

Tesis Doctoral

Programa de doctorado en Biomedicina

ANÁLISIS DEL PAPEL DEL NEUROPEPTIDO CORTISTATINA EN FIBROSIS HEPÁTICA

Raquel Benítez Ruiz

Director de tesis: Mario Delgado Mora



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Instituto de Parasitología y Biomedicina López - Neyra

Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Granada – 14 de Enero de 2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Raquel Benítez Ruiz
ISBN: 978-84-1117-213-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/72457>

Agradecimientos

A toda mi familia. Sin el apoyo constante e incondicional que me habéis brindado, no sólo durante esta tesis sino durante toda mi vida, yo no sería quien soy hoy. Mamá, papá, vosotros sois el muro de carga que evita que me derrumbe, el faro que me ilumina cuando me siento perdida y mis más fieles seguidores incluso cuando no entendéis lo que os cuento. Gracias por todo familia, tanto a los que están como a los que se han ido.

A mi jefe Mario, que no sólo ha estado ahí para mí como jefe y director de tesis, sino también como compañero y amigo. Gracias por todo lo que me has enseñado, por guiarme en mi carrera científica y por la confianza que has depositado en mí a lo largo de estos años. Gracias por todos tus consejos y hasta por los tironcillos de oreja, gracias por saber escuchar y ayudar incluso cuando estabas desbordado. Sin duda, van a ser imposible de olvidar las miles de horas que pasamos en el animalario, menos mal que las sobrellevamos como pudimos con nuestras conversaciones de deporte, cine, música... Tampoco creo que olvide la de sustos que me he llevado por no oírte venir y las risas que te has echado con los botes que pegaba (lo del uso de un cascabel o instalar sensores de movimiento yo lo sigo viendo factible).

A todas mis compañeras del 202, por los momentos vividos y todo lo que me habéis enseñado. Por supuesto, especial mención a mis queridas Marga y Marina. Marga, qué puedo decir tras todos estos años de tesis juntas, sufriendo, riendo... Siempre nos quedará en la memoria aquella tarde loca en el mesón y nuestro querido *'en fin serafín, más corre el galgo que el mastín [...]*'. Marina, mi compi, de lab, de piso, de rutas, de risas tontas por cansancio, de desahogo mental y emocional... Llegaste cuando ya casi estaba acabando esta etapa para mí, pero has sido un gran apoyo. Con toda tu ayuda y con los pequeños gestos del día a día has conseguido que sobreviva y no me vuelva más loca de lo que ya estoy.

Al equipazo del 213. Aunque un pasillo separe nuestros laboratorios, esta gran familia permanece unida. Aunque ahora dividamos los materiales, nunca faltarán excusas para ir de visita de uno a otro lab y ya de paso quedarse de charla un rato. Aunque con el paso del tiempo hayan decaído los picoteos de media mañana, siempre llegará la Navidad y con ella los polvorones a medias, que desaparecen sospechosamente a mayor ritmo cuando determinadas personas andan cerca. Aunque llegue gente intentado promover una dieta sana, siempre estarán los de la resistencia con sus cajones a rebosar de galletas, chocolates y, si alguien lo pide, incluso saladitos. Y es que, aunque cambies un fondo de pantalla y al principio te miren mal, estas maravillosas personas se abren y se hacen querer. Elena, por supuesto a ti tengo mil cosas que agradecer, desde darme la oportunidad hace ya mucho tiempo de venir a la que se ha convertido en mi segunda casa, el IPBLN, a animarme a

crecer también en el mundo de la divulgación. Gracias por todo lo que he aprendido de ti y al tiempo que nos dedicas a todos, incluso cuando vas a mil por hora y no das abasto.

Marta, Gema, Irene, vosotras os habéis ganado un señor rincón en mi corazón. La ayuda que me habéis brindado durante todos estos años ha sido incalculable. Sin vuestra paciencia, vuestro apoyo, vuestras risas y vuestras palabras de ánimo, esto no habría salido adelante. Sois increíbles y todos los que os conocen y han trabajado con vosotras lo saben.

Si mi vida en Granada, fuera del laboratorio (estrictamente hablando), la dividiera en partes, habría 3 grandes reinos principales que habrían hecho de ésta, una de las mejores experiencias de mi vida: mis técnico-desayunos, mi círculo de quédate en casa (pero no pares de hacer planes), y mis historias de ayer y de hoy. Vayamos por partes... Mi Reino 1: Los desayunos con mis técnicos favoritos han podido ser a las 8, 8:15, 8:30 o las 9, avisando 5min antes, la noche anterior u organizándolo con días de antelación, en el mesón, la churrería o el cibm, con tostada o con churros, siendo sólo 2 o todo un regimiento, pero da igual, el ambiente de familia y de amigos para toda la vida ha estado siempre ahí. Rose (mi mami adoptiva que tanto me ha cuidado durante estos años), Almu, Isa, Vicente, Mamen, Vivi, Salva, Marta e Irene, los desayunos no serán lo mismo sin vosotros, no perdáis esta bonita costumbre. Mi Reino 2: Que un grupo de WhatsApp cambie de nombre 3-4 veces al año no importa porque la esencia permanece. Y esta esencia se traduce en la palabra AMISTAD. Julia, Ignacio (que no Nacho), Pepe, Antonio (Ontoño), Cristina, Blanca, Esteban, María, David, Juan, Alonso, Jesús, Jose, gracias por aquellas largas y delirantes charlas durante las comidas en la cafetería, por todos los viernes burgueses, los viajes, los festivales, las escapadas a la playa, las rutas de senderismo y, hasta por desgracia, las videollamadas pandémicas y los paseos con distancia y mascarilla. Mi Reino 3: Donde las historias de ayer y de hoy se entremezclan porque, a veces, desfasar no conoce límites y puede comenzar con un brindis con Edu, Bea, Marta y Jose Luís un mediodía y acabar a las 5 am volviendo a casa, o empezar en Granada y terminar de paseo por Segovia o con un ruso en las fiestas de la Puebla. Los planes con vosotros se saben cómo empiezan, pero no cómo acaban, y eso ayuda a que todos los males desaparezcan. Gracias a todos vosotros por todos los grandes, increíbles e imborrables momentos que me habéis hecho vivir.

Esta tesis también ha salido a delante por la ayuda y el cariño de mucha más gente del IPBLN. Todos estos años me han permitido conocer a gente increíble y eventos como los Oktoberfest, las fiestas de Navidad, o las charlas y talleres de divulgación no deben perderse, porque el mezclarnos entre todos y levantar esas pequeñas barreras invisibles del trabajo del día a día me han hecho entender al IPBLN no sólo como un centro de investigación o un edificio donde ir a trabajar, sino como una gran familia con la que poder contar. Porque más allá del laboratorio se pueden conocer personas maravillosas que me llevo en el corazón, Pablo, Efres, Mati (mis químicos, con los que

puedes celebrar la comida de navidad, hacer cerveza o incluso irte a la sierra y tirar bolas de nieves), Clara (algún día tendremos esa barbacoa pendiente), Paco (mi malafollá granaína por excelencia pero que luego se relaja y te cuenta miles de historias de cualquier tema), Javi (o Javi besitos, por qué será...), Jose Luís (mi enlace de proyectos con su toque musical y bailarín), Luz (con quien hablar de guantes de boxeo y divulgación en una misma conversación), a mi trío calavera, Vivi, Norma, Moha (me habéis enseñado mucho como científica y como persona), Jose (que, además de saludarte por las mañana temprano con una sonrisa en la cara, tan pronto te arregla el baño termostatzado, como te infla las ruedas de la bici), Ángeles y Carmen (el dúo dinámico que cada vez que te cruzas acaban haciéndote sonreír), Concha (las 300 croquetas nos perseguirán por los siglos de los siglos)... Y aunque podría seguir con muchísima más gente, quiero hacer especial mención a mis queridas limpiadoras y su enorme paciencia para no mandarme a freír espárragos cada vez que tenía que pisarles lo mojado, y a mis increíbles conserjes pili y mili, también conocidos como Javi y Dani, con quienes me he quedado gustosamente largos ratos de charla a pesar de haber acabado la jornada y estar agotada. También quiero agradecerles a Paco O'Valle y Nati su inestimable ayuda durante toda la tesis, no sólo me habéis ayudado con la parte histológica, también habéis hecho que la planta 10 del edificio B de Medicina sea otro rinconcito acogedor.

