dieta, el tejido hepático responde con una reacción ductular con pericolangitis, fibrosis periductular e inflamación portal similar a lo acontecido durante etapas iniciales de la CEP en humanos (Fickert P. et al., 2007).

Los estudios de validación del modelo, tanto mediante el análisis de los niveles de expresión y activación de Met en el hígado de los ratones, así como en hepatocitos adultos aislados de estos ratones (Arechederra M. et al., 2021; Fan Y. et al., 2017) (**Figuras 23-25**) evidenciaban una sobreexpresión del receptor y sobreactivación de la

vía, moderadas, pero significativas, con respecto al genotipo Wt, confirmando así las propiedades esperadas a nivel de expresión y activación de Met, tanto *in vivo*, en hígados en estado basal, como *in vitro*, en hepatocitos en respuesta a HGF. Además, los estudios de señalización realizados en hepatocitos Tg Met muestran que esta mayor fosforilación/activación de Met se correspondía con una mayor activación de la vía de ERK/MAPKs, lo que está de acuerdo con los hallazgos en los tumores de los ratones Tg Met en el estudio original (Fan Y. et al., 2017). Sin embargo, sorprendentemente, los niveles de AKT no seguían esta tendencia, al contrario, el análisis cuantitativo reflejaría una aparente menor activación de la vía de AKT en los hepatocitos Tg Met. Podría ser una cuestión de cinética, de forma que la activación de AKT en estos hepatocitos sea más rápida y transitoria, y se ha perdido el pico de activación, o quizá podría venir explicada por la activación de vías reguladoras compensatorias con el fin de evitar una proliferación celular excesiva de los hepatocitos *in vitro* como consecuencia de la sobreexpresión de Met (Zhang Y. et al., 2018; Afify S. M. et al., 2021). Por otra parte, los hígados de ratones Tg Met muestran niveles superiores de p-AKT, pero no de p-ERK/MAPKs, respecto de los Wt, tanto basalmente como durante la dieta DDC (**Figura 34**). Ambas vías se consideran centrales durante la regeneración hepática, aunque podrían jugar distintos papeles. Por ejemplo, se ha descrito que las ERK/MAPKs son claves para promover la proliferación de hepatocitos y colangiocitos (Wen X. et al, 2022), y AKT se asocia con supervivencia celular, aunque puede ejercer otras funciones (Morales-Ruiz M., 2017). Recientemente, se ha descrito que la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR controla el proceso regenerativo dirigido por las células epiteliales biliares (Jung K. et al., 2021). Nuestros datos en su conjunto, y apoyados en la literatura (Kiseleva Y. V. et al., 2021), sugieren que la activación de estas vías depende del contexto celular y tisular, y que la sobreexpresión de Met podría facilitar o promover la activación de señales específicas necesarias de una forma contexto dependiente.


Con el fin de evaluar y comparar el daño hepático producido por la dieta DDC en ratones Wt y Tg Met se analizaron marcadores séricos de daño hepático (bilirrubina total, fosfatasa alcalina, AST y ALT) (**Figura 26**). Se sabe que niveles altos de bilirrubina total en suero son indicativos de una alteración en la liberación de sales biliares y su metabolismo por parte de las células dañadas (Kwo P. Y., 2017), asociado a una disfunción hepatocelular o una colestasis. La obstrucción del árbol biliar durante la colestasis también aumenta los niveles séricos de fosfatasa alcalina (Krones E., 2015). Asimismo, la liberación de transaminasas es un parámetro comúnmente empleado para el diagnóstico y evaluación de daño durante la colestasis, dado que el daño colestásico está definido como una desproporción de los niveles de ALT y AST respecto de los niveles de fosfatasa alcalina (Kwo P. Y., 2017). Estos cuatro parámetros están elevados (**Figura 26**) en los ratones sometidos a la dieta DDC, evidenciando el daño hepático, sin embargo, para bilirrubina total, fosfatasa alcalina y AST, principalmente a 6 semanas de dieta DDC, se observaron diferencias significativas entre ratones Wt y Tg Met, presentando estos últimos menores niveles que los Wt. El análisis de la ratio peso hígado/peso animal seguía la misma tendencia, siendo superior en ratones Tg Met respecto a los Wt. Más específicamente, se observó un aumento progresivo en la masa hepática en los ratones Tg Met, que no se ve en los Wt, mientras que éstos (ratones Wt) muestran una pérdida de peso corporal, que no presentan los Tg Met. La pérdida de peso corporal es un rasgo previamente identificado asociado a la administración de dieta DDC de forma prolongada (Nikam A. et al., 2013), que se ha asociado a una alteración

del metabolismo energético y a una disfunción mitocondrial. Estos datos concuerdan con lo observado por Ishikawa T. y colaboradores (2012), donde describen que ratones deficientes en el receptor Met presentan menores ratios peso hígado/peso del animal durante la dieta DDC, en paralelo a una severa atrofia y disfunción hepática. Al mismo tiempo, estos datos sugieren que mayores niveles de Met en hepatocitos son capaces de aminorar el daño colestásico y promover una respuesta regenerativa más eficiente, que contrarrestaría los efectos generales derivados del daño hepático, como sería la pérdida de peso. En consonancia con esta idea, los hígados de los ratones Tg Met con colestasis presentan menor nivel de apoptosis y mayor proliferación de hepatocitos que los ratones Wt (**Figura 31**), proporcionando una evidencia adicional, a las evidencias *in vivo* e *in vitro* recogidas previamente en la literatura que indican que el HGF es un regulador crítico de la proliferación de hepatocitos y protege contra la apoptosis (Miyazawa K. et al., 1989; Nakamura T. et al., 1989; Ueki T. et al., 1999; Huh C. G. et al., 2004; Gómez-Quiroz L. E. et al., 2008).

El daño crónico hepático suele estar asociado al desarrollo de fibrosis. La fibrosis hepática se caracteriza por la deposición excesiva de matriz extracelular con aumento de componentes como el colágeno o la fibronectina y la activación de células estrelladas (Ravichandra A. & Schwabe R. F., 2021). En este contexto se liberan factores profibróticos como TGF- β , PDGF y VEGF que favorecen la remodelación de la matriz extracelular, el depósito de fibras de colágeno y la modulación y expresión de genes específicos que participarán en este proceso (Tsomidis I. et al., 2022). En el modelo de daño por DDC la fibrosis es periductal o biliar (Fickert P. et al., 2007; Pose E. et al., 2019), a diferencia de otros modelos de fibrosis, como el empleo de tetracloruro de carbono (CCl₄), donde se produce una fibrosis más extensa y extendida por todo el parénquima hepático (Lee Y. S. & Seki E., 2023). Acorde a lo esperado, nuestros datos evidencian una acumulación de fibras de colágeno de tipo I y III, localizada en las áreas portales, tal y como se muestra en la tinción de *Sirius Red* (**Figura 28**), en respuesta a la dieta DDC, que se observa tanto en los ratones Wt como los Tg Met, sin diferencias significativas entre ambos genotipos. Por otra parte, el análisis de marcadores fibróticos (**Figura 28**) generó resultados no concluyentes, complejos de interpretar. El análisis de la expresión a nivel de ARNm no muestra diferencias significativas entre los ratones Wt y Tg Met en los niveles de Colágeno1a1, pero sí de *Mmp9*, *Timp1*, *Tpa* y *Serpine 1* (PAI-1), a 2 semanas de dieta, donde los niveles en el Tg Met son inferiores al Wt. En el caso de *Serpine 1* las diferencias se observan tanto a 2 como a 6 semanas de DDC. Estos datos podrían indicar cambios en la remodelación de la matriz extracelular entre Wt y Tg Met. Sin embargo, no hay una concordancia perfecta entre los datos obtenidos a nivel de ARNm y de proteína. Los niveles de proteína de COL1A1 y TIMP1 siguen la misma tendencia que los de ARNm, destacando que la regulación al alza de Timp1, tanto a nivel de ARNm como de proteína, observada en ratones Wt se pierde en los ratones Tg Met. Sin embargo, la proteína MMP9 tiene un patrón opuesto, con niveles superiores en los hígados Tg Met. Esta discrepancia ARNm-proteína podría explicarse por una regulación postranscripcional, identificada previamente para las MMPs y sus inhibidores (Lichtinghagen R. et al., 2002; Clark I.M. et al., 2008; Edfors F. et al., 2016; Yan C. & Boyd D. D., 2007) y que incluye el tiempo de estabilidad del ARNm o la eficacia del proceso de traducción proteica (Zhao X. & Benveniste E. N., 2008). MMP9 es una de las principales metaloproteinasas implicadas en remodelación de matriz extracelular (Tsomidis I. et al., 2022), de tal modo que la liberación y expresión de MMP9 se asocia


a degradación de matriz extracelular que repercute en la resolución de fibrosis (Alwayn I. P. et al., 2008). El inhibidor de MMPs, Timp-1, cuyos niveles aumentan durante un daño colestásico agudo o crónico, se ha propuesto como un buen candidato a marcador sérico de daño hepático, en combinación con otros parámetros (algoritmo ELF: *enhanced liver fibrosis*) (Nobili V. et al., 2009). Se ha demostrado que una deficiencia en PAI-1 (el producto del gen *Serpine 1*) reduce la fibrosis hepática tras un proceso de ligación del ducto biliar como modelo de colestasis en ratones, permitiendo la activación de tPA para el inicio de degradación de matriz extracelular, lo cual de nuevo podría estar asociado a la resolución del proceso fibrótico (Wang H., 2007). En cualquier caso, a pesar del interés de estos datos, el hecho de que no se hayan encontrado diferencias en la acumulación de colágeno, hace que el escenario no esté claro, y se necesitarían estudios adicionales que permitieran clarificar lo que está ocurriendo a este nivel. En este sentido, sería interesante estudiar el efecto de la sobreexpresión moderada de Met en otros modelos de fibrosis, como el de CCl₄, mencionado previamente, para aclarar si esta falta de asociación entre el grado de daño hepático, y el grado de fibrosis, es algo específico del modelo utilizado, o es un fenómeno más general.

Para caracterizar más en profundidad el daño inducido por la dieta DDC en nuestro modelo, se analizaron los niveles de expresión de genes de transportadores de sales biliares (*Abcb11*, *Slc10a1*, *Abcc4*, *Slco1a1*, *Slco3a1* y *Abcg2*), correspondientes a sus proteínas BSEP, NTCP, MRP4, OATP1, OATP3A1, BCRP, respectivamente, para evaluar su comportamiento durante la colestasis ya que diversas enfermedades colestásicas se han relacionado con alteraciones de algunos de estos transportadores, como BSEP o NTCP (Kubitz R. & Dröge C., 2012; Farooqui N., 2022). Por ejemplo, está ampliamente descrita la relación de mutaciones con pérdida de funcionalidad de BSEP causantes de CIFP (Thompson R. & Strautnieks S., 2001). El patrón de regulación de estos genes (**Figura 29**) es similar en ambos genotipos, aunque en ratones Wt sí se alcanzan reducciones de expresión significativas en *Abcb11*, *Slco1a1* y *Slc10a1* principalmente a 2 semanas de DDC, que no se logra en los Tg Met. El descenso de los niveles de BSEP (*Abcb11*) y NTCP (*Slc10a1*) durante la colestasis inducida por DDC puede estar relacionado con una regulación negativa como respuesta a la incapacidad del hepatocito para liberar sales biliares al ducto biliar, evitando la recaptación de sales biliares procedentes del intestino (Farooqui N., 2022). Además, a 2 semanas de DDC, los ratones Tg Met expresan niveles superiores de MRP4 (*Abcc4*). La expresión de este receptor se ha asociado con una eliminación alternativa de sales biliares durante la colestasis que contribuiría a una menor acumulación de productos intracelulares tóxicos y menor daño hepático (Geier A. et al., 2005). Más relevante es el aumento significativo de *Abcg2* (BCRP) en hígados Tg Met a 2 semanas de DDC. Este transportador está ampliamente relacionado con el transporte de diversos sustratos incluyendo fármacos antitumorales, aunque también se ha demostrado su capacidad de transporte de sales biliares en hígado (Blazquez A. G. et al., 2011), con lo que podría estar relacionado con la eliminación de éstas durante el daño colestásico. No obstante, el trabajo de Mennone A. y colaboradores (2010) concluía que BCRP no tiene un papel significativo en la respuesta adaptativa a colestasis en el hígado. Dado que sí está demostrado su papel en la vía de síntesis de hemo y el transporte de intermediarios porfirínicos (Jonker J. W. et al, 2002; Wang P. et al, 2019), y su actividad protectora asociada, es atractivo proponer que la inducción observada en los hígados Tg Met puede constituir un mecanismo de protección hepática frente a la acumulación de intermediarios porfirínicos



provocada por DDC. Menos obvia es la interpretación de los datos de *Gpbar1*, ya que la activación de TGR5 se ha asociado a una protección frente al daño colestásico inducido por BDL a través de la reducción de la producción de ROS por activación de la señalización de Nrf2/HO-1 (Yang H. et al, 2021), y sin embargo nuestros datos muestran una mayor inducción en Wt que en Tg Met, a 2 semanas de dieta. No obstante, también se ha demostrado que la expresión aumentada de *Gpbar1* promueve la proliferación de colangiocitos y la progresión del daño hepático en colangiocarcinoma humano asociado a colestasis (Keitel V. & Häussinger D., 2018), luego los niveles disminuidos de *Gpbar1* (TGR5) en hígados Tg Met podrían sugerir que este mecanismo de daño no ocurriría en una situación de sobreexpresión de Met. De forma global, está claro que el modelo de colestasis inducido por DDC produce una modulación evidente de los niveles de expresión de transportadores y receptores de sales biliares. Aunque algunos de ellos muestran diferencias significativas interesantes entre genotipos, serían necesarios estudios complementarios para confirmar las vías específicas de esta regulación y su relevancia real.


A pesar de que quedan aspectos aún por clarificar, los datos anteriores, incluyendo el aumento de la ratio peso hígado/peso animal, los menores niveles de marcadores séricos de daño hepático, la regulación de marcadores implicados en la resolución de la fibrosis y de transportadores de sales biliares, nos permiten proponer que la sobreexpresión de Met promueve la actividad hepatoprotectora de HGF durante la dieta DDC. Otras evidencias se suman a este estado “*hepatoprotegido*” de los ratones de Tg Met, aunque su contribución concreta quedaría por establecer. Así, por ejemplo, el análisis de los niveles de expresión de diferentes mediadores pro y antiinflamatorios (**Figura 32**) durante la dieta DDC revela cambios relevantes en IL6, con niveles superiores en el hígado de ratones Tg Met frente a los detectados en el Wt, de manera simultánea a un incremento en los niveles de STAT3 fosforilado. El papel esencial de IL-6 y sus dianas intracelulares, en particular STAT3, para la regeneración hepática está ampliamente demostrado, mediante el uso de diferentes modelos de ratones knockout (Streetz K. L. et al, 2000; Schmidt-Arras D. & Rose John S., 2016), siendo esenciales para la inducción de la proliferación de hepatocitos. Esto concuerda muy bien con el aumento de la proliferación de los hepatocitos en los ratones Tg Met (**Figura 31**). También es interesante la modulación diferencial, prácticamente opuesta entre genotipos, de la Il10 (**Figura 32**). Recientemente se ha demostrado que la Il10 es un potente inmunoregulador con actividad sobre la resolución de la inflamación y promoción de la regeneración hepática (Yang M. & Zhang C. Y., 2024). Adicionalmente, los ratones Tg Met presentan niveles superiores de Cyp7a1 a 2 semanas de dieta DDC, que podría también contribuir a esa respuesta protectora frente al daño colestásico. El CYP7A1 se expresa principalmente en hepatocitos adultos, participa principalmente en el metabolismo y producción de ácidos biliares, sin embargo, recientemente se ha descrito su actividad protectora frente a la inflamación y fibrosis durante la colestasis dado que su expresión previene del daño oxidativo y reduce la producción de sales biliares en contextos de daño hepático (Zhang L. et al., 2009; Liu H., 2016). Por último, los valores superiores de P-AKT en el Tg Met con respecto al Wt tanto basalmente como durante la dieta DDC, previamente discutidos, sugieren que la sobreexpresión de Met en hepatocitos promueve la activación de vías pro-regenerativas en el hígado durante la colestasis.



En conjunto, nuestros datos están en consonancia con evidencias en la literatura de la importancia de HGF/Met en la atenuación de la enfermedad colestásica. Así, en la lesión obstructiva biliar aguda inducida en el modelo BDL, se ha visto que tanto los niveles de expresión hepática de HGF como de Met se regulan al alza de forma transitoria lo que sugiere un papel relevante en este contexto. De hecho, ratones deficientes de Met en hepatocitos presentan un agravamiento del daño, asociado a menor proliferación de hepatocitos, mayor necrosis, inflamación y fibrosis, demostrando que un fallo en la señalización de la vía HGF/Met está asociado a la progresión de la lesión hepática (Giebeler A. et al., 2009). Además, distintos grupos de investigación, utilizando enfoques diferentes y complementarios (ratones Met *knock out*, inyección de una IgG anti-Met o inyección de HGF recombinante en ratones sometidos al procedimiento BDL), demostraron claramente que la ausencia de una señalización HGF/Met funcional empeora la lesión derivada de la colestasis, mientras que la administración de HGF recombinante la mejora. Concretamente, el HGF/Met ejerce este efecto protector actuando a diferentes niveles: disminuye la fibrosis, la infiltración inmunitaria y frena la apoptosis y la necrosis de los hepatocitos a la vez que promueve la proliferación de los mismos (Borowiak M. et al., 2004). Nuestro trabajo proporciona información adicional, demostrando que el aumento de la expresión de Met, y por tanto de la activación de la vía, al menos dentro de unos niveles equilibrados, puede favorecer la regeneración y disminuir la progresión del daño.