Hay gente que a pesar de la distancia te hacen llegar su cariño y apoyo incondicional en todo momento. Laura, Carlos, Repu, Mario y los pingus, Juan y Vane, mis cacahuetas Sara y Bettina, y las chicas de la sala de estudios (o debería decir de la parada de los bomberos), mil gracias por vuestra amistad. Que sepáis que nuestras quedadas aquí o allí, vuestros mensajes y todos los momentos que hemos vivido han sido también esenciales para ayudarme a sacar esta tesis adelante. Mercedes, empezaste siendo mi profesora, pero desde aquel momento te convertiste en mi amiga, una gran amiga. Esto también va por ti, porque has estado ahí conmigo al pie del cañón durante todos estos años y sé que lo seguirás estando en los siguientes.

To my LTRR people, you are amazing. Thank you Boris for the opportunity. The experience of being there with you guys has been incredible. I was a little scared and it was a hard time for me for a while but all of you made me feel like Toronto was also my home. Thank you for everything I learnt there with you in the lab and outside. Let's see what happens in this new stage...

Finalmente, quiero agradecer también al **Ministerio de Ciencia e Innovación** el haberme financiado esta tesis doctoral con el contrato predoctoral para la formación de doctores **FPI-2016 (BES-2016-076757)** y así poder continuar mi formación como investigadora en este maravilloso mundo que me apasiona.

“Liberæ sunt nostræ cogitationes”

ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
ÍNDICE DE TABLAS.....	16
ABREVIATURAS.....	17
SUMMARY	19
RESUMEN.....	20
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1 FIBROSIS HEPÁTICA.....	23
1.1.1 Hígado.....	25
1.1.1.1 <i>Funciones.</i>	25
1.1.1.2 <i>Estructura.</i>	30
1.1.1.3 <i>Irrigación sanguínea.</i>	36
1.1.1.4 <i>Vías biliares.</i>	38
1.1.2 Patogénesis de la fibrosis hepática.....	41
1.1.2.1 <i>Fase 1: Generación del daño en el tejido hepático.</i>	42
1.1.2.2 <i>Fase 2: Activación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica.</i>	43
1.1.2.3 <i>Fase 3: Generación de la matriz extracelular.</i>	45
1.1.2.4 <i>Fase 4: Incorrecta deposición y/o reabsorción de la matriz extracelular.</i>	45
1.1.3 Células estrelladas hepáticas.....	46
1.1.3.1 <i>Localización.</i>	46
1.1.3.2 <i>Estructura.</i>	46
1.1.3.3 <i>Funciones.</i>	47
1.1.3.4 <i>Proceso de activación de las HSCs.</i>	49
1.1.3.5 <i>Miofibroblastos.</i>	58
1.1.4 Matriz extracelular.....	61
1.1.5 Modelos experimentales de fibrosis hepática.	64
1.1.5.1 <i>Fibrosis hepática tóxica inducida por CCl₄.</i>	64
1.1.5.2 <i>Fibrosis hepática colestática inducida por BDL.</i>	66
1.1.5.3 <i>Línea celular LX2.</i>	66
1.1.6 Terapias para la fibrosis hepática.....	67
1.1.6.1 <i>Regeneración del tejido hepático.</i>	67
1.1.6.2 <i>Evaluación de la función hepática.</i>	67
1.1.6.3 <i>Terapias para la fibrosis hepática.</i>	69
1.2 NEUROPEPTIDO CORTISTATINA.....	74
1.2.1 Cortistatina.....	74
1.2.1.1 <i>Expresión de Cortistatina.</i>	75
1.2.1.2 <i>Funciones y receptores de Cortistatina.</i>	76
1.2.2 Cortistatina y fibrosis.....	79
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	83
3. MATERIALES Y MÉTODOS	89
3.1 OBJETIVO 1. Estudiar el papel endógeno de Cortistatina en el desarrollo de la fibrosis hepática experimental.....	91
3.1.1 Animales de experimentación.....	91
3.1.2 Modelo experimental de fibrosis hepática colestática.	91
3.1.3 Modelo experimental de fibrosis hepática tóxica.	93
3.1.4 Estudio histológico.	94
3.1.4.1 <i>Tinción Hematoxilina Eosina.</i>	94
3.1.4.2 <i>Tinción Rojo Sirio.</i>	95
3.1.4.3 <i>Inmunofluorescencia indirecta para detección de αSMA.</i>	97
3.1.4.4 <i>Tinción Pentacrómico de Russell Movat.</i>	97

3.1.5 Estudio del contenido de colágeno.....	98
3.1.6 Estudio de expresión génica.....	99
3.1.6.1 Extracción de ARN.....	99
3.1.6.2 Retrotranscripción – Obtención del ADNc.....	100
3.1.6.3 PCR cuantitativa.....	100
3.1.7 Estudio de la función hepática.....	101
3.1.7.1 Análisis de bilirrubina.....	101
3.1.7.2 Ensayo enzimático de la actividad ALT.....	102
3.1.7.3 Ensayo enzimático de la actividad AST.....	103
3.2 OBJETIVO 2. Estudiar el efecto directo de Cortistatina sobre las células efectoras de la respuesta fibrogénica en el hígado.....	105
3.2.1 Aislamiento de HSCs primarias murinas.....	105
3.2.2 Estudio transcriptómico mediante RNAseq.....	109
3.2.2.1 Extracción de ARN de HSCs primarias.....	109
3.2.2.2 Análisis transcriptómico mediante RNAseq.....	110
3.2.2.3 Análisis bioinformático.....	111
3.2.2.4 Validación de genes mediante qPCR.....	113
3.2.3 Inmunofluorescencia indirecta de NPCs primarias murinas.....	113
3.2.3.1 Cuantificación del estado de activación de las HSCs.....	114
3.2.4 Tratamiento de HSCs primarias con Cortistatina.....	115
3.2.5 Tratamiento de líneas celulares de HSCs humanas con Cortistatina.....	116
3.2.5.1 Estudio de expresión génica de LX2.....	116
3.2.5.2 Inmunofluorescencia indirecta de LX2.....	117
3.2.5.3 Western Blot de LX2.....	117
3.2.5.4 Estudio de receptores de Cortistatina en LX2.....	119
3.2.5.5 Estudio de la capacidad de contracción en HHStc.....	119
3.2.6 Tratamiento de fibroblastos primarios humanos con Cortistatina.....	122
3.3 OBJETIVO 3. Estudiar el efecto terapéutico de la administración de Cortistatina en modelos experimentales de fibrosis hepática.....	124
3.3.1 Modelo de fibrosis hepática colestática con administración de Cortistatina.....	124
3.3.2 Modelo de fibrosis hepática tóxica con administración de Cortistatina.....	125
3.4 ESTADÍSTICA.....	125
4. RESULTADOS.....	127
4.1 OBJETIVO 1. Estudiar el papel endógeno de Cortistatina en el desarrollo de la fibrosis hepática experimental.....	129
4.1.1 Análisis de la expresión de Cortistatina durante la respuesta fibrogénica.....	129
4.1.2 Análisis del estado fisiológico de hígados de ratones <i>Cort+/+</i> , <i>Cort+/-</i> y <i>Cort-/-</i>	130
4.1.3 Estudio del efecto de Cortistatina durante la fibrosis hepática colestática.....	133
4.1.4 Estudio del efecto de Cortistatina en el desarrollo de la fibrosis hepática tóxica.....	137
4.1.5 Estudio del efecto endógeno de Cortistatina sobre la respuesta inflamatoria en modelos de fibrosis hepática.....	142
4.2 OBJETIVO 2. Estudiar el efecto directo de Cortistatina sobre las células efectoras de la respuesta fibrogénica en el hígado.....	144
4.2.1 Estudio del efecto de Cortistatina sobre HSCs primarias de ratón.....	144
4.2.2 Estudio del efecto terapéutico de Cortistatina sobre líneas celulares de HSCs humanas.....	152
4.2.3 Estudio del efecto terapéutico de Cortistatina sobre fibroblastos primarios humanos.....	155
4.3 OBJETIVO 3. Estudiar el efecto terapéutico de la administración de Cortistatina en modelos experimentales de fibrosis hepática.....	157
4.3.1 Tratamiento de la fibrosis hepática colestática con Cortistatina.....	157