Otro resultado interesante en este estudio es el relativo a la reacción ductular. Está ampliamente descrito en la bibliografía que el modelo de DDC conlleva una reacción ductular con expansión de CPH/OC y su participación en el proceso de regeneración hepática (Preisegger K.H. et al, 1999; Fickert P. et al., 2007). El papel concreto de esta población celular es objeto de controversia (Español-Suñer R. et al., 2012; Kaur S., 2015), habiéndose descrito en la literatura su participación en la regeneración hepática tras un daño cuando la población de hepatocitos no prolifera de forma adecuada por la extensión, duración o gravedad del daño inducido, (Español-Suñer R. et al., 2012) constituyendo por tanto una respuesta regenerativa alternativa. Sin embargo, otras evidencias relacionan íntimamente la activación de las CPH/OC con la expansión de células estrelladas y el desarrollo de fibrosis.

Nuestros resultados muestran claramente que la sobreexpresión de Met durante un daño colestásico inducido por dieta DDC está asociada a una menor reacción ductular con una menor expansión de CPH/OC. Así, tanto el análisis morfométrico del área de expansión ductular; como el análisis de los marcadores *Epcam* y *Krt19* comúnmente empleados en la caracterización de CPH/OC (Papp V. et al., 2013), así como la tinción doble CK19/Ki67 (**Figura 30**), evidencian la existencia de reacción ductular con expansión de CPH/OC que está aminorada en los ratones Tg Met. A priori, este hallazgo resultaba sorprendente dado que se sabe que el HGF es un factor mitogénico y de supervivencia para las CPH/OC, y también es esencial para una respuesta regenerativa eficiente dependiente de estas células (del Castillo G. et al, 2008; Ishikawa T. et al, 2012). Sin embargo, al analizar la proliferación en la población de hepatocitos, se vio que ésta está significativamente aumentada (**Figura 31**). Este hecho, junto con los datos de la actividad caspasa-3, sugieren que la sobreexpresión de Met resulta en un potente efecto mitogénico y antiapoptótico sobre los hepatocitos durante un daño colestásico. Esto, *per se*, podría explicar la reducción de la expansión de las CPH/OC, dado que en



un contexto de menor daño y mayor capacidad regenerativa de los hepatocitos, la activación de las CPH/OC no jugaría un papel principal. Sin embargo, aunque los hepatocitos parecen ser los actores principales de la respuesta regenerativa en el hígado Tg Met, no podemos descartar un papel de las CPH/OC en este proceso. Tanto nosotros como otros autores hemos descrito que el secretoma de las CPH/OC modula el comportamiento de diferentes poblaciones celulares hepáticas implicadas en la respuesta a un daño, por lo que la idea de que las CPH/OC podrían modular o influir en los hepatocitos que sobreexpresan Met es una hipótesis plausible (Berardis S. et al., 2014; García-Sáez J. et al., 2024).


Para indagar los mecanismos responsables de las alteraciones observadas en la respuesta hepática al daño inducido por DDC, como consecuencia de la sobreexpresión de Met, se analizó la vía de TGF- β . El TGF- β se ha descrito como uno de los factores más relevantes implicados en la fisiología y fisiopatología hepática (Fabregat I. et al., 2016; Dewidar B. et al., 2011), convirtiéndolo en una buena diana de estudio en modelos de colestasis hepática. Es muy conocido su papel como inductor de fibrosis hepática mediante la activación de células estrelladas, la regulación de la acumulación de proteínas de matriz extracelular, la participación en la inducción de EMT y la producción de ROS, participando así de una forma muy activa en la respuesta al daño (Dewidar B. et al., 2011). En este sentido, se ha visto que los niveles de expresión de ligandos y receptores de TGF- β aumentan durante el daño hepático e inician una respuesta para hacer frente a esa lesión independientemente de su naturaleza (Dooley S. et al., 2008). También se ha descrito la importancia del Tgfb2, una isoforma mucho menos estudiada que el TGF- β 1, en la activación de células estrelladas y el desarrollo de fibrosis. De hecho, el Tgfb2 está aumentado en el hígado de pacientes con enfermedades colestásicas, CEP y CBP, y la inhibición de su expresión en ratones, mediante oligonucleótidos antisentido, contribuye a una menor respuesta profibrótica, lo que tiene una posible aplicación en el desarrollo de alternativas terapéuticas para enfermedades colestásicas (Dropmann A. et al., 2020).

También hay que destacar que diferentes trabajos han descrito qué parte de las acciones antifibróticas del HGF/Met dependen de su capacidad para oponerse o modular los efectos del TGF- β , como principal componente de la respuesta fibrótica, en diferentes tejidos y órganos, incluyendo la fibrosis renal, pulmonar y hepática, entre otros (Yi X. et al., 2014; Vishnupriya M. et al., 2021). Estas acciones del HGF/Met han sido ampliamente descritas en la fibrosis renal, donde el HGF inhibe la expresión de TGF- β previniendo así la progresión de la fibrosis renal en diferentes modelos animales. Entre los mecanismos moleculares identificados como responsables de la acción inhibitoria del HGF sobre el TGF- β se encuentran la interferencia con la señalización de las Smads bloqueando la translocación nuclear de Smad2/3; regulando al alza la expresión del correpresor de Smad: SnoN, o de Smad7, una Smad inhibitoria; o impidiendo la degradación del correpresor de Smad: TGIF en diferentes tipos de células (Lv W. et al., 2018).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la sobreexpresión de Met impide la regulación al alza de los receptores de TGF- β , Tgfr1, 2 y 3, que se produce durante el daño colestásico inducido por DDC (**Figura 35**), lo que va acompañado de

una disminución de la fosforilación/activación de Smad2 y una regulación aminorada de los genes diana de TGF- β *Smad7* y *Serpine1* (Figura 36). Esta contrarregulación del TGF- β por parte de HGF/Met en un contexto de colestasis concuerda con hallazgos previos en la literatura que indicaban que en ausencia de Met aumentan los niveles de expresión del ligando TGF- β en el contexto del daño provocado por ligadura del ducto biliar (Giebeler A. et al., 2009). Son llamativos algunos de los datos obtenidos en nuestro estudio, concretamente el hecho de que el hígado de ratones Tg Met de forma basal expresa mayores niveles de *Tgfb3*, *Tgfbr2*, *Tgfbr3* que el Wt, lo que podría asociarse a que la sobreexpresión de un receptor que activa señales mitogénicas como Met conduzca a las células a expresar vías reguladoras compensatorias, inhibitoras de crecimiento e inductoras de apoptosis, como es el caso, para mantener la homeostasis y contrarrestar el sobrecrecimiento celular (Huang S. S. & Huang J. S., 2005). En cualquier caso, los resultados presentados en este trabajo sugieren que la regulación de Met actúa en un punto temprano de la vía del TGF- β , a nivel de la expresión del receptor. Dado que la vía de señalización de TGF- β presenta múltiples puntos de regulación, a nivel extracelular, de membrana e intracelular (Chen P. Y., 2023), es posible que otros mecanismos adicionales entren en juego y contribuyan a la atenuación de la señalización de TGF- β durante el daño colestásico.

Con la idea de profundizar en los estudios mecanísticos sobre los efectos de la sobreexpresión de Met en el hígado en respuesta a un daño colestásico, empleamos hepatocitos aislados de ratones Wt y Tg Met inmortalizados. El análisis de la respuesta a TGF- β en términos de viabilidad y de señalización (Figura 37) mostró que la sobreexpresión de Met protegía de la actividad proapoptótica de TGF- β , resultados que están en consonancia con trabajos previos que demuestran que la vía de HGF/Met protege de la muerte celular de los hepatocitos en un contexto de cirrosis (Ueki T. et al., 1999; Cao X. F. et al., 2017). Sin embargo, los hepatocitos Tg Met no mostraban una alteración en la señalización de la vía de SMAD, como indican los resultados obtenidos del análisis de P-SMAD2, lo que en principio no concordaba con los datos obtenidos *in vivo*. Como el contexto es esencial para determinar la respuesta celular, se decidió tratar de imitar *in vitro* la situación de colestasis inducida por DDC *in vivo*, y para ello, se trataron las células con sales biliares, concretamente con una de las sales biliares predominantes en la bilis del ratón, el TCDC (Kister B. et al., 2023). De hecho, nuestro grupo de investigación y otros ya habían utilizado este abordaje con propósitos similares (Santamaría E. et al., 2019; García-Sáez J. et al., 2024), demostrando su utilidad. Para la puesta a punto del modelo descrito en la figura 38, se trabajó siempre en un rango de concentraciones de TCDC fisiológicas/fisiopatológicas (Woolbright B. L. & Jaeschke H., 2015; Jansen P. L. et al., 2017). Se realizó una pequeña validación como modelo de colestasis con un estudio preliminar de viabilidad y de expresión de transportadores de sales biliares *Abcb11* y *Slc10a1*, que codifican para los transportadores BSEP y NTCP, respectivamente (Stieger B., 2011), como pruebas de la respuesta a la sal biliar. Además de la pérdida de viabilidad celular dosis dependiente, se observaron diferencias significativas por el tratamiento en el gen *Slc10a1* con una disminución de sus niveles en ambos tipos de hepatocitos. La disminución de expresión de NTCP se ha relacionado con un efecto hepatoprotector para evitar la toxicidad debida a la entrada excesiva de sales biliares al interior del hepatocito durante la colestasis (Stieger B., 2011; Mühlfeld S. et al., 2012). Ambas pruebas sirvieron para validar funcionalmente el modelo *in vitro*



de colestasis. Sin embargo, en estas condiciones no se observaron diferencias aparentes entre hepatocitos Wt y Tg Met, por lo que el siguiente objetivo fue analizar la respuesta a TGF- β . El análisis de la vía, en los hepatocitos tratados con TCDC y TGF- β , reproducía la situación observada *in vivo* (Figura 39): los hepatocitos Wt presentaron mayores niveles de expresión de los receptores de TGF- β *Tgfr1* y 3 y una mayor inducción de los genes diana *Smad7* y *Serpine 1*. A falta de un análisis exhaustivo tanto de las vía canónica como no canónicas del TGF- β en estas condiciones, estos resultados evidencian que en presencia de una sal biliar los hepatocitos Tg Met responden al TGF- β de una manera atenuada a nivel de regulación de la expresión génica, probablemente debido a una regulación negativa de los receptores de TGF- β . Por otro lado, la presencia de TCDC sensibilizaba a los hepatocitos Wt a la muerte por TGF- β , ya que, en estas condiciones, se observaba una pérdida de viabilidad en los hepatocitos a dosis de 2 ng/ml y a tiempos más cortos que en hepatocitos sin tratar con TCDC (Figura 37). Sin embargo, los hepatocitos Tg Met pretratados con TCDC presentaban cierta resistencia a la acción proapoptótica de TGF- β , apoyando los resultados obtenidos en el modelo *in vivo*.

Pese a las semejanzas que encontramos entre el modelo *in vivo* y el modelo *in vitro*, hay que tener en cuenta las limitaciones del modelo *in vitro*: un tipo celular único (hepatocitos) frente a la complejidad de las diferentes poblaciones hepáticas interaccionando en el hígado; la simplificación de un plato de cultivo, frente a la disposición espacial de los hepatocitos, y los diferentes tipos de hepatocitos según su disposición en el hígado; además, la composición de la bilis es mucho más compleja frente al uso de una única sal biliar. Este último aspecto podría ser abordado en el futuro y se podrían completar estos experimentos con la utilización de bilis de ratón para los pretratamientos o utilizar combinaciones complejas de sales biliares, con el fin de aproximarse más a la situación *in vivo*. En cualquier caso, el modelo que hemos desarrollado nos ha permitido aproximarnos a aspectos mecanísticos que de otro modo hubieran sido complejos de abordar.

El estatus oxidativo es un factor importante en el desarrollo y avance de diversas enfermedades incluido el daño hepático, participando en fenómenos de inflamación, fibrosis y tumorigénesis (Allameh A. et al., 2023). De hecho, el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en las enfermedades hepáticas, incluidas las lesiones colestásicas. A este respecto, se produce estrés oxidativo durante la colestasis en humanos: en niños que padecen atresia biliar y escasez de conductos biliares interlobulares, y en adultos durante la colestasis obstructiva y la CBP. Además, recientemente se ha descrito que en la etapa terminal de la CEP humana, el daño oxidativo es grave y existe una desregulación significativa de la respuesta antioxidante. Los ROS se producen principalmente en la mitocondria y en el retículo endoplásmico de los hepatocitos, y se ha descrito la participación de NOXs y enzimas del complejo P450 (Bedard K. & Krause K. H., 2007). Con carácter general, los hepatocitos están equipados con mecanismos y moléculas que neutralizan los ROS para mantener el balance oxidativo. Cuando el daño oxidativo se mantiene en el tiempo y se agotan los mecanismos de defensa, comienza la afectación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos contribuyendo a la aparición de daño celular (Cichoż-Lach H. & Michalak A., 2014).

Además de la implicación del estrés oxidativo en la patogénesis de la enfermedad hepática, y en relación con los datos relativos al TGF- β en nuestro modelo, es importante destacar que el TGF- β es un importante modulador del estrés oxidativo en las células hepáticas, tanto a nivel mitocondrial como extramitocondrial (Sánchez A. et al., 1996; Herrera et al., 2001; Herrera B. et al., 2004; Liu R. M. & Desai L. P., 2015; Richter K. & Kietzmann T., 2016). De hecho, no solo el TGF- β induce la producción de ROS, sino que este estado de estrés oxidativo aumenta la expresión del propio TGF- β y estimula su liberación, creándose un dañino círculo vicioso (Annes J. P. et al., 2003). Por todo ello, se analizó el contenido de ROS en respuesta a TGF- β , tanto en condiciones basales como tras tratamiento con TCDC (**Figura 40**). Tanto la sobreexpresión de Met (hepatocitos Tg Met) como el pretratamiento con HGF, impiden la inducción de ROS por tratamiento con TGF- β en presencia de TCDC, lo que demostraba que la activación de la vía de HGF/Met protege del estrés oxidativo en condiciones que emulan el daño colestásico. Este hecho podría estar relacionado con los efectos de Met como protector frente a la apoptosis (Xiao G. H. et al., 2001; Motoi S. et al., 2019). Aunque nosotros no hemos demostrado en este modelo que la apoptosis inducida por TGF- β en hepatocitos es dependiente del aumento de ROS, trabajos anteriores de nuestro grupo (y de otros grupos) sí han demostrado este mecanismo en hepatocitos primarios (fetales de rata y adultos de ratón), en células de hepatoma y en CPH/OC (Herrera B. et al., 2001; Black D. et al., 2007; Martínez-Palacián A. et al., 2013; Sancho P. et al., 2009). Por otro lado, también queda por resolver cuál es la fuente de ROS en este modelo. Diferentes trabajos han señalado a la proteína NOX4 como la enzima responsable de la producción de ROS inducida por TGF- β (Herrera B. et al., 2004; Carmona-Cuenca I. et al., 2008; Liu R. M. & Gaston Pravia K. A., 2010). Además, Clavijo-Cornejo D. y colaboradores (2013) demostraron que el HGF es capaz de suprimir la expresión de diferentes NOXs, incluida la NOX4, en hepatocitos primarios de ratón, y de esta manera bloquear la producción de ROS por TGF- β y mejorar la viabilidad. Sin embargo, nuestros datos (**Figura 41**) muestran una regulación tardía (24h) de los niveles de ARNm de *Nox4* en respuesta a TCDC+TGF- β , que además no presenta diferencias significativas entre Wt y Tg Met, que pueden deberse a los bajos niveles de expresión de este gen y a la dificultad que presenta su detección mediante técnicas de RT-qPCR convencionales (Diebold B. A. et al., 2019). No obstante, aunque estos datos no sugieren un papel para Nox4 en este contexto, no podemos descartar del todo su participación, ya que habría que examinar su posible regulación a tiempos más cortos (en coherencia con el pico de producción de ROS que tiene lugar entre los 30 minutos y la hora de tratamiento con TGF- β). Así mismo sería interesante estudiar los niveles de proteína de Nox4 a estos tiempos, así como validar su papel en la producción de ROS en este modelo mediante ensayos de silenciamiento génico o el uso de inhibidores. Por último, sería interesante analizar la posible participación de ROS de origen mitocondrial en este fenómeno de estrés oxidativo inducido por TGF- β en un contexto colestásico, ya que se ha descrito el papel de la mitocondria en la producción de ROS en algunos contextos (Albright C. D. et al., 2003; Herrera B. et al., 2004; García Ruiz C. & Fernández Checa J. C., 2007).

Con el fin de clarificar el mecanismo por el cual los hepatocitos Tg Met están protegidos frente al estrés oxidativo, se realizó un análisis de genes implicados en el mantenimiento del balance oxidativo. Nuestros resultados (**Figuras 42 y 43**) muestran que los hepatocitos que sobreexpresan Met presentaban mayores niveles de expresión que

los Wt de genes relacionados con el metabolismo del glutatión (*Gss*, *Gclc*), así como del gen *Nfe2l2* (que codifica para Nrf2), y mayores niveles de glutatión total, lo que sugería una probable participación del sistema de glutatión como mecanismo de defensa, mientras que no se observaron cambios entre genotipos en los niveles de expresión y/o actividades enzimáticas en otros sistemas antioxidantes como la catalasa o la superóxido dismutasa. Estos hallazgos *in vitro* indicaban que la sobreexpresión de Met potencia la capacidad antioxidante de los hepatocitos frente a la acción de TGF- β durante la colestasis, actuando a nivel de glutatión. Esto es consistente con observaciones previas en un contexto de daño oxidativo inducido por etanol, usando líneas de hepatoblastoma, en el que se vio que el efecto protector del HGF frente al estrés oxidativo estaba asociado a un aumento de la ratio GSH/GSSG y de la expresión de la γ -GCS, aunque en este contexto también se observaban cambios a nivel de SOD1 y catalasa (Valdés Arzate A. et al, 2009).