4.3.2 Tratamiento de la fibrosis hepática tóxica con Cortistatina.....	161
.....	165
5. DISCUSIÓN	165
5.1 Deficiencia en Cortistatina como marcador de mala prognosis.....	167
5.2 Cortistatina como terapia anti-fibrótica para trastornos hepáticos.....	174
.....	179
6. CONCLUSIONS	181
7. CONCLUSIONES.....	182
.....	183
8. REFERENCIAS.....	183
ANEXOS.....	197
ANEXO 1.	199
ANEXO 2.	200
Tabla A. Top 110 de DEGs relacionados con músculo regulados al alza en las NPCs <i>Cort</i> ^{-/-} frente a las <i>Cort</i> ^{+/-}	200
Tabla B. DEGs de NPCs <i>Cort</i> ^{-/-} frente a NPCs <i>Cort</i> ^{+/+} anotados en GO para Componentes Celulares.	203
Tabla C. DEGs de NPCs <i>Cort</i> ^{-/-} frente a NPCs <i>Cort</i> ^{+/+} anotados en GO para Procesos Biológicos.	204
Tabla D. DEGs de NPCs <i>Cort</i> ^{-/-} frente a NPCs <i>Cort</i> ^{+/+} anotados en GO para Funciones Moleculares.....	205

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones hepáticas.	25
Figura 2. Metabolismo de la bilirrubina.	28
Figura 3. Absorción y almacenamiento de vitaminas y minerales en el hígado.	29
Figura 4. Anatomía hepática.	31
Figura 5. Unidades funcionales del tejido hepático.	31
Figura 6. Zonas del acino hepático.	32
Figura 7. Flujo y gradientes de distribución entre zonas del acino hepático.	32
Figura 8. Lóbulo hepático.	33
Figura 9. Principales células hepáticas y espacios extracelulares.	33
Figura 10. Células presentes en el tejido hepático.	35
Figura 11. Anatomía hepática.	37
Figura 12. Tríada portal.	38
Figura 13. Tríada portal en corte histológico de tejido hepático.	38
Figura 14. Árbol biliar.	40
Figura 15. Patogénesis de la fibrosis hepática.	41
Figura 16. Causas de daño hepático.	42
Figura 17. Tipos celulares fuente de miofibroblastos.	43
Figura 18. Funciones principales de las HSCs quiescentes.	47
Figura 19. Pérdida de gotas lipídicas tras activación y diferenciación de HSCs.	48
Figura 20. Capacidad vasoreguladora de las HSCs.	48
Figura 21. Estimulación paracrina y autocrina durante fase de iniciación.	49
Figura 22. Fases de iniciación, perpetuación y resolución de la activación de las HSCs.	53
Figura 23. Rutas de activación de HSCs mediante estimulación con TGF β	55
Figura 24. Activación y diferenciación de las HSCs a miofibroblastos.	59
Figura 25. HSC quiescente, protomiofibroblasto y miofibroblasto.	60
Figura 26. Reestructuración de la matriz extracelular del tejido hepático.	61
Figura 27. Daño en tejido hepático por CCl ₄	65
Figura 28. Daño hepático desencadenado por CCl ₄	65
Figura 29. Daño en el tejido hepático por BDL.	66
Figura 30. Localización cromosómica del gen de Cortistatina en humano (<i>Homo sapiens</i>) y ratón (<i>Mus musculus</i>).	75
Figura 31. Estructura secundaria de Somatostatina-14 y Cortistatina-14 (14 aa), -17 (17 aa) y -29 (29 aa).	75
Figura 32. Receptores de Cortistatina.	77
Figura 33. Expresión de Cortistatina en pacientes con enfermedades hepáticas asociadas a fibrosis.	79
Figura 34. Estrategias principales para el abordaje del <i>Objetivo 1</i>	86
Figura 35. Estrategias principales para el abordaje del <i>Objetivo 2</i>	87
Figura 36. Estrategias principales para el abordaje del <i>Objetivo 3</i>	87
Figura 37. Modelo experimental de fibrosis hepática colestática inducida mediante ligación del ducto biliar.	92
Figura 38. Signos macroscópicos de la evolución del modelo de fibrosis hepática colestática.	92
Figura 39. Modelo experimental de fibrosis hepática tóxica inducida por CCl ₄	93
Figura 40. Secuencia de soluciones para desparafinar y rehidratar cortes de tejido embebido en parafina.	95
Figura 41. Análisis imagen % área fibrosis mediante FIJI (Image J).	96
Figura 42. Escala Ishak reducida.	96
Figura 43. Reacciones químicas del proceso de detección de hidroxiprolina.	98
Figura 44. Perfusión de soluciones para disgregación enzimática del hígado.	107
Figura 45. Disgregación mecánica y enzimática para liberación de células.	108
Figura 46. Fases generadas tras centrifugación con Nycodenz.	108
Figura 47. Esquema del proceso de secuenciación del analizador de genoma de Illumina.	111
Figura 48. Diagrama experimental para la caracterización de HSCs primarias Cort ^{+/+} y Cort ^{-/-}	114
Figura 49. Clasificación celular según detección α SMA por IFI.	115
Figura 50. Diagrama experimental sobre el efecto de Cortistatina-29 sobre HSCs Cort ^{+/+} y Cort ^{-/-}	115

Figura 51. Diagrama experimental para el estudio de receptores de Cortistatina en HSCs primarias de ratón.	115
Figura 52. Diagrama experimental para el análisis del efecto anti-fibrogénico de Cortistatina-17 sobre LX2.	116
Figura 53. Diagrama de generación y tratamiento de sustrato polimérico.	120
Figura 54. Diagrama experimental del ensayo de generación de arrugas.	121
Figura 55. Análisis y cuantificación de arrugas mediante thresholding.	121
Figura 56. Diagrama experimental del ensayo de contracción de geles de colágeno.	122
Figura 57. Análisis y cuantificación del área del gel de colágeno.	122
Figura 58. Modelos experimentales de fibrosis hepática colestática con tratamiento con Cortistatina.	124
Figura 59. Modelos experimentales de fibrosis hepática tóxica con tratamiento con Cortistatina.	125
Figura 60. El desarrollo de la respuesta fibrogénica reduce la expresión génica de Cortistatina.	129
Figura 61. Efecto de la deficiencia endógena en Cortistatina sobre la fibrosis en ratones <i>naïve</i> jóvenes y envejecidos.	130
Figura 62. Efecto de la deficiencia en Cortistatina sobre la presencia de miofibroblastos en hígados <i>naïve</i> jóvenes y envejecidos.	131
Figura 63. Efecto de la deficiencia endógena en Cortistatina en el tejido hepático de ratones <i>naïve</i> jóvenes y envejecidos.	132
Figura 64. Efecto de la deficiencia endógena en Cortistatina sobre la expresión de marcadores de inflamación en ratones <i>naïve</i> jóvenes y envejecidos.	133
Figura 65. Los ratones deficientes en Cortistatina presentan mayor tasa de mortalidad por fibrosis colestática.	133
Figura 66. La deficiencia en Cortistatina exacerba la fibrosis hepática colestática.	134
Figura 67. Mayor presencia de miofibroblastos en el tejido hepático de ratones deficientes en Cortistatina.	135
Figura 68. La deficiencia en Cortistatina aumentó la expresión génica de marcadores de fibrosis tras BDL.	135
Figura 69. La deficiencia en Cortistatina incrementa la muerte hepatocitaria por BDL.	136
Figura 70. Mayores niveles séricos de bilirrubina, AST y ALT en los ratones deficientes en Cortistatina con fibrosis colestática.	137
Figura 71. La deficiencia en Cortistatina predispone a una mayor tasa de mortalidad por fibrosis hepática tóxica.	137
Figura 72. La deficiencia en Cortistatina genera daños macroscópicos en ratones con fibrosis hepática tóxica.	138
Figura 73. Gran daño tisular en los pulmones de ratones deficientes en Cortistatina con fibrosis hepática tóxica.	138
Figura 74. La deficiencia en Cortistatina exacerba la fibrosis hepática tóxica.	139
Figura 75. Efecto de la deficiencia en Cortistatina sobre la presencia de miofibroblastos α SMA ⁺ en tejido hepático con fibrosis tóxica.	141
Figura 76. La deficiencia en Cortistatina aumentó la expresión génica de marcadores de fibrosis en el modelo de fibrosis hepática tóxica.	141
Figura 77. Tinción H/E de tejido hepático con fibrosis tóxica.	142
Figura 78. Los ratones deficientes en Cortistatina con fibrosis hepática tóxica presentan peor función hepática.	142
Figura 79. La deficiencia en Cortistatina genera mayor respuesta inflamatoria durante la fibrosis hepática.	143
Figura 80. Caracterización de las poblaciones celulares en los cultivos de NPCs primarias de ratón.	144
Figura 81. Las NPCs Cort ^{-/-} muestran un aumento de la diferenciación a miofibroblastos y una respuesta fibrogénica más exacerbada.	145
Figura 82. Perfil de expresión genética analizado mediante RNAseq y su validación por qPCR.	146
Figura 83. Análisis de la expresión de genes con mayor cambio de expresión estadísticamente significativo.	147
Figura 84. Análisis de ontología genética de los DEGs en las NPCs Cort ^{-/-} .	148
Figura 85. Análisis de la expresión de genes asociados a células efectoras fibrogénicas mediante RNAseq.	149
Figura 86. Análisis de DEGs relacionados con KCs, marcadores pro-inflamatorios y quimioquinas.	150

Figura 87. Cortistatina inhibe la activación de las HSCs primarias de ratón <i>in vitro</i> .	151
Figura 88. Los antagonistas de los receptores SSTR y GHSR1 bloquean el efecto de Cortistatina sobre las HSCs primarias de ratón.	151
Figura 89. Cortistatina inhibe la diferenciación de las LX2 activadas con TGFβ1 a través de los receptores SSTR y GHSR1.	152
Figura 90. Cortistatina evita la expresión de factores pro-fibróticos en las LX2 estimuladas con TGFβ1.	153
Figura 91. Cortistatina reduce la capacidad contráctil de cada HSC estimulada con TGFβ1.	154
Figura 92. Cortistatin disminuye la capacidad contráctil sumatoria de la población HHSteCs.	154
Figura 93. El desarrollo de la respuesta fibrogénica reduce la expresión génica de Cortistatina en NHLF y NHDF.	155
Figura 94. Cortistatina reduce la capacidad contráctil de los NHLF y NHDF.	156
Figura 95. Efecto de Cortistatina sobre la capacidad contráctil de los NHLF y NHDF estimulados con TGFβ1	156
Figura 96. Efecto del tratamiento con Cortistatina sobre el estado de activación de los NHLF.	157
Figura 97. La administración de Cortistatina impide la exacerbada fibrosis hepática colestática observada en ratones deficientes en Cortistatina.	158
Figura 98. El tratamiento con Cortistatina evita el daño hepatocitario generado por BDL.	158
Figura 99. Efecto del tratamiento con Cortistatina sobre miofibroblastos αSMA ⁺ y marcadores de fibrosis.	159
Figura 100. La administración exógena de Cortistatina protege de la fibrosis hepática colestática.	160
Figura 101. El tratamiento con Cortistatina disminuye la diferenciación de las células efectoras fibrogénicas	160
Figura 102. La administración de Cortistatina reduce los niveles séricos de AST y ALT en ratones Cort ^{+/+} con fibrosis hepática colestática.	161
Figura 103. El tratamiento con Cortistatina protege frente al exacerbado daño fibrótico generado por CCl ₄ en ratones Cort ^{+/-} .	162
Figura 104. El tratamiento con Cortistatina disminuye la diferenciación de las células efectoras fibrogénicas en modelo de fibrosis hepática tóxica.	162
Figura 105. El tratamiento con Cortistatina reduce la severidad de la fibrosis hepatotóxica inducida en ratones Cort ^{+/+} .	163
Figura 106. La deficiencia en Cortistatina predispone a mayor desarrollo del daño hepático por fibrosis.	168
Figura 107. La deficiencia en Cortistatina implica un estado de pre-activación celular durante el envejecimiento.	170
Figura 108. Principales diferencias fenotípicas y genotípicas entre las NPCs primarias Cort ^{+/+} y Cort ^{-/-} .	172
Figura 109. Cortistatina es capaz de ejercer su efecto anti-fibrogénico a través de SSTR1-5 y GHSR.	175
Figura 110. Administración de Cortistatina para el tratamiento temprano o avanzado de la fibrosis hepática.	176

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Biomarcadores de fibrosis hepática.	68
Tabla 2. Principales fuentes, funciones y tipos de receptores de CST y modelos experimentales de terapia.	78
Tabla 3. Secuencias nucleotídicas de los primers Fw y Rv.	101
Tabla 4. Volúmenes de los reactivos de trabajo necesarios del Kit 'Bilirrubin Assay Kit'.	102
Tabla 5. Reactivos necesarios para la recta estándar del ensayo enzimático ALT.	103
Tabla 6. Reactivos necesarios para la recta estándar del ensayo enzimático AST.	104
Tabla 7. Reactivos necesarios para la preparación de las soluciones SC1 y 2.	106
Tabla 8. Reactivos necesarios para la preparación de las soluciones GBSS-A y B.	106
Tabla 9. Reactivos necesarios para la preparación de las soluciones Pronasa E, Colagenasa P y Pronasa E-Colagenasa P.	106
Tabla 10. Secuencias nucleotídicas de los primers para validación del RNAseq.	113
Tabla 11. Anticuerpos primarios y secundarios para IFI.	114
Tabla 12. Antagonistas de los receptores de Cortistatina.	115
Tabla 13. Secuencia nucleotídica de los primers para los genes <i>Cort</i> , <i>Tgfβ1</i> y <i>Rplp0</i>	116
Tabla 14. Composición del gel poliacrilamida para Western Blot.	118
Tabla 15. Anticuerpos para detección proteica mediante Western Blot.	119
Tabla 16. Anticuerpos utilizados durante la IFI de NHLF.	123

ABREVIATURAS

α SMA: Actina alfa de músculo liso - *alpha Smooth muscle actin*
ADNc: ADN complementario
ALT: Alanina aminotransferasa - *Alanine aminotransferase*
AMPc: Adenosina monofosfato cíclica
ARNm: ARN mensajero
AST: Aspartato aminotransferasa - *Aspartate aminotransferase*
BDL: Ligación del ducto biliar - *Bile duct ligation*
CCl₄: Tetracloruro de Carbono
Células NK: Células asesinas naturales - *Natural killer cells*
Células NKT: Células T asesinas naturales - *Natural killer T cells*
Col1a2: Cadena alfa colágeno tipo 1
CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo - *Connective tissue growth factor*
DEG: Genes expresados diferencialmente - *Differentially expressed genes*
ECM: Matriz extracelular - *Extracellular matrix*
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EGF: Factor de crecimiento epidérmico - *Epidermal growth factor*
EMT: Transición epitelio-mesénquima - *Epithelial-mesenchymal transition*
ET-1: Endotelina-1 - *Endothelin 1*
FDR: *False discovery rate*
FGF: Fibroblast growth factor
GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*
GHSR1a: *Growth hormone secretagogue receptor type 1a*
GO: Ontología genética - *Gene ontology*
H/E: Hematoxilina-eosina
HHStcC: Línea células humana de células estrelladas hepáticas
HSCs: Células estrelladas hepáticas - *Hepatic stellate cells*
IFI: Inmunofluorescencia indirecta
IFN-gamma: Interferón gamma
IGF-1: Factor de crecimiento tipo insulina 1 - *Insulin-like growth factor 1*
KCs: Células de Kupffer - *Kupffer cells*
LSECs: Células endoteliales sinusoidales del hígado - *Liver sinusoidal endothelial cells*
LX2: Línea celular humana de células estrelladas hepáticas
MCP1: Proteína 1 quimioatrayente de monocitos - *Monocyte chemoattractant protein 1*
MMPs: Metaloproteinasas
MrgX2: *Mas-related gene X2 receptor*
NAFLD: Enfermedad de hígado graso no alcohólico - *Non alcoholic fatty liver disease*
NASH: Esteatosis no alcohólica - *Non alcoholic steatohepatitis*
NHDF: Fibroblastos humanos de piel - *Normal human dermal fibroblasts*
NHLF: Fibroblastos humanos de pulmón - *Normal human lung fibroblasts*
O/N: Durante la noche - *Overnight*
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas - *Platelet derived growth factor*
PFs: Fibroblastos portales - *Portal fibroblasts*
PKC: Proteína quinasa C - *Protein kinase C*
PKA: Proteína quinasa A - *Protein kinase A*