El conjunto de estos datos nos llevó a plantear si esta regulación observada *in vitro* podría tener lugar *in vivo*, en el modelo de daño por DDC. En consistencia con lo observado en hepatocitos *in vitro*, los hígados de ratones Tg Met presentaban mayores niveles de expresión de *Gclc* y *Gss* y de *Nfe2l2*; además de unos altos niveles de glutatión reducido, un ratio GSH/GSSG elevado y un nivel de estrés oxidativo disminuido con respecto al Wt, sin diferencias en la expresión de las *Sod1* y *2*, o la *Gsr* (Figura 44). Por tanto, tanto *in vitro*, en los hepatocitos, como *in vivo*, en hígados, los resultados demuestran un aumento de la expresión de las enzimas de síntesis del glutatión y un gran incremento de la relación GSH/GSSG, por sobreexpresión de Met, que apoyan un papel crucial para este sistema antioxidante en los efectos protectores de la vía de HGF/Met.

Conviene mencionar que el estrés oxidativo que genera la dieta colestásica DDC, que se ve reflejado en nuestros datos por unos niveles de ROS elevados y una alteración en sistema del glutatión, se había documentado en otros modelos animales de colestasis, como el ratón *knockout Mrd2^{-/-}*, o la inducida por BDL, o por tratamiento con alfa-naftil-isotiocianato (ANIT), y la propia dieta DDC (Fragoulis A. et al., 2019; Kim J. Y., 2021; Banerjee P. et al., 2023; Hao J. et al., 2023). Sin embargo, es objeto de debate hasta qué punto el estrés oxidativo contribuye a la lesión durante la colestasis. El tratamiento antioxidante, como la vitamina E y su análogo, Trolox, N-acetil cisteína (NAC) o S-adenosil metionina (SAME) son capaces de reducir los niveles de ROS, pero fracasa en la prevención de la lesión hepática en el modelo BDL (Copple B. L, 2010). Por el contrario, diferentes pruebas demuestran que los fármacos antioxidantes, como la gentiopiocrisida, o la inducción de enzimas antioxidantes intracelulares, como la hemooxigenasa-1, por diferentes medios, disminuyen no sólo el estrés oxidativo, sino también el daño hepático y la inflamación que se producen en la lesión colestásica en los ratones *Mrd2^{-/-}* y en el modelo DDC (Kim J. Y., 2021). Futuros estudios permitirán aclarar estas discrepancias.

Al respecto de la importancia del sistema del glutatión en nuestro modelo, hay que destacar que el glutatión juega un importante papel en el hígado en el conjunto de los diferentes sistemas antioxidantes. De hecho, el hígado es el primer productor de glutatión y desempeña un papel destacado en el mantenimiento de la homeostasis sistémica del glutatión (Lu S. C., 2013). Se ha demostrado que los niveles de glutatión

disminuyen de manera notable en diferentes enfermedades hepáticas (Vairetti M. et al., 2021) y, lo que es más importante, el mantenimiento o la modulación de los niveles de glutatión mediante la administración de NAC es el tratamiento de elección en la intoxicación por paracetamol y mejora los resultados clínicos en diversas afecciones con una implicación de estrés oxidativo (Hristov B. D., 2022). Esto es debido a que la NAC es un derivado sintético del aminoácido endógeno L-cisteína precursor de glutatión (Raghu G. et al., 2021). Además, el Ebselen, un análogo de la enzima glutatión peroxidasa, constituye un agente terapéutico en la lesión hepática inducida por alcohol, lo que evidencia el papel fundamental del glutatión en las enfermedades hepáticas (Cichoż-Lach H. & Michalak A., 2014). Concretamente, en las hepatopatías colestásicas, la literatura científica muestra resultados contradictorios, aunque se ha descrito una disminución del contenido de glutatión durante la progresión de la enfermedad, probablemente debido a una regulación a la baja de la actividad o expresión de GCL, la enzima limitante en la síntesis de glutatión (Yang H., 2009). Nuestros datos no muestran una disminución significativa de los niveles de expresión de *Gclc* en condiciones colestásicas, aunque puede observarse una leve tendencia. En cualquier caso, tanto *Gclc* como *Gss* aparecen como dianas de la acción de Met, ya que tanto en los hepatocitos Tg Met tratados con TCDC como en los hígados de ratones Tg Met sometidos a la dieta DDC se observa una fuerte regulación positiva en ambos genes, proporcionando así un mecanismo potencial por el cual HGF/Met regularía los niveles de glutatión. Hay que decir que, en otro sistema celular y tisular distinto, células mesangiales de riñón de rata, se había descrito que el HGF funciona como factor antioxidante en situaciones de alta glucosa, y evita la reducción de expresión de la GCLC inhibiendo la unión del factor inhibitorio USF al promotor del gen de dicha enzima (Li H., 2006). Sería interesante ver si un mecanismo similar opera en hepatocitos. Queda por explorar si otras enzimas relacionadas con el glutatión, como la glutatión peroxidasa y la glutatión S transferasa, también se modulan en nuestro modelo. También sería interesante investigar si el HGF/Met influye en la vía de las pentosas fosfato, ya que es la principal vía metabólica que suministra NADPH para reducir el glutatión.

De particular interés son los datos relacionados con la regulación de Nrf2. Nrf2 es un factor de transcripción básico con un dominio de tipo cremallera de leucina que desempeña un papel destacado en la respuesta al estrés oxidativo. Como se comentó en la introducción, Nrf2 regula la expresión de enzimas antioxidantes (NADPH: quinona oxidorreductasa 1, NQO1 y hemooxigenasa-1, entre otras), pero también la expresión de enzimas detoxificantes y de genes implicados en el metabolismo lipídico, la degradación proteica y la regulación de la inflamación en respuesta a una explosión de ROS (Zhou J., 2022; Xiao J. L. et al., 2024). Aquí demostramos que, en condiciones colestásicas, la sobreexpresión de Met conduce a un aumento de los niveles de ARNm de Nrf2, siendo esta regulación coincidente con la regulación al alza de *Gclc* y *Gss*, genes diana clásicos de Nrf2. De hecho, ya se ha demostrado que el HGF modula la actividad de Nrf2 en los hepatocitos, aunque el mecanismo exacto no se conoce completamente (Clavijo-Cornejo D. et al., 2013). Basándonos en trabajos anteriores que sugieren que Nrf2 podría ser fundamental para la respuesta al estrés oxidativo en un contexto colestásico, podríamos interpretar nuestros datos de la siguiente manera: la señalización HGF/Met induce una regulación al alza de los niveles de Nrf2 que, a su vez, regula las enzimas antioxidantes, en particular las implicadas en la síntesis de glutatión, y da lugar a un aumento del glutatión total y reducido, responsable de la

protección frente al estrés oxidativo y el daño inducido por la colestasis. No obstante, aún quedan por responder varias cuestiones que se podrían abordar en el futuro, por ejemplo, si la alteración de la señalización de TGF- β inducida por HGF/Met también depende de Nrf2, o si Nrf2 también ejerce otras acciones protectoras, tal vez regulando las enzimas desintoxicantes y/o modulando los transportadores de membrana de los hepatocitos. Muchas evidencias en la literatura apuntan a Nrf2 como posible diana terapéutica en enfermedades hepáticas (Zhou J., 2022). Nuestros datos van en la misma dirección y coinciden específicamente con trabajos anteriores centrados específicamente en la enfermedad colestásica (Fragoulis A. et al., 2019; Kim J. Y., 2021; Li W. K. et al., 2019).

En resumen, los resultados de esta parte del trabajo de tesis doctoral describe que una sobreexpresión moderada de Met en hepatocitos protege frente a un daño colestásico inducido por DDC en el modelo *in vivo*, similar a la CEP (Figura 52) y por la sal biliar TCDC en el modelo *in vitro* (Figura 53). Utilizando enfoques *in vitro* e *in vivo*, describimos los mecanismos implicados en este efecto, una alteración de la señalización de TGF- β y un aumento de las defensas antioxidantes, específicamente a nivel de glutatión, probablemente debido a las acciones de Nrf2. Estos resultados ponen de manifiesto las acciones protectoras del efecto antioxidante de HGF/Met en el contexto colestásico. Al mismo tiempo, indican que es posible modular los niveles de expresión y/o activación de la vía, en el hígado, al menos dentro de un rango, con fines de mejorar la respuesta regenerativa. Asimismo, este estudio añade nuevos datos para apoyar el concepto de una terapia basada en antioxidantes para el tratamiento de la CEP. En la actualidad, las alternativas terapéuticas para el tratamiento de la colestasis aún son muy limitadas, de tal modo que es de vital importancia el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas (Chiang J. Y. L. et al., 2018). En este sentido, este trabajo, además de aportar conocimientos básicos sobre las acciones de la vía HGF/Met en el hígado durante la enfermedad colestásica, abre vías para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento de estas enfermedades.

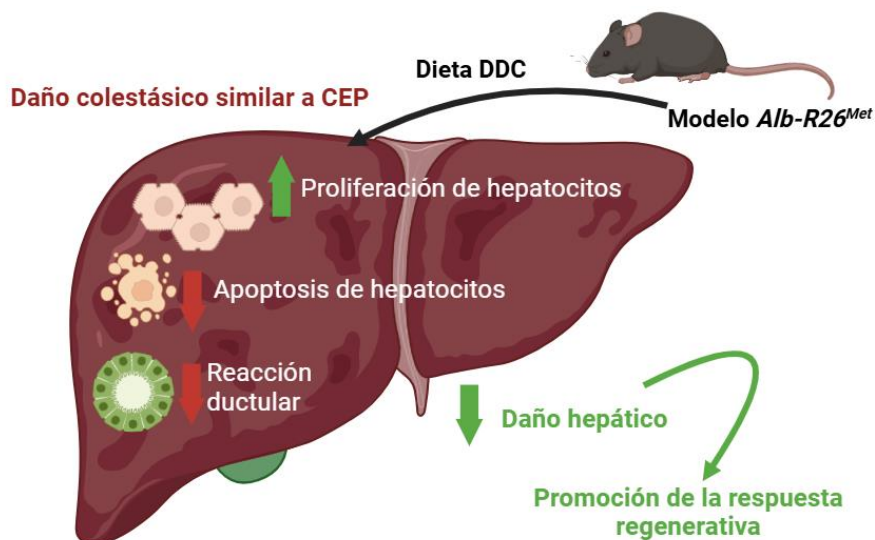


Figura 52. Ilustración esquemática de los efectos de la sobreexpresión de Met en hígados de ratones Tg Met sometidos DDC. La sobreexpresión de Met en ratones Tg Met (*Alb-R26^{Met}*)

sometidos a dieta DDC promueve la proliferación de hepatocitos, menor apoptosis y menor reacción ductular. Creado con: BioRender.com.

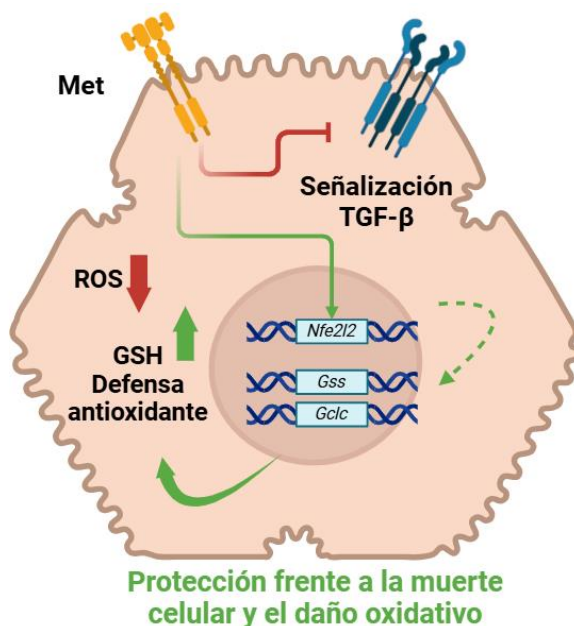


Figura 53. Ilustración esquemática de los efectos de la sobreexpresión de Met en hepatocitos Met sometidos a TCDC. La sobreexpresión de Met en hepatocitos Tg Met sometidos a DDC promueven una respuesta antioxidante más potente mediada por mayores niveles de GSH y expresión aumentada de genes antioxidantes (*Nfe2l2*, *Gss* y *Gclc*) con menores niveles intracelulares de ROS y menor señalización de TGF- β . Creado con: BioRender.com.

Diferentes trabajos descritos en la bibliografía, incluyendo algunos de nuestro grupo de investigación han evidenciado el papel clave de la vía de HGF/Met en la regulación de las CPH/OC (del Castillo G. et al., 2008; Martínez-Palacián A. et al., 2013; Suárez-Causado A., et al, 2015; Almalé L. et al., 2019; Addante, A. et al., 2020; Huang Y. et al., 2019). Estas evidencias han abierto un amplio campo de estudio, ya que esta vía de señalización puede modular el comportamiento de las CPH/OC en diferentes contextos fisiopatológicos, como la respuesta regenerativa frente a un daño colestásico, e impactar de forma significativa en la evolución y el desenlace del proceso. La firma genética de HGF en hepatocitos y su relevancia en el contexto del HCC quedó patente gracias al trabajo de Kaposi Novak P. y colaboradores (2006), sin embargo, aún hay poca información descrita sobre la regulación transcripcional inducida por la vía HGF/Met en CPH/OC, y no hay estudios transcriptómicos globales a este respecto. Con el fin de abordar esta cuestión, se realizó un análisis de expresión génica masivo mediante la tecnología MACE (*Massive Analysis of cDNA Ends*) usando distintos tipos de células ovas: $Met^{-/-}$, $Met^{flx/flx}$, Wt y Tg Met OC que se trataron o no con HGF durante 24h. Siendo $Met^{-/-}$ células carentes de actividad del receptor Met; $Met^{flx/flx}$ células ovas control de las anteriores; las Tg Met OC son células que sobreexpresan el receptor Met de manera moderada y las Wt OC sus células control. Esta variedad de genotipos permite elaborar un cribado de genes asociados a la vía de HGF aportando robustez al estudio. Se determinaron 16 genes comúnmente regulados de forma significativa en las células $Met^{flx/flx}$, Wt y Tg Met CPH/OC, por tratamiento con HGF, y que no se regulaban

en las células Met^{-/-}. De forma estricta, las células Met^{fix/fix} y Wt OC son células ovaes que proceden de dos modelos distintos de modificación genética, pero que tienen un receptor Met y su consiguiente señalización, intactos, lo que permite emplearlas como células Wt, sin embargo, la variedad de genes y sus regulaciones muestran diferencias evidentes; esto puede ser debido a que las CPH/OC constituyen por naturaleza una población de células heterogénea, con distintos grados de diferenciación (Zhang Y., 2003), y esa heterogeneidad se manifiesta en distintas líneas celulares. Además, las dos líneas se cultivan en condiciones diferentes (mostrado en apartado de materiales y métodos). También se puede apreciar modulación de genes por HGF en las células Met^{-/-}, esto podría ser debido a la existencia de rutas alternativas independientes de la actividad quinasa del receptor Met, un fenómeno previamente descrito en algunos tipos celulares (Fan G. et al., 2016).

En un siguiente paso, estos datos se validaron mediante el análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de estos genes en las células y en las condiciones utilizadas en el ensayo MACE. Se consideró que queda validado un gen cuando se reproducía la regulación observada en MACE y lo hacía de forma significativa: de esta forma se validaron 9 genes, 8 de ellos (*Etv4*, *Spry4*, *Prkg2*, *Ggnbp1*, *Pitpnm3*, *Jam2*, *Tiam2* y *Ccnd1*) regulados al alza y 1 (*Dab2*) regulado a la baja durante el tratamiento con HGF, con diferencias principalmente significativas en Tg Met OC, lo que evidencia el efecto potenciador de la sobreexpresión de Met. Los genes *Pls1*, *Tfapa*, *Nr4a1*, *Cyr61*, *Ufsp1*, *Adamts5* y *Pdzk1ip1* diferencialmente regulados en MACE no alcanzaron significatividad estadística en la validación *in vitro* en los experimentos posteriores, aunque algunos de ellos (*Nr4a1*, *Cyr61*, *Ufsp1*, *Adamts5*) mostraban una tendencia clara en el patrón de regulación.

A continuación, se describen algunas de las funciones principales descritas en la bibliografía sobre los genes analizados.

Etv4 (*ETS Variant Transcriptor Factor 4*) es un factor de transcripción que se ha asociado a la progresión tumoral en diferentes tipos de cáncer, actuando a través de diferentes mecanismos, como la promoción de EMT o la regulación de vías de señalización como Ras, PI3K o ERKs (Oh S. et al., 2012). Se ha descrito su participación en el desarrollo de HCC promoviendo proliferación, migración, invasión y metástasis (Xie M. et al., 2023) mediante la señalización de TGF- β por la vía B3GNT3 (*Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-3*) activando la transcripción de genes implicados en el control de la proliferación celular y potenciando la actividad de TGF- β sobre invasión y EMT (Zhou Z. et al., 2023) y la modulación de MMP1. Interesante mencionar que se ha descrito como diana de HGF/Met en otros tipos celulares, como células de carcinoma oral (Hanzawa M. et al., 2000).

De ***Spry4*** (*Sprouty RTK Signaling Antagonist 4*) se ha descrito su papel como modulador negativo de la vía RTK/Ras/MAPK, aunque no se ha descrito su modulación por la vía de Met. Su influencia sobre el desarrollo de HCC es controvertida, ya que se han descrito tanto acciones como supresor de tumores como funciones como oncogén dependiendo del contexto (Sirivatanauksorn Y. et al., 2012; Pan H. et al., 2024). *Spry4* se ha relacionado con la señalización de TGF- β en tumores extrahepáticos como el

rabdomiosarcoma, interfiriendo sobre la activación de p38 inducida por TGF- β 1 (Sun M. et al., 2015).

Prkg2 (*Protein Kinase GMPc dependent 2*) codifica para una proteína con actividad serina/treonina quinasa que inhibe la activación de receptores con actividad tirosina quinasa. De hecho, se ha descrito su papel en la modulación negativa de la activación de Met en células de cáncer gástrico (Wu Y. et al., 2016). Sin embargo, no se sabe nada de su posible papel a nivel hepático.

Pitpnm3 (*Phosphatidylinositol Transfer Protein Membrane 3*) es una proteína localizada en membranas celulares, y que pertenece a una familia de proteínas que catalizan la transferencia de fosfatidil inositol y fosfatidilcolina entre membranas, aunque ella misma carece del dominio que lleva a cabo esta acción (Chen J. et al., 2011). Se ha descrito que PITPNM3 al unirse a su ligando CCL18 (*C-C motif chemokine ligand 18*) promueve migración, invasión y EMT mediante la señalización de la vía NF- κ B en el HCC (Lin Z. et al., 2016). Por otro lado, se ha descrito su papel en la señalización del EGFR como parte de los sitios de contacto entre membranas (*membrane contact sites*), y algunas evidencias sugieren que también podría participar en la señalización disparada por Met (Chen J. et al., 2011). Es por todo ello que es uno de los genes que se ha seleccionado para un estudio más en profundidad en nuestro laboratorio.

Ggnbp1 (*Gametogenetin Binding Protein 1*) se ha descrito su participación en espermatogénesis en ratones en respuesta a diferentes estímulos (Han T. et al., 2020), de hecho, se sabe la vía de HGF/Met está implicada en la regulación de la gametogénesis. Se ha descrito recientemente su presencia en células epiteliales (Zhang J. et al., 2022). Qué función puede llevar a cabo en las células CPH/OC es algo que queda por determinar.

Jam2 (*Junctional Adhesion Molecule 2*) pertenece a la familia de moléculas de adhesión intercelular. La proteína codificada por este gen es una proteína de membrana que se localiza en las uniones estrechas de las células epiteliales y endoteliales (Ricci G. & Catizone A., 2014). Participa en fenómenos de interacción intercelular, y específicamente con diversos tipos de células inmunitarias. Promueve la migración transendotelial de linfocitos (Johnson Léger C. A. et al., 2002) y también regula procesos de adhesión, migración y proliferación en células tumorales (Zhao H., et al, 2016). Se ha visto que Jam2 se expresa en diferentes poblaciones celulares hepáticas, como los fibroblastos portales, las células endoteliales, células estrelladas, células endoteliales y colangiocitos, sin embargo, su expresión en CPH/OC no estaba documentada. Nuestro grupo ha descrito previamente el papel de HGF/Met en la regulación de la migración/invasión de las CPH/OC (Suárez-Causado A., et al, 2015), por lo que es plausible hipotetizar sobre un papel para esta proteína en la regulación de estos procesos. Por otra parte, se ha relacionado un aumento de su expresión con el desarrollo de fibrosis durante un daño hepático en modelos de ratón con un componente autoinmune (Hintermann E. et al., 2018). Sería interesante profundizar en el papel de esta proteína en las CPH/OC en un contexto colestásico. En este sentido, se ha visto que Jam2 está aumentada en modelos murinos de CEP y CEB (Hintermann E. et al., 2018).

Tiam2 (*T-Lymphoma Invasion And Metastasis-Inducing protein 2*) codifica para una proteína con actividad GEF *Guanine nucleotide Exchange Factor*, que controla específicamente la actividad de Rac1. Se ha implicado en fenómenos de migración Rac1-dependientes y activados por EGFR o Met en células de adenocarcinoma de pulmón. Tiam2 no se expresa en el hígado normal, pero se ha encontrado sobreexpresado en un alto porcentaje de HCC y de líneas celulares de HCC, y se ha asociado con una mayor agresividad de los tumores, probablemente debido a su participación en fenómenos de invasión y metástasis (Chen J. S. et al., 2012; Yen W. H. et al., 2016). Es otra proteína candidata a participar en la respuesta pro-migratoria/invasiva del HGF en CPH/OC (Suárez-Causado A. et al., 2015), por lo que sería interesante estudiar si esta respuesta es dependiente de la regulación de esta proteína o si los tumores hepáticos con características de célula progenitora tienen una mayor expresión de este gen.

Dab2 (*Disabled 2, mitogen-responsive phosphoprotein*) es una proteína multifuncional para la que se han descrito numerosas actividades. A nivel de señalización, Dab2 se une a los dominios SH3 de GRB2, una proteína adaptadora que acopla los RTKs a SOS (que modula la activación de Ras), y por lo tanto puede modular la actividad de los RTK compitiendo con SOS para unirse a GRB2 (Zhou J. et al., 2001). Pero también se ha visto que participa en la endocitosis asociada a fosas recubiertas de clatrina (Maurer M. E. & Cooper J. A., 2006). Dab2 sería necesario para la vía de señalización de TGF- β ya que su ausencia provoca una disminución de la fosforilación de Smad2 en respuesta al ligando (Penheiter S.G. et al., 2010). Es importante destacar que Dab2 actúa como un gen supresor de tumores en diferentes tipos de cáncer, por su actividad inhibidora de la ruta ERK/MAPK; por sus funciones reguladoras de los fenómenos de adhesión de las células epiteliales a la membrana basal y su papel en el control de la migración e invasión (Zhou J. et al., 2001). Aunque existe una gran cantidad de información sobre este gen, no se conoce el papel que pueda tener en las CPH/OC. Teniendo en cuenta que el HGF modula a la baja este gen, éste podría ser un mecanismo que favorezca la señalización y las funciones de HGF. Al mismo tiempo, resulta interesante explorar el papel de Dab2 como posible nexo de unión entre la señalización de TGF- β y HGF, que se ha visto que tiene lugar en el hígado colestásico.

Por último, el hecho de que se regule **Ccnd1** (*Cyclin D1*) por HGF en las CPH/OC no es sorprendente, ya que HGF es un potente mitógeno para estas células, y ciclina D1 es una proteína clave en la regulación del ciclo celular.

Los genes **Pls1** (*Plastin 1*) y **Tfap2a** (*Transcription Factor Activating Enhancer binding Protein 2 Alpha*) presentaron un comportamiento en el análisis por RT-qPCR que no se correspondía con el observado en el análisis transcriptómico, sin evidencias de una regulación por HGF, por lo que no fueron validados.

En los genes que se comentan a continuación, los resultados obtenidos mediante RT-qPCR seguían la misma tendencia que lo que se había observado en MACE, pero no presentaban diferencias estadísticamente significativas. Aun así, no descartamos un análisis posterior más en profundidad.

Nr4a1 (*Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 1*), es un factor de transcripción nuclear huérfano del que se han descrito numerosas actividades contexto-dependientes. Se ha visto que es un inhibidor de los procesos fibróticos, actuando sobre

el TGF- β (Gao L. et al., 2024). Asimismo, está implicado en diversos procesos metabólicos, como el metabolismo de los hidratos de carbono y de lípidos, y el equilibrio energético, estando su desregulación asociada a enfermedades metabólicas (Zhang L. et al., 2018). Aunque no se ha descrito su regulación por la vía de HGF/Met, sí que se sabe que es regulado al alza por factores de crecimiento como EGF o VEGF. Comentar por último que Nr4a1 parece ser esencial en la regulación de la señalización temprana durante la regeneración hepática modulando los procesos inflamatorios, apoptóticos y de movilización de energía. Es por todo ello un gen que no carece de interés para estudios futuros (Hu Y. et al., 2014).

Cyr61 (*Cysteine-Rich angiogenic inducer 61*) codifica para la proteína CCN1, una proteína de secreción que interacciona con integrinas y proteoglicanos de la matriz extracelular (ECM, de sus siglas en inglés). Los miembros de la familia a la que pertenece son capaces de modular las interacciones célula-matriz, y la señalización que se deriva de ellas y, por tanto, participar en numerosos procesos biológicos, como la adhesión celular, la proliferación, la angiogénesis y procesos de quimiotaxis. Se ha descrito su participación directa en los procesos de regeneración mediados por CPH/OC, de hecho, ha demostrado ser indispensable para la reacción ductular, y la reparación biliar tras BDL, de tal modo que ratones *knock out* para *Cyr61* presentan una reacción ductular atenuada acompañada de necrosis masiva y alta mortalidad (Kim K.H., et al, 2015). Nuestros datos *in vitro* describen una regulación a la baja de los niveles de *Cyr61* en CPH/OC en respuesta a HGF, por lo que sería realmente interesante esclarecer el papel concreto de esta proteína en la regulación de la biología y función de estas células en el contexto de la enfermedad colestásica.

En esta misma línea de proteínas relacionadas con la matriz extracelular, encontramos también a **Adamts5** (*A Disintegrin-like and Metalloprotease with Thrombospondin Type 1 Motif 5*), proteasa que, como otros miembros de su familia, está involucrada en la destrucción de la ECM, lo que a su vez puede regular la disponibilidad de receptores y ligandos por parte de las células, de tal modo que, *Adamts5* puede controlar diferentes procesos biológicos de manera indirecta. Su papel en la patología hepática es altamente contexto dependiente, por un lado, niveles disminuidos de *Adamts5* se han relacionado con una mayor progresión en el HCC (Rose K. W. J. et al., 2021; Li C. et al., 2015; Barkin J. M., 2023), por otro, ratones *knock out* para *Adamts5* están protegidos frente a NASH (Bauters D. et al., 2016). Se ha descrito un vínculo entre HGF y *Adamts5* en células de riñón. Así, la pérdida de *MEN1* (un regulador epigenético con un papel antifibrótico en el riñón) conduce a una pérdida de expresión de HGF, Met, y *Adamts5*, mientras que la sobreexpresión tenía el efecto contrario. Además, el silenciamiento de HGF también disminuía la expresión de *Adamts5* y la expresión de HGF recombinante humano la elevaba, evidenciando así una regulación dependiente de HGF (Jin B., et al. 2022). Estos hallazgos incitan a explorar esta vía en el contexto hepático.


Ufsp1 (*Ubiquitin-Fold modifier 1 Specific Protease 1*) codifica para una proteína implicada en los procesos de *ufmylation*, una modificación postraducciona l relacionada con el estrés de retículo endoplásmico (ER, de sus siglas en inglés), con la ER-fagia y el control de calidad proteico que tiene lugar en el ER, aunque existen algunas funciones no relacionadas con el ER. Concretamente, *Ufsp1* libera y permite la actividad de *Ufm1* (Komantsu M. et al, 2024). La anulación de genes relacionados con esta vía en ratón provoca daño hepático y una mayor susceptibilidad a carcinógenos como el DEN (N-

Dietilnitrosamina), al mismo tiempo que genera la aparición de tumores hepáticos espontáneos (Chen F. et al., 2023). Este campo de estudio está completamente abierto, porque, aunque se conoce el mecanismo del proceso de *ufmylation*, solo se conocen parcialmente sus vías reguladoras y desde luego se desconoce completamente su papel en las CPH/OC. *Ufsp1* también participa en procesos de activación proteolítica y maduración de proteínas (Millrine D. et al., 2022).

Pdzk1ip1 (PDZK1-interacting protein 1) codifica para la proteína MAP17, una proteína de membrana involucrada en el direccionamiento de proteínas desde el Golgi. Se ha descrito que induce la atracción de células inflamatorias, y regula la expresión de genes relacionados con la inflamación. *Pdzk1ip1* se encuentra sobreexpresado en un alto porcentaje de tumores, tanto de origen epitelial como no epitelial y se ha propuesto como un elemento que podría participar en la conexión tumor-inflamación y tumor-estrés oxidativo (García Heredia J. M. & Carnero A., 2018). No se ha descrito su posible papel en hígado a nivel fisiológico, aunque sí se ha descrito su presencia y función en HCC y colangiocarcinoma (Dong F. et al., 2021). Tampoco se conoce su papel en CPH/OC, y sería particularmente interesante abordar un posible papel de *Pdzk1ip1* en la respuesta antioxidante de la vía de HGF/Met.

Un análisis conjunto de estos genes revela que una gran mayoría de ellos (*Etv4*, *Spry4*, *Prkg2*; *Pitpnm3*, *Dab2* y *Tiam2*, de manera más clara, y quizá otros genes también, de manera más indirecta) están involucrados en la modulación de diferentes vías de señalización (ERKs, Rac1, la unión de Grb2) que son disparadas por HGF, lo que parecería sugerir que la regulación de estos genes por el propio HGF es una forma de regulación de su propia señalización de manera extraordinariamente fina, que probablemente incida sobre los resultados finales a nivel celular. También hay que subrayar la existencia de otro conjunto de genes relacionados con fenómenos a nivel de las membranas celulares y genes relacionados con la ECM (*Jam2*, *Cyr61*, *Pdzk1ip1*, *Adamts5* y de nuevo, *Pitpnm3*). Es claro que cambios a nivel de la ECM impactan en la señalización del HGF (Noriega Guerra H. & Freitas V. M., 2018). En los últimos años, se ha puesto de manifiesto la importancia de la ECM en la biología de las CPH/OC (Zhu C. et al., 2013) y en la enfermedad hepática, incluyendo la fibrosis y el cáncer hepático (Roy A. M. et al, 2023). Otros genes que aparecen en este estudio son difícilmente agrupables: *Ccnd1* (CiclinaD1), cuya regulación evidencia la robustez de este análisis, ya que los efectos mitogénicos del HGF sobre las CPH/OC están plenamente establecidos. El gen *Ggnbp1*, cuya expresión en principio no se esperaría en una célula hepática; el gen *Nr4a1* que participa en numerosas funciones, aunque hay bibliografía previa que lo asocia a la patología hepática; o el gen *Ufsp1* que abre un campo nuevo de estudio que podría abordar el papel de HGF en el control de la *ufmylation*.

Este análisis transcriptómico de genes modulados por HGF en CPH/OC proporciona una información sólida que permitirá, a través de futuros estudios, conocer los mecanismos por los cuales el HGF modula la biología de las CPH/OC, o incluso explorar nuevas funciones antes desconocidas, y todo ello nos permitirá entender la respuesta de estas células frente a daño colestásico, los procesos de regeneración y su probable aplicación en desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas en la enfermedad colestásica. Es, por último, posible, que, haciendo uso de esta información, seamos capaces de modular estas células con fines terapéuticos en una lesión hepática.



Una vez obtenida la firma genética asociada a la vía de señalización HGF/Met en CPH/OC, además de estudiar las funciones que cumplen esos genes en estas células, es importante e interesante explorar si esos genes muestran regulación *in vivo*, en un contexto de daño hepático asociado a la activación y expansión de las CPH/OC. Con ese propósito, se realizó el estudio en el modelo de daño colestásico inducido por dieta DDC, que como se ha comentado ya, es un modelo reconocido de regeneración asociado a la expansión de CPH/OC (Preisegger K. H. et al., 1999), y además, se ha descrito que la vía de HGF/Met tiene un papel clave en la respuesta regenerativa en este modelo (Ishikawa T. et al., 2012). De los genes analizados, dos de ellos (*Etv4* y *Dab2*) no mostraron cambios significativos. Otros dos genes mostraron una modulación diferente a la observada en las CPH/OC *in vitro* (*Cyr61* y *Spry4*). Se encontraron 5 genes (*Prkg2*, *Pitpnm3*, *Ccnd1*, *Adamts5* y *Ufsp1*) que muestran resultados que irían en consonancia con la regulación observada en las CPH/OC *in vitro*, dado que los tres primeros se inducen y los dos últimos se regulan a la baja durante la expansión de CPH/OC inducida por la dieta DDC. Hay que tener en cuenta las limitaciones de este análisis, es decir, que el análisis transcriptómico se realizó en CPH/OC mientras que el presente análisis se realizó en el tejido hepático entero, sin realizar previamente la separación de poblaciones celulares. En este contexto es complejo saber la contribución exacta de la modulación de un determinado gen en las CPH/OC al resultado final obtenido. Es posible, por ejemplo, que los genes que se han visto modulados por HGF en CPH/OC sean también diana del HGF en hepatocitos o es posible, que la modulación sea específica de las CPH/OC y en este caso, esté atenuada o perdida en el análisis global de la muestra hepática. A falta del análisis del resto de genes para completar el panel, *Prkg2*, *Pitpnm3*, *Ccnd1*, *Adamts5* y *Ufsp1* podrían estar implicados en la regulación del proceso de expansión de CPH/OC durante la dieta DDC modulados por HGF, y por tanto, en la regulación de la respuesta regenerativa, aunque salvo para *Ccnd1*, su contribución exacta se desconoce en este momento, y será objeto de estudios futuros.