PPARs: *Peroxisome proliferator-activated receptors*

qPCR: *Quantitative polymerase chain reaction*

ROS: Especies reactivas de oxígeno - *Reactive oxygen species*

RPKM: *Reads per kilo base per million mapped reads*

RPLP0: *Ribosomal protein lateral stalk subunit P0*

SDS: Dodecilsulfato sódico

SSTR: Receptores de Somatostatina - *Somatostatin receptors*

TGF beta 1: Factor de crecimiento transformante beta 1 - *Transforming growth factor beta 1*

TIMPs: Inhibidores de metaloproteinasas – *Tissue inhibitors of metalloproteinase*

TLR: *Toll like receptor*

TNF: Factor de necrosis tumoral - *Necrosis tumoral factor*

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular - *Vascular endothelial growth factor*

* A lo largo de esta tesis algunos términos han sido incluidos en su lengua de origen y escritos en cursiva por no tener una clara traducción al castellano o ser ésta poco empleada.

SUMMARY

Chronic hepatocellular lesions trigger tissue repair responses that can become dysregulated and lead to the development of liver fibrosis. This process, characterized by the generation and deposition of fibrous tissue in the liver and the accumulation of extracellular matrix proteins disrupting the liver architecture by forming a fibrous scar, can ultimately lead to the development of cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Because of this, liver fibrosis is one of the main causes of morbidity and mortality globally. Despite having considerable knowledge about the pathogenesis of the fibrotic process, there are still no adequate biomarkers or therapies really effective for liver diseases associated with fibrosis development. Therefore, it is necessary to find factors with beneficial effect on fibrosis and that could be attractive candidates for being used either as biomarker or as therapeutic agent.

In this doctoral thesis we have investigated the potential protective role of the neuropeptide Cortistatin in the development of pathological liver fibrosis. For this we have performed two different experimental models where hepatocellular injury was induced by repeated administration of the toxic agent carbon tetrachloride, and cholestatic injury through ligation of the common bile duct. Both models were induced in mice with normal gene expression and mice with partial or total Cortistatin deficiency. In this way, we have showed that Cortistatin deficiency predisposes to the development of earlier and exacerbated clinical signs during the development of fibrosis and leads to a higher mortality rate, and that Cortistatin treatment avoids and reverts the progression of the induced fibrogenic response and the tissular damage caused by it. Likewise, we have demonstrated the inverse correlation between the development of liver fibrosis and the expression of Cortistatin, and the ability of this neuropeptide to signal through receptors associated with other anti-fibrotic factors being able to trigger a more powerful synergistic anti-fibrogenic response. During this thesis we have also investigated the phenotype and genetic signature of Cortistatin-deficient hepatic stellate cells. We have described a high number of differentially expressed genes in Cortistatin deficient cells that reveal a profile highly compromised with differentiation to activated myofibroblast, having among them genes associated with muscle development and function.

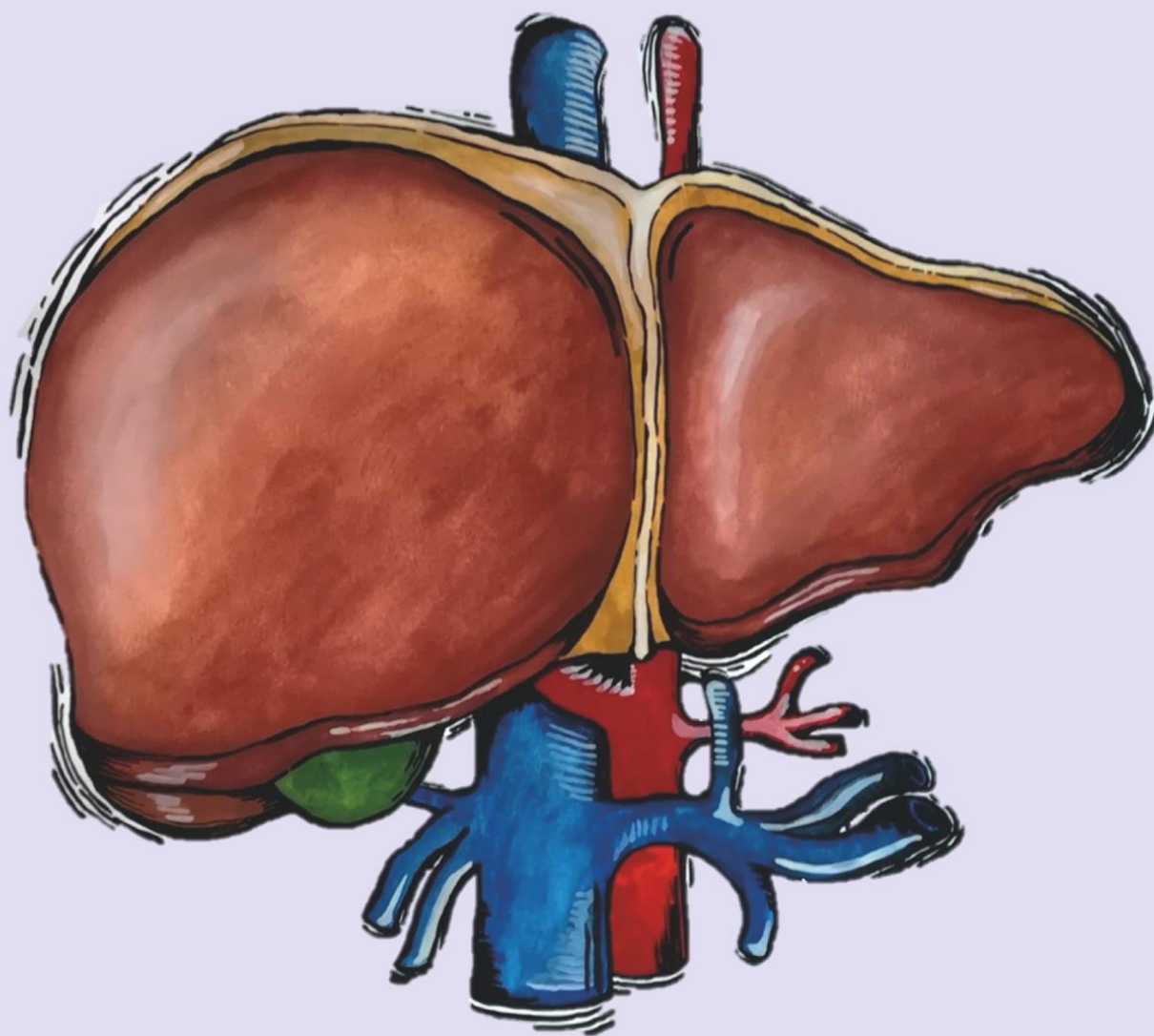
Therefore, with the results obtained during this doctoral thesis, it is proved that the neuropeptide Cortistatin emerges as a potential marker of poor prognosis in the development of liver fibrosis and as an anti-fibrotic agent suitable for the treatment of chronic liver disorders with different etiologies.

RESUMEN

Lesiones hepatocelulares crónicas desencadenan respuestas de reparación tisular que se pueden desregular y conducir al desarrollo de fibrosis hepática. Este proceso, caracterizado por la generación y deposición de tejido fibroso en el hígado y la acumulación de proteínas de matriz extracelular distorsionando la arquitectura hepática al formar una cicatriz fibrosa, puede en última instancia conducir al desarrollo de cirrosis o de carcinoma hepatocelular. A causa de ello, es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel global. A pesar de tener un conocimiento considerable sobre la patogénesis del proceso fibrótico, aún no existen ni biomarcadores adecuados ni terapias que sean realmente eficaces para las enfermedades hepáticas asociadas a su desarrollo y, por tanto, es necesaria la búsqueda de factores que presenten un efecto beneficioso sobre la fibrosis y puedan ser candidatos atractivos para su uso ya sea como biomarcador o como agente terapéutico.

En esta tesis doctoral hemos investigado el potencial papel protector del neuropéptido Cortistatina en el desarrollo de la fibrosis hepática patológica. Para ello hemos inducido dos modelos experimentales diferentes donde se indujo la lesión hepatocelular mediante la repetida administración del agente tóxico tetracloruro de carbono, y la lesión colestática a través de la ligación del ducto biliar común. Ambos modelos fueron inducidos en ratones con dotación génica normal y ratones con deficiencia, tanto parcial como total, en Cortistatina. De esta forma hemos comprobado que la deficiencia en Cortistatina predispone al desarrollo de signos clínicos más tempranos y exacerbados durante el desarrollo de la fibrosis y que conducen a una mayor tasa de mortalidad, y que el tratamiento con Cortistatina consigue evitar y revertir la progresión de la respuesta fibrogénica inducida y, por tanto, el daño desencadenado por ésta. Asimismo, hemos demostrado la relación inversa existente entre el desarrollo de la fibrosis hepática y la expresión de Cortistatina, y la capacidad de este neuropéptido para señalar a través de receptores asociados a otros factores anti-fibróticos y poder desencadenar así una respuesta anti-fibrogénica sinérgica más potente. Durante esta tesis hemos investigado también el fenotipo y la firma genética de las células estrelladas hepáticas deficientes en Cortistatina. Hemos descrito un elevado número de genes diferencialmente expresados en las células deficientes en Cortistatina que revelan un perfil muy comprometido con la diferenciación a miofibroblasto activado, y entre los que se encuentran incluso genes asociados al desarrollo y función muscular.

Por tanto, con los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral, queda patente que el neuropéptido Cortistatina surge como un potencial marcador de mala prognosis ante el desarrollo de fibrosis hepática y como agente anti-fibrótico adecuado para el tratamiento de trastornos hepáticos crónicos con diferentes etiologías.



Acuarela
Raquel Benítez Ruiz

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FIBROSIS HEPÁTICA.

La fibrosis hepática es una respuesta desregulada desencadenada a causa de una lesión hepatocelular crónica o severa. Este proceso, caracterizado por la generación y deposición de tejido fibroso en el hígado y la acumulación de proteínas de matriz extracelular que distorsionan la arquitectura hepática con cicatrices fibrosas, puede en última instancia conducir al desarrollo de cirrosis o de carcinoma hepatocelular. A causa de ello, es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel global.

Debido a la aparición generalizada y multiorgánica de las enfermedades fibróticas, es difícil determinar su incidencia total, aunque se ha estimado que alrededor del 45% de la mortalidad en los países desarrollados occidentales se debe a su aparición, lo que conlleva además un coste en atención médica superior a dos mil millones de euros directos cada año¹. De hecho, la cirrosis hepática ya es, por sí sola, causa de alrededor de 1.2 millones de muertes a nivel mundial, y por ello es considerada como la décima causa de muerte más común en países desarrollados. Según la Organización mundial de la Salud, el carcinoma hepatocelular es la quinta causa más común de cáncer, resultando en 47.000 muertes al año en Europa².

Existen diversas enfermedades asociadas a procesos fibrogénicos hepáticos como son la fibrosis hepática alcohólica y no alcohólica, la fibrosis hepática inducida por hepatitis C, la cirrosis biliar primaria, la fibrosis hepática inducida por parásitos (esquistosomiasis), la hepatitis autoinmune, la hipertensión portal, los síndromes hepato-renal, hepato-pulmonar y porto-pulmonar, la encefalopatía hepática o el cáncer hepatocelular³ entre otros.

Cada vez se conocen mejor los factores de riesgo de la fibrosis y cómo éstos afectan a su progresión. Entre ellos se encuentran el abuso en el consumo de alcohol (entre el 80-90 % de los alcohólicos crónicos desarrollan la enfermedad del hígado graso y corren el riesgo de desarrollar severas complicaciones), la edad, el sexo (mayor prevalencia en hombres), índice de masa corporal, anormalidades lipídicas o desregulaciones del sistema inmunitario (debidas a inmunodeficiencias o drogas inmunosupresoras). Actualmente se está estudiando más detalladamente también el componente genético como factor de riesgo, de forma que se identifiquen variantes génicas o polimorfismos que puedan predecir la tasa de progresión de la enfermedad más rápidamente en pacientes con una fibrosis hepática poco avanzada e incluso en pacientes sin fibrosis aparente⁴.

Hoy por hoy no existe ninguna terapia estándar para el tratamiento de la fibrosis hepática y el enfoque más efectivo hasta la fecha sigue siendo la retirada del agente causante del daño. Por tanto, debido a que aún no se posee un conocimiento completo de la patogénesis del proceso fibrótico y a la actual existencia de un vacío en cuanto a agentes terapéuticos totalmente eficaces contra este tipo de enfermedades, durante esta tesis se ha pretendido ahondar en el estudio de los complejos mecanismos patogénicos involucrados en la respuesta fibrogénica y los posibles elementos

reguladores que participen durante su desarrollo, para con ello proponer nuevos biomarcadores adecuados además de una posible terapia efectiva para la fibrosis hepática.

Antes de conocer cómo se desarrolla la respuesta fibrogénica hepática primero hemos de conocer dónde se produce, de forma que se entiendan mejor las interacciones que se van a originar entre los elementos implicados en dicha respuesta, los cuales se irán explicando detalladamente a lo largo de esta tesis doctoral.

1.1.1 Hígado.

El hígado es el órgano más voluminoso del organismo, puede llegar a pesar alrededor de 1500 gramos representando así entre el 2 y el 3% del peso corporal medio. Se encuentra ubicado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, protegido por la caja torácica, donde mantiene su posición mediante los reflejos peritoneales.

1.1.1.1 Funciones.

La esencialidad del hígado como órgano vital del cuerpo reside en su capacidad para realizar multitud de funciones indispensables para éste (**Fig. 1**).

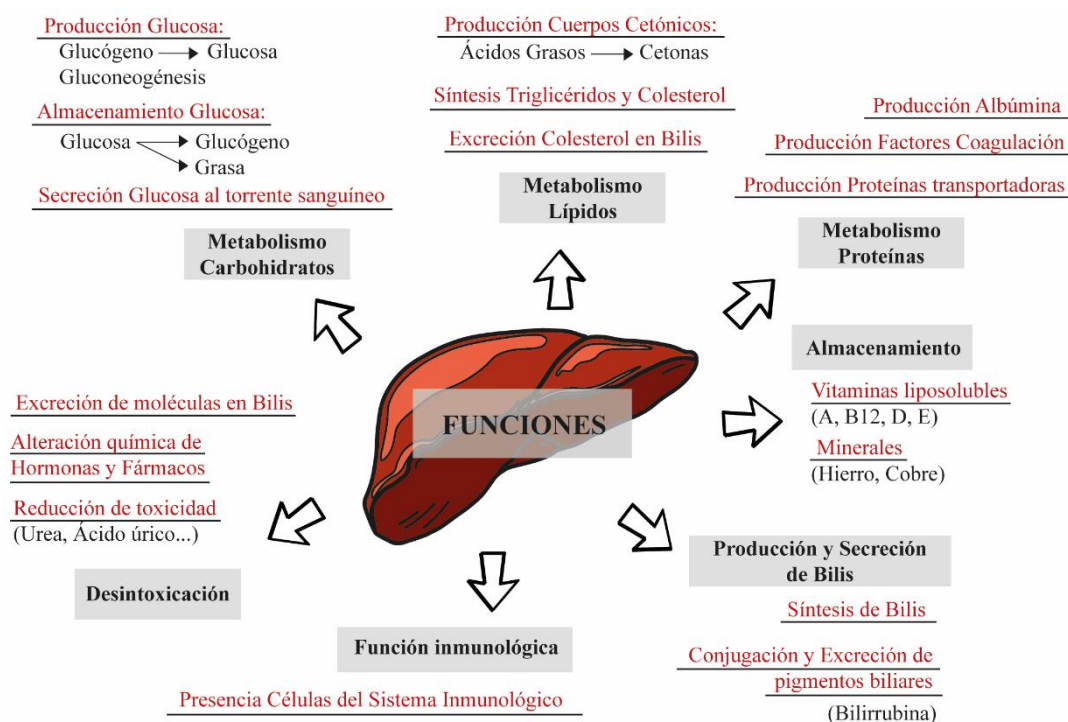


Figura 1. Funciones hepáticas.