CONCLUSIONES



1. La sobreexpresión moderada de Met en hígado de ratón confiere protección frente al daño colestásico inducido por la dieta DDC, lo que se evidencia por menores niveles de marcadores séricos de daño hepático, y una mayor ratio peso hígado/peso animal.
2. Este efecto protector no está asociado a una reducción del depósito hepático de fibras de colágeno I y III durante la colestasis, a pesar de observarse cambios en los niveles de expresión de genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular y la fibrosis.
3. La sobreexpresión moderada de Met conduce a una aminoración de la reacción ductular y de la inducción de marcadores de células progenitoras hepáticas, lo que, junto a una menor respuesta apoptótica y mayor proliferación de hepatocitos, sugiere que se promueve una respuesta regenerativa mediada principalmente por hepatocitos.
4. La mejora en la respuesta regenerativa inducida por sobreexpresión de Met está asociada a una menor activación de la vía del TGF- β , lo que se evidencia por una menor expresión de sus receptores de señalización, menores niveles de activación de SMAD2, y de sus dianas transcripcionales.
5. El modelo *in vitro* de colestasis basado en el pretratamiento de hepatocitos con la sal biliar TCDC ha demostrado que en un contexto colestásico los hepatocitos con sobreexpresión de Met (Tg Met) tienen una respuesta aminorada al TGF- β , tanto a nivel de señalización, como de las respuestas prooxidante y apoptótica inducidas.
6. Tanto los ratones Tg Met sometidos a dieta DDC como los hepatocitos Tg Met pretratados con TCDC y TGF- β muestran niveles superiores de expresión de Nrf2 y sus genes diana, en particular enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión, indicando que la sobreexpresión de Met promueve una respuesta antioxidante más eficiente.
7. El análisis transcriptómico de genes modulados por HGF en CPH/OC ha proporcionado un conjunto de genes candidatos para el estudio y la modulación de la respuesta hepática frente a un daño colestásico, así como de la expansión de esta población celular en dicho contexto.





BIBLIOGRAFÍA



Addante A., González Corralejo C., Roncero C., Lazcanoiturburu N., García Sáez J., Herrera B., Sánchez A. (2022). BMP9 Promotes an Epithelial Phenotype and a Hepatocyte-like Gene Expression Profile in Adult Hepatic Progenitor Cells. *Cells*. Jan 21;11(3):365.

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

Afify S.M., Oo A.K.K., Hassan G., Seno A., Seno M. (2021). How can we turn the PI3K/AKT/mTOR pathway down? Insights into inhibition and treatment of cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. Jun;21(6):605-619.

Albright C.D., Salganik R.I., Craciunescu C.N., Mar M.H., Zeisel S.H. (2003). Mitochondrial and microsomal derived reactive oxygen species mediate apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in immortalized rat hepatocytes. *J Cell Biochem*. May 15;89(2):254-61.

Allameh A., Niayesh-Mehr R., Aliarab A., Sebastiani G., Pantopoulos K. (2023). Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease. *Antioxidants (Basel)*. Aug 22;12(9):1653.

Almale L., Garcia Alvaro M., Martinez Palacian A., Garcia Bravo M., Lazcanoiturburu N., Addante A., Roncero C., Sanz J., de la O.L.M., Bragado P., Mikulits W., Factor V.M., Thorgeirsson S.S., Casal J.I., Segovia J.C., Rial E., Fabregat I., Herrera B., Sanchez A. (2019). c-Met signaling is essential for mouse adult liver progenitor cells expansion after TGF-beta-induced EMT and regulates cell phenotypic switch. *Stem Cells*.

Alwayn I.P., Verbese J.E., Kim S., Roy R., Arsenault D.A., Greene A.K., Novak K., Laforme A., Lee S., Moses M.A., Puder M. (2008). A critical role for matrix metalloproteinases in liver regeneration. *J Surg Res*. Apr;145(2):192-8.

Annes J.P., Munger J.S., Rifkin D.B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*. Jan 15;116(Pt 2):217-24.

Arechederra M., Bazai S.K., Abdouni A., Sequera C., Mead T.J., Richelme S., et al. (2021). ADAMTSL5 is an epigenetically activated gene underlying tumorigenesis and drug resistance in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 74: 893-906.

Banerjee P., Kumaravel S., Roy S., Gaddam N., Odeh J., Bayless K.J., Glaser S., Chakraborty S. (2023). Conjugated Bile Acids Promote Lymphangiogenesis by Modulation of the Reactive Oxygen Species-p90RSK-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Pathway. *Cells*. Feb 6;12(4):526.

Bárcena C., Aran G., Perea L., Sanjurjo L., Téllez É., Oncins A., Masnou H., Serra I., García-Gallo M., Kremer L., Sala M., Armengol C., Sancho-Bru P., Sarrias M.R. (2019). CD5L is a pleiotropic player in liver fibrosis controlling damage, fibrosis and immune cell content. *EBioMedicine*. May;43:513-524.

- Barkin J.M., Jin-Smith B., Torok K., Pi L. (2023). Significance of CCNs in liver regeneration. *J Cell Commun Signal*. Jun;17(2):321-332.
- Bauters D., Spincemaille P., Geys L., Cassiman D., Vermeersch P., Bedossa P., Scroyen I., Lijnen H.R. (2016). ADAMTS5 deficiency protects against non-alcoholic steatohepatitis in obesity. *Liver Int*. Dec;36(12):1848-1859.
- Bedard K., Krause K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. Jan;87(1):245-313.
- Bedoyan S. M., Lovell O. T., Horslen S. P., Squires J. E. (2022). Odevixibat: a promising new treatment for progressive familial intrahepatic cholestasis. *Expert Opin Pharmacother*.;23(16):1771-1779.
- Behari J. (2010). The Wnt/ β -catenin signaling pathway in liver biology and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. Dec;4(6):745-56.
- Berardis S., Lombard C., Evraerts J., El Taghdouini A., Rosseels V., Sancho-Bru P., Lozano J.J., van Grunsven L., Sokal E., Najimi M. (2014). Gene expression profiling and secretome analysis differentiate adult-derived human liver stem/progenitor cells and human hepatic stellate cells. *PLoS One*. Jan 21;9(1):e86137.
- Berasain C., Arechederra M., Argemí J., Fernández-Barrena M.G., Avila M.A. (2023). Loss of liver function in chronic liver disease: An identity crisis. *J Hepatol*. Feb;78(2):401-414.
- Bernabeu C., Lopez-Novoa J.M., Quintanilla M. (2009). The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta*. Oct;1792(10):954-73.
- Bertotti A., Comoglio P.M. (2003). Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the HGF receptor. *Trends Biochem Sci*. Oct;28(10):527-33.
- Black D., Lyman S., Qian T., Lemasters J.J., Rippe R.A., Nitta T., Kim J.S., Behrns K.E. (2007). Transforming growth factor beta mediates hepatocyte apoptosis through Smad3 generation of reactive oxygen species. *Biochimie*. Dec;89(12):1464-73.
- Bladt F., Riethmacher D., Isenmann S., Aguzzi A., and Birchmeier C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768-771.
- Blazquez A.G., Briz O., Romero M.R., Rosales R., Monte M.J., Vaquero J., Macias R.I., Cassio D., Marin J.J. (2012). Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Mol Pharmacol*. Feb;81(2):273-83.
- Borowiak M., Garratt A.N., Wustefeld T., Strehle M., Trautwein C., Birchmeier C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10608-10613.
- Budi, E.H., Duan, D., and Derynck, R. (2017). Transforming Growth Factor-beta Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. *Trends Cell Biol* 27, 658-672.

Buggiano, V. et al. (2001). Impairment of mammary lobular development induced by expression of TGFbeta1 under the control of WAP promoter does not suppress tumorigenesis in MMTV-infected transgenic mice. *Int J. Cancer* 92, 568–576.

Caja L., Bertran E., Campbell J., Fausto N., and Fabregat I. (2011). The transforming growth factor-beta (TGF-beta) mediates acquisition of a mesenchymal stem cell-like phenotype in human liver cells. *J Cell Physiol* 226, 1214-1223.

Caja L., Ortiz C., Bertran E., Murillo M.M., Miro-Obradors M.J., Palacios E., and Fabregat I. (2007). Differential intracellular signalling induced by TGF-beta in rat adult hepatocytes and hepatoma cells: implications in liver carcinogenesis. *Cell Signal* 19, 683-694.

Cantz T., Manns M.P., Ott M. (2008). Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res.* Jan;331(1):271-82.

Cao X.F., Jin S.Z., Sun L., Zhan Y.B., Lin F., Li Y., Zhou Y.L., Wang X.M., Gao L., Zhang B. (2017). Therapeutic effects of hepatocyte growth factor-overexpressing dental pulp stem cells on liver cirrhosis in a rat model. *Sci Rep.* Nov 17;7(1):15812.

Carmona-Cuenca I., Roncero C., Sancho P., Caja L., Fausto N., Fernandez M., and Fabregat I. (2008). Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. *J Hepatol* 49, 965-976.

Chauhan A., Lorenzen S., Herzel H., Bernard S. (2011). Regulation of mammalian cell cycle progression in the regenerating liver. *J Theor Biol.*;283(1):103-12.

Chen F., Sheng L., Zhou T., Yan L., Loveless R., Li H., Teng Y., and Cai Y. (2023). Loss of Ufl1/Ufbp1 in hepatocytes promotes liver pathological damage and carcinogenesis through activating mTOR signaling. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 42, 110.

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

Chen J., Gingold J.A., Su X. (2019). Immunomodulatory TGF-β Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Trends Mol Med.* Nov;25(11):1010-1023.

Chen J. S., Su I.J., Leu Y.W., Young K.C., Sun H.S. (2012). Expression of T-cell lymphoma invasion and metastasis 2 (TIAM2) promotes proliferation and invasion of liver cancer. *Int J Cancer.* Mar 15;130(6):1302-13.

Chen J., Yao Y., Gong C., Yu F., Su S., Chen J., Liu B., Deng H., Wang F., Lin L., Yao H., Su F., Anderson K.S., Liu Q., Ewen M.E., Yao X., Song E. (2011). CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell.* Apr 12;19(4):541-55.

Chen P.Y., Qin L., Simons M. (2023). TGFβ signaling pathways in human health and disease. *Front Mol Biosci.* Jun 1;10:1113061.

Chen Z., Tian R., She Z., Cai J., Li H. (2020). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.* May 20;152:116-141.

- Chiang J. Y. (2009) Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.* Oct;50(10):1955-66.
- Chiang J.Y.L., Ferrell J.M. (2020). Bile acid receptors FXR and TGR5 signaling in fatty liver diseases and therapy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Mar 1;318(3):G554-G573.
- Cienfuegos J. A., Rotellar F., Baixauli J., Martínez Regueira F., Pardo F., Hernández Lizoáin J. L. (2014). Liver Regeneration-the Best Kept Secret. A Model of Tissue Injury Response. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 106, 171–194.
- Cichoż-Lach H., Michalak A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol.* Jul 7;20(25):8082-91.
- Clark I.M., Swingler T.E., Sampieri C.L., Edwards D.R. (2008). The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(6-7):1362-78.
- Clavijo-Cornejo D., Enriquez Cortina C., López-Reyes A., Domínguez-Pérez M., Nuño N., Domínguez-Meraz M., Bucio L., Souza V., Factor V.M., Thorgeirsson S.S., Gutiérrez-Ruiz M.C., Gómez-Quiroz L.E. (2013). Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie.* Jun;95(6):1177-84.
- Clouston A.D., Powell E.E., Walsh M.J., Richardson M.M., Demetris A.J., and Jonsson J.R. (2005). Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology* 41, 809-818.
- Cohn V.H., Lyle J. (1980). A fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem.* 14(3):434-40.
- Copple B.L., Jaeschke H., Klaassen C.D. (2010). Oxidative stress and the pathogenesis of cholestasis. *Semin Liver Dis.* May;30(2):195-204.
- Coulouarn C., Factor V.M., Thorgeirsson S.S. (2008). Transforming growth factor-beta gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology.* Jun;47(6):2059-67.
- Couto N., Wood J., Barber J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med.* Jun;95:27-42.
- Crosas-Molist E., Bertran E., and Fabregat I. (2015). Cross-Talk Between TGF-beta and NADPH Oxidases During Liver Fibrosis and Hepatocarcinogenesis. *Curr Pharm Des* 21, 5964-5976.
- Cuesta A.M., Palao N., Bragado P., Gutierrez-Uzquiza A., Herrera B., Sánchez A., Porrás A. (2023). New and Old Key Players in Liver Cancer. *Int J Mol Sci.* Dec 5;24(24):17152.
- Cui D., Yang B. (2016). Research progress of Nrf2 signal pathway and hepatocyte apoptosis. *J. Pract. Hepatol.* 19, 365–368.

Darwiche H., Oh S.H., Steiger Luther N.C., Williams J.M., Pintilie D.G., Shupe T.D., Petersen B.E. (2011). Inhibition of Notch signaling affects hepatic oval cell response in rat model of 2AAF-PH. *Hepat Med* 3, 89-98.

de Haan L.R., Reiniers M.J., Reeskamp L.F., Belkouz A., Ao L., Cheng S., Ding B., van Golen R.F., Heger M. (2022). Experimental Conditions That Influence the Utility of 2'7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH₂-DA) as a Fluorogenic Biosensor for Mitochondrial Redox Status. *Antioxidants (Basel)*. Jul 22;11(8):1424.

De la Vega A., Remacha F. E. (2015). Síndrome colestático. Actitud diagnóstico-terapéutica. Servicio de Hepatología y Trasplante Hepático Hospital Universitario Infantil La Paz.

del Castillo G., Alvarez Barrientos A., Carmona Cuenca I., Fernandez M., Sanchez A., Fabregat I. (2008a). Isolation and characterization of a putative liver progenitor population after treatment of fetal rat hepatocytes with TGF-beta. *J Cell Physiol* 215, 846-855.

del Castillo G., Factor, V.M., Fernandez M., Alvarez-Barrientos A., Fabregat I., Thorgeirsson S.S., and Sanchez A. (2008b). Deletion of the Met tyrosine kinase in liver progenitor oval cells increases sensitivity to apoptosis in vitro. *Am J Pathol* 172, 1238-1247.

del Castillo G., Murillo M.M., Alvarez-Barrientos A., Bertran E., Fernandez M., Sanchez A., and Fabregat I. (2006). 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* 312, 2860-2871.

Delire B., Starkel P., and Leclercq I. (2015). Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. *J Clin Transl Hepatol* 3, 53-66.

Deng Z., Fan T., Xiao C., Tian H., Zheng Y., Li C., He J. (2024). TGF- β signaling in health, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. Mar 22;9(1):61.

Denissova N.G., Pouponnot C., Long J., He D., Liu F. (2000). Transforming growth factor beta -inducible independent binding of SMAD to the Smad7 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6;97(12):6397-402.

Devan A.R., Pavithran K., Nair B., Murali M., Nath L.R. (2022). Deciphering the role of transforming growth factor-beta 1 as a diagnostic-prognostic-therapeutic candidate against hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. Sep 28;28(36):5250-5264.

Dewidar B., Soukupova J., Fabregat I., and Dooley S. (2015). TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis: Updated. *Current Pathobiology Reports* 3, 291-305.

Diebold B.A., Wilder S.G., De Deken X., Meitzler J.L., Doroshov J.H., McCoy J.W., Zhu Y., Lambeth J.D. (2019). Guidelines for the Detection of NADPH Oxidases by Immunoblot and RT-qPCR. *Methods Mol Biol*. 1982:191-229.

- Dixon L. J., Barnes M., Tang H., Pritchard M.T., Nagy L.E. (2013). Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol.* 3(2):785-97.
- Dong F., Li R., Wang J., Zhang Y., Yao J., Jiang S.H., Hu X., Feng M., Bao Z. (2021). Hypoxia-dependent expression of MAP17 coordinates the Warburg effect to tumor growth in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* Apr 8;40(1):121.
- Dong X., Liu J., Xu Y., Cao H. (2019). Role of macrophages in experimental liver injury and repair in mice. *Exp Ther Med.* May;17(5):3835-3847.
- Dooley S., Hamzavi J., Ciucian L., Godoy P., Ilkavets I., Ehnert S., Ueberham E., Gebhardt R., Kanzler S., Geier A., Breitkopf K., Weng H., and Mertens P.R. (2008). Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology* 135, 642-659.
- Dreyfuss J.L., Regatieri C.V., Jarrouge T.R., Cavalheiro R.P., Sampaio L.O., Nader H.B. (2009). Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc.* Sep;81(3):409-29.
- Dropmann A., et al. (2020). TGF- β 2 silencing to target biliary-derived liver diseases. *Gut.* Sep;69(9):1677-1690.
- Dubois V., Staels B., Lefebvre P., Verzi M.P., Eeckhoutte J. (2020). Control of Cell Identity by the Nuclear Receptor HNF4 in Organ Pathophysiology. *Cells.* Sep 28;9(10):2185.
- Duncan, A. W., Dorrell, C., and Grompe, M. (2009). Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 137, 466-481.
- Edfors F., Danielsson F., Hallström B.M., Käll L., Lundberg E., Pontén F., Forsström B., Uhlén M. (2016). Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues. *Mol Syst Biol.* Oct 20;12(10):883.
- Ellerby L.M., Bredesen D.E. (2000). Measurement of cellular oxidation, reactive oxygen species, and antioxidant enzymes during apoptosis. *Methods Enzymol.* 322:413-21.
- Espanol-Suñer R., Carpentier R., Van Hul N., Legry V., Achouri Y., Cordi S., Jacquemin P., Lemaigre F., and Leclercq I.A. (2012). Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology* 143, 1564-1575 e1567.
- Espinosa-Diez C., Miguel V., Mennerich D., Kietzmann T., Sánchez-Pérez P., Cadenas S., Lamas S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* Dec;6:183-197.
- Espinosa Sotelo R., Fusté N.P., Peñuelas-Haro I., Alay A., Pons G., Almodóvar X., Albaladejo J., Sánchez-Vera I., Bonilla-Amadeo R., Dituri F., Serino G., Ramos E., Serrano T., Calvo M., Martínez-Chantar M.L., Giannelli G., Bertran E., Fabregat I. (2023). Dissecting the role of the NADPH oxidase NOX4 in TGF-beta signaling in hepatocellular carcinoma. *Redox Biol.* Sep;65:102818.

European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol.* 2009 Aug;51(2):237-67.

Fabregat I., Malfettone A., and Soukupova J. (2016a). New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *J Clin Med* 5.

Fabregat I., Moreno-Caceres J., Sanchez A., Dooley S., Dewidar B., Giannelli G., Ten Dijke P., and Consortium I. L. (2016b). TGF-beta signalling and liver disease. *FEBS J* 283, 2219-2232.

Farooqui N., Elhence A., Shalimar. (2022). A Current Understanding of Bile Acids in Chronic Liver Disease. *J Clin Exp Hepatol.* Jan-Feb;12(1):155-173.

Fan G., Zhang S., Gao Y., Greer P.A., Tonks N.K. (2016). HGF-independent regulation of MET and GAB1 by nonreceptor tyrosine kinase FER potentiates metastasis in ovarian cancer. *Genes Dev.* Jul 1;30(13):1542-57.

Fan Y., Arechederra M., Richelme S., Daian F., Novello C., Calderaro J., Di Tommaso L., Morcrette G., Rebouissou S., Donadon M., Morengi E., Zucman-Rossi J., Roncalli M., Dono R., and Maina F. (2017). A phosphokinome-based screen uncovers new drug synergies for cancer driven by liver-specific gain of nononcogenic receptor tyrosine kinases. *Hepatology* 66, 1644-1661.

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

Fickert P., Thueringer A., Moustafa T., Silbert D., Gumhold J., Tsybrovskyy O., Lebofsky M., Jaeschke H., Denk H., Trauner M. (2010). The role of osteopontin and tumor necrosis factor alpha receptor-1 in xenobiotic-induced cholangitis and biliary fibrosis in mice. *Lab Invest.* Jun;90(6):844-52.

Fragoulis A., Schenkel J., Herzog M., Schellenberg T., Jahr H., Pufe T., Trautwein C., Kensler T.W., Streetz K.L., Wruck C.J. (2019). Nrf2 Ameliorates DDC-Induced Sclerosing Cholangitis and Biliary Fibrosis and Improves the Regenerative Capacity of the Liver. *Toxicol Sci.* Jun 1;169(2):485-498.

Fuertes-Agudo M., Luque-Tévar M., Cucarella C., Martín-Sanz P., Casado M. (2023). Advances in Understanding the Role of NRF2 in Liver Pathophysiology and Its Relationship with Hepatic-Specific Cyclooxygenase-2 Expression. *Antioxidants (Basel).* Jul 26;12(8):1491.

Gan C., Cai Q., Tang C., Gao J. (2022). Inflammasomes and Pyroptosis of Liver Cells in Liver Fibrosis. *Front Immunol.* May 30;13:896473.

García-Heredia J. M., Carnero A. Dr. Jekyll and Mr. Hyde. (2018). MAP17's up-regulation, a crosspoint in cancer and inflammatory diseases. *Mol Cancer.* Apr 12;17(1):80.

Garcia-Ruiz C., Fernández-Checa J.C. (2007). Redox regulation of hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol.* Jun;22 Suppl 1:S38-42.

García-Sáez J., Figueroa-Fuentes M., González-Corrales C., Roncero C., Lazcanoiturburu N., Gutiérrez-Uzquiza Á., Vaquero J., González-Sánchez E., Bhutia K., Calero-Pérez S., Maina F., Traba J., Valverde Á.M., Fabregat I., Herrera B., Sánchez A. (2024). Uncovering a Novel Functional Interaction Between Adult Hepatic Progenitor Cells, Inflammation and EGFR Signaling During Bile Acids-Induced Injury. *Int J Biol Sci.* Apr 8;20(7):2339-2355.

Gao L., Wang H., Fang F., Liu J., Zhao C., Niu J., Wang Z., Zhong Y., Wang X. (2024). The roles of orphan nuclear receptor 4 group A1 and A2 in fibrosis. *Int Immunopharmacol.* Sep 30;139:112705.

Geier A., Dietrich C.G., Voigt S., Ananthanarayanan M., Lammert F., Schmitz A., Trauner M., Wasmuth H.E., Boraschi D., Balasubramanian N., Suchy F.J., Matern S., Garton C. (2005). Cytokine-dependent regulation of hepatic organic anion transporter gene transactivators in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Nov;289(5):G831-41.

Giebeler A., Boekschoten M.V., Klein C., Borowiak M., Birchmeier C., Gassler N., Wasmuth H.E., Muller M., Trautwein C., and Streetz K.L. (2009). c-Met confers protection against chronic liver tissue damage and fibrosis progression after bile duct ligation in mice. *Gastroenterology* 137, 297-308, 308 e291-294.

Giordano S., and Columbano A. (2014). Met as a therapeutic target in HCC: facts and hopes. *J Hepatol* 60, 442-452.

Gohda E., Tsubouchi H., Nakayama H., Hirono S., Sakiyama O., Takahashi K., et al. (1989). Purification and partial characterization of Hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J Clin Invest* 81:414-9.

Gomez Aldana A. J. et al. (2020). Colestasis en el adulto: enfoque diagnóstico y terapéutico. Revisión de tema. *Revista colombiana de gastroenterología.*

Gomez Quiroz L.E., Seo D., Lee Y.H., Kitade M., Gaiser T., Gillen M., Lee S.B., Gutierrez-Ruiz M.C., Conner E.A., Factor V.M., Thorgeirsson S.S., Marquardt J.U. (2016). Loss of c-Met signaling sensitizes hepatocytes to lipotoxicity and induces cholestatic liver damage by aggravating oxidative stress. *Toxicology.* Jun 15;361-362:39-48.

González M.N., de Mello W., Butler-Browne G.S., Silva-Barbosa S.D., Mouly V., Savino W., Riederer I. (2017). HGF potentiates extracellular matrix-driven migration of human myoblasts: involvement of matrix metalloproteinases and MAPK/ERK pathway. *Skelet Muscle.* Oct 10;7(1):20.

González-Rodríguez A., Escribano O., Alba J., Rondinone C.M., Benito M., Valverde A.M. (2007). Levels of protein tyrosine phosphatase 1B determine susceptibility to apoptosis in serum-deprived hepatocytes. *J Cell Physiol.* Jul;212(1):76-88.

Griffith O.W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.* Jul 15;106(1):207-12.

Guyton C. A. & Hall J.E. (2021). *Tratado de FISIOLÓGIA MÉDICA.* Elsevier.

- Hanzawa M., Shindoh M., Higashino F., Yasuda M., Inoue N., Hida K., Ono M., Kohgo T., Nakamura M., Notani K., Fukuda H., Totsuka Y., Yoshida K., Fujinaga K. (2000). Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. *Carcinogenesis*. Jun;21(6):1079-85.
- Han T., Wang L., Tang W., Zhang Z., Khawar M.B., Li G., Jiang H., Liu C. (2020). GGNBP1 ensures proper spermiogenesis in response to stress in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. May 7;525(3):706-713.
- Hao J., Wu J., Yang Q., Lu K., Xu Y., Chen Y., Liu J., Shao X., Zhu C., Ding Y., Xie X. (2023). Gentiopicroside Ameliorated Ductular Reaction and Inflammatory Response in DDC-induced Murine Cholangiopathies Model. *Curr Mol Pharmacol*.
- He F., Ru X., Wen T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci*. Jul 6;21(13):4777.
- Heikkila R.E., Cabbat F. (1976). A sensitive assay for superoxide dismutase based on the autoxidation of 6-hydroxydopamine. *Anal Biochem*. Oct;75(2):356-62.
- Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2016). Signaling Receptors for TGF-beta Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.
- Herranz-Iturbide M., López-Luque J., Gonzalez-Sanchez E., Caballero-Díaz D., Crosas-Molist E., Martín-Mur B., Gut M., Esteve-Codina A., Jaquet V., Jiang J.X., Török N.J., Fabregat I. (2021). NADPH oxidase 4 (Nox4) deletion accelerates liver regeneration in mice. *Redox Biol*. Apr;40:101841.
- Herrera B., Alvarez A.M., Sanchez A., Fernandez M., Roncero C., Benito M., and Fabregat I. (2001). Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J* 15, 741-751.
- Herrera B., Murillo M.M., Alvarez-Barrientos A., Beltrán J., Fernández M., Fabregat I. (2004). Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med*. Jan 1;36(1):16-26.
- Hintermann E., Bayer M., Conti C.B., Fuchs S., Fausther M., Leung P.S., Aurrand-Lions M., Taubert R., Pfeilschifter J.M., Friedrich-Rust M., Schuppan D., Dranoff J.A., Gershwin M.E., Manns M.P., Imhof B.A., Christen U. (2018). Junctional adhesion molecules JAM-B and JAM-C promote autoimmune-mediated liver fibrosis in mice. *J Autoimmun*. Jul;91:83-96.
- Hissin P.J., Hilf R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. Jul;74(1):214-26.
- Hoffmann K., Nagel A.J., Tanabe K., Fuchs J., Dehlike K., Ghamarnejad O., Lemekhova A., Mehrabi A. (2020). Markers of liver regeneration-the role of growth factors and cytokines: a systematic review. *BMC Surg*. Feb 12;20(1):31.
- Holczbauer Á., Wangensteen K.J, Shin S. (2021). Cellular origins of regenerating liver and hepatocellular carcinoma. *JHEP Rep*. Dec 13;4(4):100416.

- Hora S., Wuestefeld T. (2023). Liver Injury and Regeneration: Current Understanding, New Approaches, and Future Perspectives. *Cells*. Aug 22;12(17):2129.
- Hristov B.D. (2022). The Role of Glutathione Metabolism in Chronic Illness Development and Its Potential Use as a Novel Therapeutic Target. *Cureus*. Sep 28;14(9):e29696.
- Huang M., Jiao J., Cai H., Zhang Y., Xia Y., Lin J., Shang Z., Qian Y., Wang F., Wu H., Kong X., Gu J. (2022). C-C motif chemokine ligand 5 confines liver regeneration by down-regulating reparative macrophage-derived hepatocyte growth factor in a forkhead box O 3a-dependent manner. *Hepatology*. Dec;76(6):1706-1722.
- Huang R., Zhang X., Gracia Sancho J., Xie W.F. (2022). Liver regeneration: Cellular origin and molecular mechanisms. *Liver Int*. Jul;42(7):1486-1495.
- Huang S.S., Huang J.S. (2005). TGF-beta control of cell proliferation. *J Cell Biochem*. Oct 15;96(3):447-62. doi: 10.1002/jcb.20558. PMID: 16088940.
- Huang Y., Miyoshi T., Sakai Y., Hara T., Gu W.L., Eguchi S. (2019). Role of HGF for reprogramming human liver progenitor cells: Non-essential but stimulative supplement. *J Hepatol*. Aug;71(2):438-439.
- Huh C.G., Factor V.M., Sanchez A., Uchida K., Conner E.A., and Thorgeirsson, S.S. (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4477-4482.
- Hundt M., Basit H., John S. (2022). Physiology, Bile Secretion. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls
- Hu Y., Zhan Q., Liu H.X., Chau T., Li Y., Wan Y.J. (2014). Accelerated partial hepatectomy-induced liver cell proliferation is associated with liver injury in Nur77 knockout mice. *Am J Pathol*. Dec;184(12):3272-83.
- Hybertson B.M., Gao B., Bose S.K., McCord J.M. (2011). Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med*. Aug;32(4-6):234-46.
- Ibrahim E., Diakonov I., Arunthavarajah D., Swift T., Goodwin M., McIlvride S., Nikolova V., Williamson C., Gorelik J. (2018). Bile acids and their respective conjugates elicit different responses in neonatal cardiomyocytes: role of Gi protein, muscarinic receptors and TGR5. *Sci Rep*. 8;8(1):7110.
- Inagaki Y., Higashi K., Kushida M., Hong Y.Y., Nakao S., Higashiyama R., Moro T., Itoh J., Mikami T., Kimura T., Shiota G., Kuwabara I., and Okazaki I. (2008). Hepatocyte growth factor suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with galectin-7. *Gastroenterology* 134, 1180-1190.
- Ishikawa T., Factor V.M., Marquardt J.U., Raggi C., Seo D., Kitade M., Conner E.A., and Thorgeirsson S.S. (2012). Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice. *Hepatology* 55, 1215-1226.
- Itoh T., and Miyajima A. (2014). Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology* 59, 1617-1626.

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

Jin B., Zhu J., Zhou Y., Liang L., Yang Y., Xu L., Zhang T., Li P., Pan T., Guo B., Chen T., Li H. (2022). Loss of MEN1 leads to renal fibrosis and decreases HGF-Adamts5 pathway activity via an epigenetic mechanism. *Clin Transl Med*. Aug;12(8):e982.

Johnson-Léger C.A., Aurrand-Lions M., Beltraminelli N., Fasel N., Imhof B.A. (2002). Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood*. Oct 1;100(7):2479-86.

Jonker J.W., Buitelaar M., Wagenaar E., Van Der Valk M.A., Scheffer G.L., Scheper R.J., Plosch T., Kuipers F., Elferink R.P., Rosing H., Beijnen J.H., Schinkel A.H. (2002). The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 26;99(24):15649-54.

Jung K.A., Choi B.H., Kwak M.K. (2015). The c-MET/PI3K signaling is associated with cancer resistance to doxorubicin and photodynamic therapy by elevating BCRP/ABCG2 expression. *Mol Pharmacol*. 87(3):465-76.

Jung K., Kim M., So J., Lee S.H., Ko S., Shin D. (2021). Farnesoid X Receptor Activation Impairs Liver Progenitor Cell-Mediated Liver Regeneration via the PTEN-PI3K-AKT-mTOR Axis in Zebrafish. *Hepatology*. Jul;74(1):397-410.

Kamoto D., Burch M.L., Piva T.J., Rezaei H.B., Rostam M.A., Xu S., Zheng W., Little P.J., Osman N. (2013). Transforming growth factor- β signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation. *Cell Signal*. Oct;25(10):2017-24.

Kaposi-Novak P., Lee J.S., Gómez-Quiroz L., Coulouarn C., Factor V.M., Thorgeirsson S.S. (2006). Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest*. Jun;116(6):1582-95.

Kaur S., Siddiqui H., Bhat M.H. Hepatic Progenitor Cells in Action: Liver Regeneration or Fibrosis?. (2015). *Am J Pathol*. Sep;185(9):2342-50.

Kazuhiro N., Hidetaka Y., Yoko F., Takao T., Kenji W. I., Kenji N. (2003). PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FEBS*. 546, + 2–3,+ 181-184.

Keitel V., Häussinger D. (2018). Role of TGR5 (GPBAR1) in Liver Disease. *Semin Liver Dis*. Nov;38(4):333-339.

Kim J.Y., Choi Y., Leem J., Song J.E. (2021). Heme Oxygenase-1 Induction by Cobalt Protoporphyrin Ameliorates Cholestatic Liver Disease in a Xenobiotic-Induced Murine Model. *Int J Mol Sci*. Jul 31;22(15):8253.

Kim K.H., Chen C.C., Alpini G., Lau L.F. (2015). CCN1 induces hepatic ductular reaction through integrin $\alpha\beta_5$ -mediated activation of NF- κ B. *J Clin Invest*. May;125(5):1886-900.

- Kimura M., Moteki H., Ogihara M. (2023). Role of Hepatocyte Growth Regulators in Liver Regeneration. *Cells*. Jan 4;12(2):208.
- Kiseleva Y.V., Antonyan S.Z., Zharikova T.S., Tupikin K.A., Kalinin D.V., Zharikov Y.O. (2021). Molecular pathways of liver regeneration: A comprehensive review. *World J Hepatol*. Mar 27;13(3):270-290.
- Kister B., Viehof A., Rolle-Kampczyk U., Schwentker A., Treichel N.S., Jennings S.A.V., Wirtz T.H., Blank L.M., Hornef M.W., von Bergen M., Clavel T., Kuepfer L. (2023). A physiologically based model of bile acid metabolism in mice. *iScience*. Sep 17;26(10):107922.
- Klindt C., Reich M., Hellwig B., Stindt J., Rahnenführer J., Hengstler J.G., Köhrer K., Schoonjans K., Häussinger D., Keitel V. (2019). The G Protein-Coupled Bile Acid Receptor TGR5 (Gpbar1) Modulates Endothelin-1 Signaling in Liver. *Cells*. 8(11):1467.
- Köhn-Gaone, J., Gogoi-Tiwari, J., Ramm, G.A., Olynyk, J.K., and Tirnitz-Parker, J.E. (2016). The role of liver progenitor cells during liver regeneration, fibrogenesis, and carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 310, G143-154.
- Komatsu M., Inada T., Noda N.N. (2024). The UFM1 system: Working principles, cellular functions, and pathophysiology. *Mol Cell*. Jan 4;84(1):156-169.
- Kosters A., Karpen S.J. (2008). Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica*. 38(7-8):1043-71.
- Krishna M. (2014) Anatomía microscópica del hígado. *Clin Liver Dis Hoboken*. 13;2 (Suppl 5): 109-112.
- Krones E., Erwa W., Trauner M., Fickert P. (2018). Serum alkaline phosphatase levels accurately reflect cholestasis in mice. *Hepatology*. Sep;62(3):981-3.
- Kubitz R., Dröge C., Stindt J., Weissenberger K., Häussinger D. (2012). The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. Dec;36(6):536-53.
- Kuhajda K., Kandrac J., Kevresan S., Mikov M., Fawcett J.P. (2006) Structure and origin of bile acids: an overview. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 31(3):135-43.
- Kumamoto R., Uto H., Oda K., Ibusuki R., Tanoue S., Arima S., Mawatari S., Kumagai K., Numata M., Tamai T., Moriuchi A., Fujita H., Oketani M., Ido A., Tsubouchi H. (2013). Dietary fructose enhances the incidence of precancerous hepatocytes induced by administration of diethylnitrosamine in rat. *Eur J Med Res*. Dec 9;18(1):54.
- Kuramitsu, K., Sverdlov, D.Y., Liu, S.B., Csizmadia, E., Burkly, L., Schuppan, D., Hanto, D.W., Otterbein, L.E., and Popov, Y. (2013). Failure of fibrotic liver regeneration in mice is linked to a severe fibrogenic response driven by hepatic progenitor cell activation. *Am J Pathol* 183, 182-194.
- Kwo P.Y., Cohen S.M., Lim J.K. (2017). ACG Clinical Guideline: Evaluation of Abnormal Liver Chemistries. *Am J Gastroenterol*. Jan;112(1):18-35.