El hígado realiza funciones indispensables para el organismo entre las que se encuentran la participación en las rutas metabólicas de carbohidratos, lípidos y proteínas, el almacenamiento tanto de vitaminas como de minerales, la producción y secreción de bilis, la desintoxicación y diversas funciones inmunológicas.

Debido a la importancia de estas funciones para el organismo y cómo la fibrosis hepática hace que se vean alteradas, se van a describir brevemente algunas de ellas a continuación:

- Metabolismo intermediario de carbohidratos, lípidos y proteínas:

La participación del hígado en todas estas rutas metabólicas difiere dependiendo del estado en que se encuentre el organismo en relación a la glucemia derivada de la alimentación. Por lo que responderá de una u otra forma en base a las necesidades energéticas del resto del cuerpo, las cuales variarán durante la fase de ayuno y tras la ingesta.

Durante el estado de ayuno, el hígado aporta la glucosa necesaria para el correcto funcionamiento del resto de órganos, a través del glucógeno hepático almacenado y también a través de la

gluconeogénesis. Este proceso de gluconeogénesis requiere a su vez de diversos sustratos aportados por el intestino (aminoácidos), los músculos (aminoácidos, lactato y piruvato) y el tejido adiposo (glicerol). Los aminoácidos aportados al hígado por el músculo y el intestino también pueden oxidarse para la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP), usarse como sustratos para el ciclo de Krebs o ser utilizados para la síntesis de proteínas (albúmina, factores de coagulación o proteínas transportadoras de membrana). Mediante la ureogénesis se consigue eliminar el amonio tóxico liberado durante el metabolismo de estos aminoácidos (la urea sale del hígado hacia los riñones que se encargan de su excreción). También hay que tener presente que, durante la fase de ayuno, los cuerpos cetónicos generados en la beta oxidación de los ácidos grasos también pueden funcionar como energía adicional entre el hígado y el resto del cuerpo.

Sin embargo, tras la ingesta de alimentos, al no ser necesaria la aportación de glucosa al resto de órganos por parte del hígado, ésta se puede someter al proceso de glucolisis para generar ATP o almacenarse en forma de glucógeno. El intestino no sólo aporta aminoácidos al hígado, como ocurre durante el ayuno, sino también nutrientes que ingresan a través de la circulación venosa portal, de forma que ahora el intestino aporta además piruvato, lactato y ácidos grasos. El glicerol generado junto con los ácidos grasos absorbidos forman triglicéridos, los cuales son empaquetados en quilomicrones que viajan posteriormente por el sistema linfático. Los triglicéridos generados pueden también cargarse de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para transportar lípidos desde el hígado a otros órganos.

- Función endocrina:

El hígado es capaz de modificar la acción de diversos compuestos y hormonas como la hormona del crecimiento GH (secretada por la hipófisis y cuya acción es mediada por el factor de crecimiento tipo insulina 1, IGF-1, de síntesis hepática), la tiroxina (secretada por la glándula tiroidea y convertida en su forma activa T₃ en el hígado), la insulina y el glucagón (hormonas pancreáticas que se degradan principalmente en el hígado y los riñones) o la vitamina D (convertida por el hígado en su forma activa más potente antes de volver a la circulación).

- Producción de albúmina:

La albúmina es una proteína multifuncional cuyas acciones se deben a su diversa distribución (intravascular, extravascular e intracelular), su concentración molecular y su compleja estructura. Algunas de sus funciones son proporcionar presión osmótica coloidal al plasma para evitar su salida por los capilares, transportar hormonas, ácidos grasos libres, bilirrubina, fármacos o drogas, controlar el pH e inmunomodulador además de actuar como agente antioxidante y antitrombótico.

Aunque no se conocen reservorios de albúmina en el organismo, alrededor de 10 g/día son sintetizados diariamente por el hígado en adultos, lo que constituye aproximadamente el 25% de la síntesis proteica hepática^{5,6}. Su síntesis es llevada a cabo exclusivamente en el hígado por los

hepatocitos. En momentos de estrés, el hígado tiene la capacidad de incrementar su producción hasta 10 veces. Mientras que alrededor del 35% de toda la albúmina nativa permanece en el espacio intravascular, el resto viaja al espacio intersticial por transcapilaridad⁷. La albúmina es capaz de entrar de nuevo en el hígado vía sinusoides y volver a la circulación sistémica a través de los capilares y del sistema linfático. Aunque el catabolismo de esta proteína no es totalmente conocido, se sabe que aproximadamente un 40-60% es degradado por el hígado, los riñones y los músculos⁵.

- Producción de bilis como función exocrina:

La bilis, como veremos en el apartado 1.1.1.4, contiene productos de desecho, conjugados y degradados, disueltos en agua. Fluye a través del árbol biliar desde el parénquima hepático hacia la vesícula biliar, donde es concentrada, o directamente hacia a la luz intestinal para su posterior eliminación.

- Absorción y metabolización de la bilirrubina:

La bilirrubina es un componente de la ruta catabólica del grupo hemo. El proceso de absorción y metabolización de este elemento es esencial en la función hepática ya que reduce la acumulación de grasa en el hígado.

Como queda esquematizado en la **Figura 2**, los eritrocitos se rompen durante la eritosis, de tal forma que el anillo hemo queda abierto por la hemo oxigenasa y se forma la biliverdina, la cual es convertida en bilirrubina a través de la biliverdina reductasa A (BVRA). En el interior de los hepatocitos esta bilirrubina puede, por un lado prevenir la esteatosis hepática incrementando la quema de grasas a través de un aumento de la actividad transcripcional de PPAR α (del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor α*); ser excretada de nuevo al torrente sanguíneo a través de proteína asociada a la resistencia a múltiples drogas 3 (MRP3); o ser conjugada con ácido glucurónico (GA) por la enzima UDP-glucuronosiltransferasa (UGT1A1). La bilirrubina no conjugada puede entrar de nuevo en los hepatocitos a través del transportador de aniones orgánicos (OATP) y también ser conjugada por la UGT1A1. Una vez conjugada, la bilirrubina es excretada a la bilis, a través de la proteína 2 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP2), dirección al intestino donde será desconjugada y reducida a urobilinógeno (**Fig. 2**). Finalmente, estos urobilinógenos serán depositados en las heces como pigmento biliar, reabsorbidos por la circulación hepática portal o llevados a los riñones donde se oxidarán a urobilina para así también excretados por la orina (**Fig. 2**).

- Absorción y almacenamiento de vitaminas lipo e hidrosolubles y minerales como hierro, cobre y zinc:

El hígado participa también en el metabolismo de los micronutrientes (aquellos nutrientes que sólo son necesarios en cantidades del orden de los micro o miligramos para el correcto funcionamiento

fisiológico del organismo). El hígado es capaz tanto de captar como de almacenar diferentes vitaminas y minerales que pueden conservarse inalterados en él o sufrir modificaciones bioquímicas.