Lamouille S., Xu J., and Derynck R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 178-196.

Lazcanoiturburu N., García-Sáez J., González-Corrales C., Roncero C., Sanz J., Martín-Rodríguez C., Valdecantos M.P., Martínez-Palacián A., Almalé L., Bragado P., Calero-Pérez S., Fernández A., García-Bravo M., Guerra C., Montoliu L., Segovia J.C., Valverde Á.M., Fabregat I., Herrera B., Sánchez A. (2022). Lack of EGFR catalytic activity in hepatocytes improves liver regeneration following DDC-induced cholestatic injury by promoting a pro-restorative inflammatory response. *J Pathol.* Nov;258(3):312-324.

Lee Y.S., Seki E. (2023). In Vivo and In Vitro Models to Study Liver Fibrosis: Mechanisms and Limitations. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 16(3):355-367.

Lichtinghagen R., Musholt P.B., Lein M., Römer A., Rudolph B., Kristiansen G., Hauptmann S., Schnorr D., Loening S.A., Jung K. (2002). Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol.* Oct;42(4):398-406.

Li C., Xiong Y., Yang X., Wang L., Zhang S., Dai N., Li M., Ren T., Yang Y., Zhou S.F., Gan L., Wang D. (2015). Lost expression of ADAMTS5 protein associates with progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Drug Des Devel Ther.* Mar 24;9:1773-83.

Li H., Jiang T., Lin Y., Zhao Z., Zhang N. (2006). HGF protects rat mesangial cells from high-glucose-mediated oxidative stress. *Am J Nephrol.* 26(5):519-30.

Li M., Cai S.Y., Boyer J.L. (2017). Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver. *Mol Aspects Med.* 56:45-53.

Li M., Wang W., Cheng Y., Zhang X., Zhao N., Tan Y., Xie Q., Chai J., Pan Q. (2022). Tumor necrosis factor α upregulates the bile acid efflux transporter OATP3A1 via multiple signaling pathways in cholestasis. *J Biol Chem.* Feb;298(2):101543.

Li N., Dou Z., Liu J., Chai B., Li Y., An X., Chu P., and Zhang, X. (2018). Therapeutic Effect of HGF on NASH Mice Through HGF/c-Met and JAK2-STAT3 Signalling Pathway. *Ann. Hepatol.* 17, 501–510.


Li T., Apte U. (2015). Bile Acid Metabolism and Signaling in Cholestasis, Inflammation, and Cancer. *Adv Pharmacol.* 74:263-302.

Liu H., Pathak P., Boehme S., Chiang J.L. (2016). Cholesterol 7 α -hydroxylase protects the liver from inflammation and fibrosis by maintaining cholesterol homeostasis. *J Lipid Res.* Oct;57(10):1831-1844.

Liu K., Luo M., Wei S. (2019). The Bioprotective Effects of Polyphenols on Metabolic Syndrome against Oxidative Stress: Evidences and Perspectives. *Oxid Med Cell Longev.* Nov 30;2019:6713194.

Liu Q., Wang S., Fu J., Chen Y., Xu J., Wei W., Song H., Zhao X., Wang H. (2024). Liver regeneration after injury: Mechanisms, cellular interactions and therapeutic innovations. *Clin Transl Med.* Aug;14(8):e1812.

- Liu R.M., Desai L.P. (2015). Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:565-577.
- Liu R.M., Gaston Pravia K.A. (2010). Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* Jan 1;48(1):1-15.
- Li W.K., Wang G.F., Wang T.M., Li Y.Y., Li Y.F., Lu X.Y., Wang Y.H., Zhang H., Liu P., Wu J.S., Ma Y.M. (2019). Protective effect of herbal medicine Huangqi decoction against chronic cholestatic liver injury by inhibiting bile acid-stimulated inflammation in DDC-induced mice. *Phytomedicine.* Sep;62:152948.
- Liu Z., Shi Y., Lv L., Chen J., Jiang W., Li J., Lin Q., Fang X., Gao J., Liu Y., Liu Q., Xu X., Song E., Gong C. (2022). Small Molecular Inhibitors Reverse Cancer Metastasis by Blockading Oncogenic PITPNM3. *Adv Sci (Weinh).* Dec;9(35):e2204649.
- Luangmonkong T., Parichatikanond W., Olinga P. (2023). Targeting collagen homeostasis for the treatment of liver fibrosis: Opportunities and challenges. *Biochem Pharmacol.* Sep;215:115740.
- Luck, H. (1965) Catalase. Ed., *Method of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York and London, 885-894.
- Lukacs-Kornek V., and Lammert F. (2017). The progenitor cell dilemma: Cellular and functional heterogeneity in assistance or escalation of liver injury. *J Hepatol* 66, 619-630.
- Lu S.C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* May;1830(5):3143-53.
- Lu W.Y., Bird T.G., Boulter L., Tsuchiya A., Cole A.M., Hay T., Guest R.V., Wojtacha D., Man T.Y., Mackinnon A., Ridgway R.A., Kendall T., Williams M.J., Jamieson T., Raven A., Hay D.C., Iredale J.P., Clarke A.R., Sansom O.J., and Forbes S.J. (2015). Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity. *Nat Cell Biol* 17, 971-983.
- Lv W., Booz G.W., Wang Y., Fan F., Roman R.J. (2018). Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. *Eur J Pharmacol.* Feb 5;820:65-76.
- Maher J. J. (1993). Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Upregulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. *J Clin Invest.* May;91(5):2244-52.
- Maher J., Yamamoto M. (2010). The rise of antioxidant signaling--the evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol.* Apr 1;244(1):4-15.
- Mao S.A., Glorioso J.M., and Nyberg S.L. (2014). Liver regeneration. *Transl Res* 163, 352-362.
- Marquardt J.U., Seo D., Gomez-Quiroz L.E., Uchida K., Gillen M.C., Kitade M., Kaposi-Novak P., Conner E.A., Factor V.M., and Thorgeirsson S.S. (2012). Loss of c-Met accelerates development of liver fibrosis in response to CCl(4) exposure through deregulation of multiple molecular pathways. *Biochim Biophys Acta* 1822, 942-951.



Martinez Palacian A., del Castillo G., Suarez Causado A., Garcia Alvaro M., de Morena Frutos D., Fernandez M., Roncero C., Fabregat I., Herrera B., and Sanchez A. (2013). Mouse hepatic oval cells require Met-dependent PI3K to impair TGF-beta-induced oxidative stress and apoptosis. *PLoS One* 8, e53108.

Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215-230.

Massague J. (2012). TGF beta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 616-630.

Matsuzaki K., Kitano C., Murata M., Sekimoto G., Yoshida K., Uemura Y., Seki T., Taketani S., Fujisawa J., Okazaki K. (2009). Smad2 and Smad3 phosphorylated at both linker and COOH-terminal regions transmit malignant TGF-beta signal in later stages of human colorectal cancer. *Cancer Res.* Jul 1;69(13):5321-30.

Maurer M.E., Cooper J.A. (2006). The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH. *J Cell Sci.* Oct 15;119(Pt 20):4235-46.

Mavila N., Siraganahalli Eshwaraiah M., Kennedy J. (2024). Ductular Reactions in Liver Injury, Regeneration, and Disease Progression-An Overview. *Cells.* Mar 26;13(7):579.

McCord J.M., Gao B., Hybertson B.M. (2023). The Complex Genetic and Epigenetic Regulation of the Nrf2 Pathways: A Review. *Antioxidants (Basel).* Feb 3;12(2):366.

Michalopoulos G. K., Bhushan B. (2021). Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 18(1):40-55.

Millrine D., Cummings T., Matthews S.P., Peter J.J., Magnussen H.M., Lange S.M., Macartney T., Lamoliatte F., Knebel A., Kulathu Y. (2022). Human UFSP1 is an active protease that regulates UFM1 maturation and UFMylation. *Cell Rep.* Aug 2;40(5):111168.

Miyajima A., Tanaka M., Itoh T. (2014). Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell.* May 1;14(5):561-74.

Miyazawa K., Tsubouchi H., Nak, D., Takahashi K., Okigaki M., Arakaki N., Nakayama H., Hirono S., Sakiyama O., Takahashi K., and et al. (1989). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 163, 967-973.

Mizuno S., Nakamura T. (2007). Hepatocyte growth factor: a regenerative drug for acute hepatitis and liver cirrhosis. *Regen Med.* Mar;2(2):161-70.

Meakin P.J., Chowdhry S., Sharma R.S., Ashford F.B., Walsh S.V., McCrimmon R.J., Dinkova-Kostova A.T., Dillon J.F., Hayes J.D., Ashford M.L. (2014). Susceptibility of Nrf2-null mice to steatohepatitis and cirrhosis upon consumption of a high-fat diet is associated with oxidative stress, perturbation of the unfolded protein response, and disturbance in the expression of metabolic enzymes but not with insulin resistance. *Mol Cell Biol.* Sep;34(17):3305-20.

Mennone A., Soroka C.J., Harry K.M., Boyer J.L. (2010). Role of breast cancer resistance protein in the adaptive response to cholestasis. *Drug Metab Dispos.* Oct;38(10):1673-8.

Morales-Ruiz M., Santel A., Ribera J., Jiménez W. (2017). The Role of Akt in Chronic Liver Disease and Liver Regeneration. *Semin Liver Dis.* Feb;37(1):11-16.

Morgan M. A, Khot R., Sundaram K. M., Ludwig D. R., Nair R. T., Mittal P. K., Ganeshan D. M., Venkatesh S. K. (2023). Primary sclerosing cholangitis: review for radiologists. *Abdom Radiol (NY).* 48(1):136-150.

Morikawa M., Derynck R., and Miyazono K. (2016). TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.

Motoi S., Toyoda H., Obara T., Ohta E., Arita Y., Negishi K., Moriya K., Kuboi Y., Soejima M., Imai T., Ido A., Tsubouchi H., Kawano T. (2019). Anti-Apoptotic Effects of Recombinant Human Hepatocyte Growth Factor on Hepatocytes Were Associated with Intrahepatic Hemorrhage Suppression Indicated by the Preservation of Prothrombin Time. *Int J Mol Sci.* Apr 12;20(8):1821.

Mühlfeld S., Domanova O., Berlage T., Stross C., Helmer A., Keitel V., Häussinger D., Kubitz R. (2012). Short-term feedback regulation of bile salt uptake by bile salts in rodent liver. *Hepatology.* Dec;56(6):2387-97.

Murphy M.P., Bayir H., Belousov V., Chang C.J., Davies K.J.A., Davies M.J., Dick T.P., Finkel T., Forman H.J., Janssen-Heininger Y., Gems D., Kagan V.E., Kalyanaraman B., Larsson N.G., Milne G.L., Nyström T., Poulsen H.E., Radi R., Van Remmen H., Schumacker P.T., Thornalley P.J., Toyokuni S., Winterbourn C.C., Yin H., Halliwell B. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat Metab.* Jun;4(6):651-662.

Nakamura T. (1989). [Growth factor and growth inhibitor for hepatocyte proliferation]. *Gan To Kagaku Ryoho* 16, 481-488.

Nakamura T., and Mizuno, S. (2010). The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86, 588-610.

Nakamura T., Nishizawa T., Hagiya M., Seki T., Shimonishi M., Sugimura A., Tashiro K., Shimizu S. (1989) Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature.* Nov 23;342(6248):440-3.

Nakamura T., Sakai K., Nakamura T., and Matsumoto K. (2011). Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1, 188-202.

Naldini L., Weidner K.M., Vigna E., Gaudino G., Bardelli A., Ponzetto C., Narsimhan R.P., Hartmann G., Zarnegar R., Michalopoulos G.K., and et al. (1991). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J* 10, 2867-2878.

Nejak-Bowen K., Orr A., Bowen W.C. Jr., Michalopoulos G.K. (2023). Conditional genetic elimination of hepatocyte growth factor in mice compromises liver regeneration after partial hepatectomy. *PLoS One.*

- Nikam A., Patankar J.V., Lackner C., Schöck E., Kratky D., Zatloukal K., Abuja P.M. (2013). Transition between acute and chronic hepatotoxicity in mice is associated with impaired energy metabolism and induction of mitochondrial heme oxygenase-1. *PLoS One*. Jun 6;8(6):e66094.
- Ning C., Gao X., Wang C., Huo X., Liu Z., Sun H., Yang X., Sun P., Ma X., Meng Q., Liu, K. (2018). Hepatoprotective effect of ginsenoside Rg1 from *Panax ginseng* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury by activating Nrf2 signaling pathway in mice. *Environ. Toxicol.* 33, 1050–1060.
- Nobili V., Parkes J., Bottazzo G., Marcellini M., Cross R., Newman D., Vizzutti F., Pinzani M., Rosenberg W.M. (2009) Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. Jan;136(1):160-7.
- Noriega Guerra H., Freitas V.M. (2018) Extracellular Matrix Influencing HGF/c-MET Signaling Pathway: Impact on Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. Oct 24;19(11):3300.
- Oh S., Shin S., Janknecht R. (2012). ETV1, 4 and 5: an oncogenic subfamily of ETS transcription factors. *Biochim Biophys Acta*. Aug;1826(1):1-12.
- Okada K., Shoda J., Taguchi K., Maher J.M., Ishizaki K., Inoue Y., Ohtsuki M., Goto N., Sugimoto H., Utsunomiya H., Od, K., Warabi E., Ishii T., Yamamoto M., (2009). Nrf2 counteracts cholestatic liver injury via stimulation of hepatic defense systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389, 431–436.
- Orozco-Aguilar J., Simon F., Cabello-Verrugio C. (2021). Redox-Dependent Effects in the Physiopathological Role of Bile Acids. *Oxid Med Cell Longev*. Sep 4;2021:4847941.
- Pan H., Xu R., Zhang Y.(2024) Role of SPRY4 in health and disease. *Front Oncol*. Apr 15;14:1376873.
- Pan Q., Zhang X., Zhang L., Cheng Y., Zhao N., Li F., Zhou X., Chen S., Li J., Xu S., Huang D., Chen Y., Li L., Wang H., Chen W., Cai S.Y., Boyer J.L., Chai J. (2018). Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 3A1 Is a Bile Acid Efflux Transporter in Cholestasis. *Gastroenterology*. Nov;155(5):1578-1592.e16.
- Papp V., Rókusz A., Dezső K., Bugyik E., Szabó V., Pávai Z., Paku S., Nagy P. (2014). Expansion of hepatic stem cell compartment boosts liver regeneration. *Stem Cells Dev*. Jan 1;23(1):56-65.
- Patel A., Seetharam A. (2016). Primary Biliary Cholangitis: Disease Pathogenesis and Implications for Established and Novel Therapeutics. *J Clin Exp Hepatol*. 6(4):311-318.
- Patel V. S., Mahmood S. F., Bhatt K. H., Khemkar R. M., Jariwala D. R., Harris B., George M. M., Kurudamannil R. A., Anyagwa O. E., Tak R. S., Kassem M. (2024). Ursodeoxycholic Acid's Effectiveness in the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Euroasian J Hepatogastroenterol*.;14(1):92-98.
- Penheiter S.G., Singh R.D., Repellin C.E., Wilkes M.C., Edens M., Howe P.H., Pagano R.E., Leof E.B. (2010). Type II transforming growth factor-beta receptor recycling is

dependent upon the clathrin adaptor protein Dab2. *Mol Biol Cell*. Nov 15;21(22):4009-19.

Perez M. J., Macias R. I., Duran C., Monte M. J., Gonzalez-Buitrago J. M., Marin J. J. (2005). Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *Journal of Hepatology*. 43(2):324–332.

Perino A., Demagny H., Velazquez-Villegas L., Schoonjans K. (2021). Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging. *Physiological Reviews*. 101(2):683–731.

Pose E., Sancho-Bru P., Coll M. (2019). 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine Diet: A Rodent Model in Cholestasis Research. *Methods Mol Biol*. 1981:249-257.

Preisegger K.H., Factor V.M., Fuchsbichler A., Stumptner C., Denk H., and Thorgeirsson S.S. (1999). Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine mouse model for chronic alcoholic liver disease. *Lab Invest* 79, 103-109.

Preziosi M. E., Monga S. P. (2017). Update on the Mechanisms of Liver Regeneration. *Semin Liver Dis*. 37(2):141-151.

Pusl T., Beuers U. (2006). Ursodeoxycholic acid treatment of vanishing bile duct syndromes. *World J Gastroenterol*. 14;12(22):3487-95.

Qian Y., Shang Z., Gao Y., Wu H., Kong X. (2022). Liver Regeneration in Chronic Liver Injuries: Basic and Clinical Applications Focusing on Macrophages and Natural Killer Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 14(5):971-981.

Raghu G., Berk M., Campochiaro P.A., Jaeschke H., Marenzi G., Richeldi L., Wen F.Q., Nicoletti F., Calverley P.M.A. (2021). The Multifaceted Therapeutic Role of N-Acetylcysteine (NAC) in Disorders Characterized by Oxidative Stress. *Curr Neuropharmacol*. 19(8):1202-1224.

Ravichandra A., Schwabe R.F. (2021). Mouse Models of Liver Fibrosis. *Methods Mol Biol*. 2299:339-356.

Reich M., Spomer L., Klindt C., Fuchs K., Stindt J. et al. (2021). Downregulation of TGR5 (GPBAR1) in biliary epithelial cells contributes to the pathogenesis of sclerosing cholangitis. *J Hepatol*. Sep;75(3):634-646.

Reiniers M.J., de Haan L.R., Reeskamp L.F., Broekgaarden M., van Golen R.F., Heger M. (2021). Analysis and Optimization of Conditions for the Use of 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate in Cultured Hepatocytes. *Antioxidants (Basel)*. Apr 26;10(5):674.

Ricci G., Catizone A. (2014). Pleiotropic Activities of HGF/c-Met System in Testicular Physiology: Paracrine and Endocrine Implications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. Apr 3;5:38.

Richter K., and Kietzmann T. (2016). Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison. *Cell Tissue Res* 365, 591-605.

Rose K.W.J., Taye N., Karoulias S.Z., Hubmacher D. (2021) Regulation of ADAMTS Proteases. *Front Mol Biosci.* Jun 29;8:701959.

Roy A.M., Iyer R., Chakraborty S. (2023) The extracellular matrix in hepatocellular carcinoma: Mechanisms and therapeutic vulnerability. *Cell Rep Med.* Sep 19;4(9):101170.

Salas Silva S., Simoni Nieves A., Razori M.V., López Ramirez J., Barrera Chimal J., Lazzarini R., Bello O., Souza V., Miranda-Labra R.U., Gutiérrez-Ruiz M.C., Gomez-Quiroz L.E., Roma M.G., Bucio-Ortiz L. (2020). HGF induces protective effects in α -naphthylisothiocyanate-induced intrahepatic cholestasis by counteracting oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* Apr;174:113812.

Sanchez A., Alvarez A.M., Benito M., and Fabregat I. (1996). Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 271, 7416-7422.

Sancho P., Bertran E., Caja L., Carmona-Cuenca I., Murillo M.M., and Fabregat I. (2009). 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* 1793, 253-263.

Santamaría E., et al. (2019). The Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Amphiregulin Protects From Cholestatic Liver Injury and Regulates Bile Acids Synthesis. *Hepatology.* Apr;69(4):1632-1647.

Sato K., Marzioni M., Meng F., Francis H., Glaser S., and Alpini G. (2019). Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology* 69, 420-430.

Schmidt-Arras D, Rose-John S. (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol.* Jun;64(6):1403-15.

Schmidt C., Bladt F., Goedecke S., Brinkmann V., Zschiesche W., Sharpe M., Gherardi E., and Birchmeier C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.

Schuetz E. G., Strom S., Yasuda K., Lecureur V., Assem M., Brimer C., Lamba J., Kim R.B., Ramachandran V., Komoroski B.J., Venkataramanan R., Cai H., Sinal C.J., Gonzalez F.J., Schuetz J.D. (2001). Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450. *J Biol Chem.* 19;276(42):39411-8.

Sentíes-Gómez M.D., Gálvez-Gastélum F.J., Meza-García E., et al. (2005). Fibrosis Hepática. El papel de las metaloproteinasas y de TGF-B. *Gac Med Mex.* 141(4):315-322.

Shamsan E., Almezgagi M., Gamah M., Khan N., Qasem A., Chuanchuan L., Haining F. (2024). The role of PI3k/AKT signaling pathway in attenuating liver fibrosis: a comprehensive review. *Front Med (Lausanne).* Mar 25;11:1389329.

Shiota G., Wang T. C, Nakamura T., Schmidt E. V. (1994). Hepatocyte growth factor in transgenic mice: effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology*. Apr;19(4):962-72.

Shi Y.S., Li X.X., Li H.T., Zhang Y. (2020). Pelargonidin ameliorates CCl(4)-induced liver fibrosis by suppressing the ROS-NLRP3-IL-1 β axis via activating the Nrf2 pathway. *Food Funct*. 11, 5156–5165.

Singh N., Li L. (2012). Reduced oxidative tissue damage during endotoxemia in IRAK-1 deficient mice. *Mol. Immunol*. 50, 244–252.

Singh J., Metrani R., Shivanagoudra S.R., Jayaprakasha G.K., Patil B.S. (2019) Review on Bile Acids: Effects of the Gut Microbiome, Interactions with Dietary Fiber, and Alterations in the Bioaccessibility of Bioactive Compounds. *J Agric Food Chem*. 21;67(33):9124-9138.

Sirivatanauksorn Y., Sirivatanauksorn V., Srisawat C., Khongmanee A., Tongkham C. (2012). Differential expression of sprouty genes in hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol*. Mar;105(3):273-6.

Sokol R., Winklhofer-Roob B., Devereaux M., McKim J., Jr. (1995). Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology*. 109(4):1249–1256.

Stieger B., Meier P.J. (2011). Pharmacogenetics of drug transporters in the enterohepatic circulation. *Pharmacogenomics* 12, 611–631.

Streetz K.L., Luedde T., Manns M.P., Trautwein C. (2000). Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut*. Aug;47(2):309-12.

Suarez-Causado A., Caballero-Diaz D., Bertran, E., Roncero C., Addante A., Garcia-Alvaro M., Fernandez M., Herrera B., Porras A., Fabrega, I., and Sanchez A. (2015). HGF/c-Met signaling promotes liver progenitor cell migration and invasion by an epithelial-mesenchymal transition-independent, phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in an in vitro model. *Biochim Biophys Acta* 1853, 2453-2463.

Su L.J., Zhang J.H., Gomez H., Murugan R., Hong X., Xu D., Jiang F., Peng Z.Y. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*. Oct 13;2019:5080843.

Sun M., Huang F., Yu D., Zhang Y., Xu H., Zhang L., Li L., Dong L., Guo L., Wang S. (2015). Autoregulatory loop between TGF- β 1/miR-411-5p/SPRY4 and MAPK pathway in rhabdomyosarcoma modulates proliferation and differentiation. *Cell Death Dis*. Aug 20;6(8):e1859.

Szanto I. (2022). NADPH Oxidase 4 (NOX4) in Cancer: Linking Redox Signals to Oncogenic Metabolic Adaptation. *Int J Mol Sci*. Feb 28;23(5):2702.

Tanaka M., Itoh T., Tanimizu N., and Miyajima A. (2011). Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *J Biochem* 149, 231-239.

Thompson R., Strautnieks S. (2001). BSEP: function and role in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Semin Liver Dis.* Nov;21(4):545-50.

Tie Y., Tang F., Peng D., Zhang Y., Shi H. (2022). TGF-beta signal transduction: biology, function and therapy for diseases. *Mol Biomed.* Dec 19;3(1):45.

Trivedi P. J., Lammers W.J., van Buuren H.R., Parés A., Floreani A., Janssen H.L., Invernizzi P., Battezzati P.M., Ponsioen C.Y., Corpechot C., Poupon R., Mayo M.J., Burroughs A.K., Nevens F., Mason A.L., Kowdley K.V., Lleo A., Caballeria L., Lindor K.D., Hansen B.E., Hirschfield G.M.; Global P.B.C. Study Group. (2016). Stratification of hepatocellular carcinoma risk in primary biliary cirrhosis: a multicentre international study. *Gut.* 65(2):321-9.

Trivella J., John B.V., Levy C. (2023). Primary biliary cholangitis: Epidemiology, prognosis, and treatment. *Hepatol Commun.* 7(6):e0179.

Trusolino L., Bertotti A., and Comoglio P.M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 834-848.

Tsomidis I., Notas G., Xidakis C., Voumvouraki A., Samonakis D.N., Koulentaki M., Kouroumalis E. (2022). Enzymes of Fibrosis in Chronic Liver Disease. *Biomedicines.* Dec 8;10(12):3179.

Uehara Y., Minowa O., Mori C., Shiota K., Kuno J., Noda T., and Kitamura N. (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702-705.

Ueki T., Kaneda Y., Tsutsui H., Nakanishi K., Sawa Y., Morishita R., Matsumoto K., Nakamura T., Takahashi H., Okamoto E., and Fujimoto J. (1999). Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 5, 226-230.

Vairetti M., Di Pasqua L.G., Cagna M., Richelmi P., Ferrigno A., Berardo C. (2021). Changes in Glutathione Content in Liver Diseases: An Update. *Antioxidants (Basel).* Feb 28;10(3):364.

Valdés-Arzate A., Luna A., Bucio L., Licona C., Clemens D.L., Souza V., Hernandez E., Kershenobich D., Gutiérrez-Ruiz M.C., Gómez-Quiroz L.E. (2009) Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med.* Aug 15;47(4):424-30.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84.

Vishnupriya M., Naveenkumar M., Manjima K., Sooryasree N.V., Saranya T., Ramya S., Harysh Winster S., Paulpandi M., Balachandar V., Arul N. (2021). Post-COVID pulmonary fibrosis: therapeutic efficacy using with mesenchymal stem cells - How the lung heals. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* Mar;25(6):2748-2751.

Vitale G., Gitto S., Vukotic R., Raimondi F., Andreone P. (2019). Familial intrahepatic cholestasis: New and wide perspectives. *Dig Liver Dis.* 51(7):922-933.

- Vitale G., Mattiaccio A., Conti A., Turco L., Seri M., Piscaglia F., Morelli M.C. (2022). Genetics in Familial Intrahepatic Cholestasis: Clinical Patterns and Development of Liver and Biliary Cancers: A Review of the Literature. *Cancers (Basel)*. 14(14):3421.
- Wagner M., Zollner G., Trauner M. (2009). New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *J Hepatol*. 51(3):565-80.
- Wang H., Zhang Y., Heuckeroth R.O. (2007). PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA. *FEBS Lett*. Jun 26;581(16):3098-104.
- Wang P., Sachar M., Lu J., Shehu A.I., Zhu J., Chen J., Liu K., Anderson K.E., Xie W., Gonzalez F.J., Klaassen C.D., Ma X. (2019) The essential role of the transporter ABCG2 in the pathophysiology of erythropoietic protoporphyria. *Sci Adv*. Sep 18;5(9).
- Wang R., Li Y., Hou Y., Yang Q., Chen S., Wang X., Wang Z., Yang Y., Chen C., Wang Z., and Wu Q. (2015). The PDGF-D/miR-106a/Twist1 pathway orchestrates epithelial-mesenchymal transition in gemcitabine resistance hepatoma cells. *Oncotarget* 6, 7000-7010.
- Wang Y. D., Chen W. D., Yu D., Forman B. M., Huang W. (2011) The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor κ light-chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) in mice. *Hepatology*.;54(4):1421–1432.
- Weerachayaphorn J., Mennone A., Sorok, C.J., Harry K., Hagey L.R., Kensler T.W., Boyer J.L. (2012). Nuclear factor-E2-related factor 2 is a major determinant of bile acid homeostasis in the liver and intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 302, G925–G936.
- Wege H., Li J., Ittrich H. (2019). Treatment Lines in Hepatocellular Carcinoma. *Visc Med*. 2019 Aug;35(4):266-272.
- Wen X., Jiao L., Tan H. (2022) MAPK/ERK Pathway as a Central Regulator in Vertebrate Organ Regeneration. *Int J Mol Sci*. Jan 27;23(3):1464.
- Williamson K. D., Chapman R. W. (2014). Primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis*. 32(4):438-45.
- Woolbright B.L., Jaeschke H. (2015). Critical Factors in the Assessment of Cholestatic Liver Injury In Vitro. *Methods Mol Biol*. ;1250:363-76.
- Wu Y., Yao X., Zhu M., Qian H., Jiang L., Lan T., Wu M., Pang J., Chen Y. (2016) PKG II reverses HGF-triggered cellular activities by phosphorylating serine 985 of c-Met in gastric cancer cells. *Oncotarget*. Jun 7;7(23):34190-200.
- Xiao G. H., Jeffers M., Bellacosa A., Mitsuuchi Y., Vande Woude G.F., Testa J.R. (2001). Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 2;98(1):247-52.
- Xiao J. L., Liu H. Y., Sun C. C., Tang C. F. (2024). Regulation of Keap1-Nrf2 signaling in health and diseases. *Mol Biol Rep*. Jul 13;51(1):809.

- Xie M., Lin Z., Ji X., Luo X., Zhang Z., Sun M., Chen X., Zhang B., Liang H., Liu D., Feng Y., Wang Y., Li Y., Liu B., Huang W., Xia L. (2023) FGF19/FGFR4-mediated elevation of ETV4 facilitates hepatocellular carcinoma metastasis by upregulating PD-L1 and CCL2. *J Hepatol.* Jul;79(1):109-125.
- Xu D., Xu M., Jeong S., Qian Y., Wu H., Xia Q., Kong X. (2019). The Role of Nrf2 in Liver Disease: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front Pharmacol.* Jan 8;9:1428.
- Yagi S., Hirata M., Miyachi Y., Uemoto S. (2020). Liver Regeneration after Hepatectomy and Partial Liver Transplantation. *Int J Mol Sci.* 21(21):8414.
- Yan C., Boyd D.D. (2007). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol.* Apr;211(1):19-26.
- Yang H., Luo F., Wei Y., Jiao Y., Qian J., Chen S., Gong Y., Tang L. (2021) TGR5 protects against cholestatic liver disease via suppressing the NF- κ B pathway and activating the Nrf2/HO-1 pathway. *Ann Transl Med.* Jul;9(14):1158.
- Yang H., Ramani K., Xia M., Ko K.S., Li T.W., Oh P., Li J., Lu S.C. (2009). Dysregulation of glutathione synthesis during cholestasis in mice: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Hepatology.* Jun;49(6):1982-91.
- Yang M., Zhang C.Y. (2024). Interleukins in liver disease treatment. *World J Hepatol.* Feb 27;16(2):140-145.
- Yen W.H., Ke W.S., Hung J.J., Chen T.M., Chen J.S., Sun H.S. (2016) Sp1-mediated ectopic expression of T-cell lymphoma invasion and metastasis 2 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Med.* Mar;5(3):465-77.
- Yi X., Li X., Zhou Y., Ren S., Wan W., Feng G., Jiang X. (2014) Hepatocyte growth factor regulates the TGF- β 1-induced proliferation, differentiation and secretory function of cardiac fibroblasts. *Int J Mol Med.* Aug;34(2):381-90.
- Yokoyama Y., Nagino M., Nimura Y. (2007). Mechanisms of hepatic regeneration following portal vein embolization and partial hepatectomy: a review. *World J Surg.* 31(2):367-74.
- Yokoda R. T., Rodriguez E. A. (2020). Review: Pathogenesis of cholestatic liver diseases. *World J Hepatol.* 12(8):423-435.
- Zhang L., Huang X., Meng Z., Dong B., Shiah S., Moore D.D., Huang W. (2009) Significance and mechanism of CYP7a1 gene regulation during the acute phase of liver regeneration. *Mol Endocrinol.* Feb;23(2):137-45.
- Zhang L., Wang Q., Liu W., Liu F., Ji A., Li Y. (2018). The Orphan Nuclear Receptor 4A1: A Potential New Therapeutic Target for Metabolic Diseases. *J Diabetes Res.* Jun 14;2018:9363461.
- Zhang, Y., Alexander, P.B., and Wang, X.F. (2017). TGF-beta Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9.

- Zhang Y., Bai X.F., Huang C.X. (2003). Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol.* Feb;9(2):201-4.
- Zhang Y., Lickteig A., Liu, J., Csanaky I., Klaassen C. (2020). Effects of ablation and activation of Nrf2 on bile acid homeostasis in male mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 403, 115170.
- Zhang Y., Xia M., Jin K., Wang S., Wei H., Fan C., Wu Y., Li X., Li X., Li G., Zeng Z., and Xiong W. (2018). Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Mol Cancer* 17, 45.
- Zhao H., Yu H., Martin T.A., Zhang Y., Chen G., Jiang W.G. (2016). Effect of junctional adhesion molecule-2 expression on cell growth, invasion and migration in human colorectal cancer. *Int J Oncol.* Mar;48(3):929-36.
- Zhao Y., Ye W., Wang Y. D, Chen W. D. (2022). HGF/c-Met: A Key Promoter in Liver Regeneration. *Front Pharmacol.* Mar 17;13:808855.
- Zhao X., Benveniste E.N. (2008) Transcriptional activation of human matrix metalloproteinase-9 gene expression by multiple co-activators. *J Mol Biol.* Nov 28;383(5):945-56.
- Zhou J., Hsieh J.T. (2001). The inhibitory role of DOC-2/DAB2 in growth factor receptor-mediated signal cascade. DOC-2/DAB2-mediated inhibition of ERK phosphorylation via binding to Grb2. *J Biol Chem.* Jul 27;276(30):27793-8.
- Zhou J., Zheng Q., Chen Z. (2022). The Nrf2 Pathway in Liver Diseases. *Front Cell Dev Biol.* Feb 10;10:826204.
- Zhou Z., Wu B., Chen J., Shen Y., Wang J., Chen X., Fei F., Li L. (2023) ETV4 facilitates proliferation, migration, and invasion of liver cancer by mediating TGF- β signal transduction through activation of B3GNT3. *Genes Genomics.* Nov;45(11):1433-1443.
- Zhu C., Coombe D.R., Zheng M.H., Yeoh G.C., Li L. (2013). Liver progenitor cell interactions with the extracellular matrix. *J Tissue Eng Regen Med.* Oct;7(10):757-66.
- Zou W., Chen C., Zhong Y., An J., Zhang X., Yu Y., Yu Z., Fu J. (2013). PI3K/Akt pathway mediates Nrf2/ARE activation in human L02 hepatocytes exposed to low-concentration HBCDs. *Environ Sci Technol.* 47(21):12434-40.