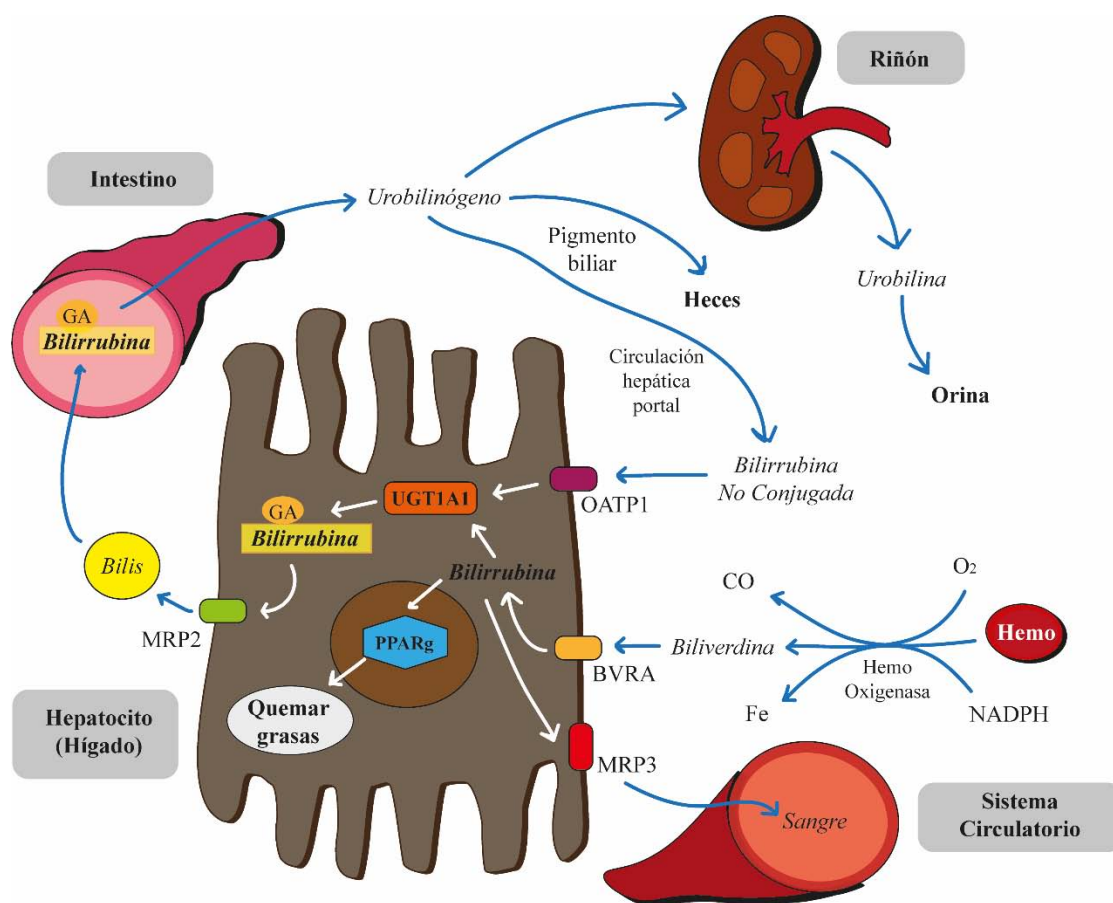


Figura 2. Metabolismo de la bilirrubina.

Mientras que las vitaminas liposolubles (A, D, E, K) absorbidas por el intestino delgado son capaces de viajar por el sistema linfático hasta el hígado y otros tejidos adiposos a través de los quilomicrones, las vitaminas hidrosolubles (B3, B12 o C entre otras) llegan al hígado a través del torrente sanguíneo (**Fig. 3**). La vitamina A, retinol, se almacena en las células estrelladas hepáticas hasta que baja su concentración en sangre y entonces es liberada de nuevo a la circulación en forma de retinol unido a la proteína fijadora de retinol (RBP) que también está sintetizada en hígado.

El hígado además es capaz de absorber y almacenar minerales como el hierro (Fe), el cobre (Cu) y el zinc (Zn) que llegan unidos a otros compuestos sin perder su propia identidad química, como son la transferrina en el caso del Fe o la albúmina para el Cu y el Zn (**Fig. 3**). El hígado es capaz de participar no sólo en el almacenamiento del hierro sino también en la síntesis de prácticamente todas las proteínas que intervienen en su metabolismo y su transporte como la transferrina, la haptoglobina o la hemopexina.

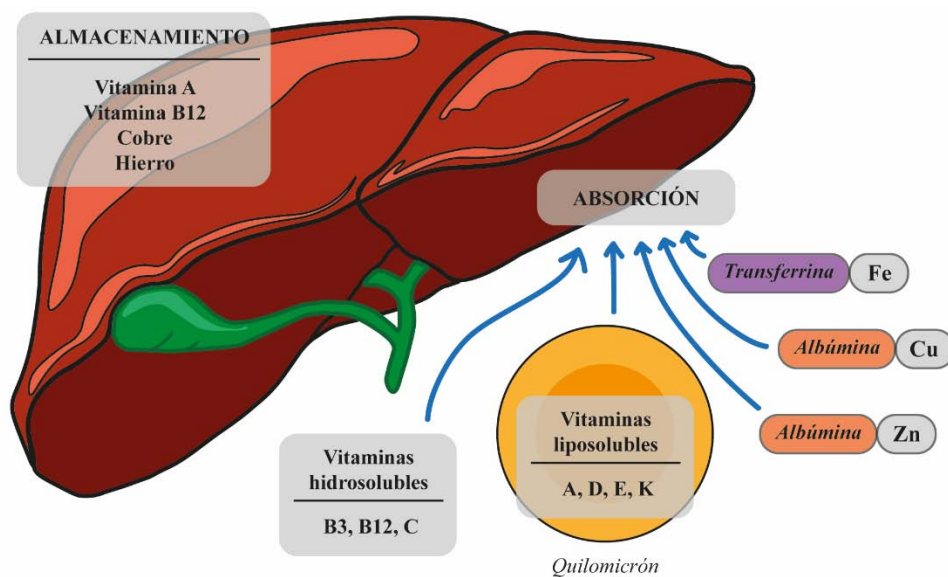


Figura 3. Absorción y almacenamiento de vitaminas y minerales en el hígado.

Función hepática de almacenamiento de vitaminas y minerales absorbidos por el organismo.

- Degradación de fármacos y toxinas:

El hígado desintoxica la sangre neutralizando numerosas toxinas a través del proceso conocido como filtración sanguínea. Los hepatocitos son capaces de convertir fármacos, toxinas y xenobióticos (proteínas extrañas al organismo) en formas más solubles y lo hacen en dos fases: fase I o fase de oxidación, durante la que se produce la hidroxilación y la carboxilación del compuesto extraño en el retículo endoplasmático liso y en las mitocondrias; y fase II o fase de conjugación, durante la que se asocia o conjuga el compuesto extraño con glicina, ácido glucurónico o taurina de forma que al ser más hidrosoluble pueda ser más fácilmente eliminado por los riñones.

Además, el alcohol que es absorbido por el tracto intestinal es transportado al hígado donde el 90% puede ser metabolizado a través de tres sistemas: mediante la alcohol deshidrogenasa presente en el citosol de los hepatocitos, a través del sistema oxidante microsomal de etanol en el que participa el citocromo P450 y mediante la actividad catalasa de los peroxisomas de las células hepáticas⁸.

- Función inmunológica:

El hígado contribuye tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Este órgano se encuentra constantemente expuesto a gran variedad de antígenos provenientes del tracto gastrointestinal (antígenos de la propia dieta, patógenos y toxinas). Por ello, cuenta con la defensa innata equipada por los monocitos, las células de Kupffer (macrófagos residentes del tejido hepático), los macrófagos infiltrantes, los granulocitos, las células dendríticas, las células NK (células asesinas naturales) y NKT (células T asesinas naturales), que se coordinan para mantener un ambiente tolerógeno a la par que detectar y responder ante patógenos invasores o elementos dañinos^{9,10}. La inmunidad adaptativa en el hígado está mediada por numerosos factores con extensas y variadas interacciones y por la presencia de células como linfocitos T y B, lo que hace que al hígado se le

pueda considerar también como un 'órgano linfoide' con gran capacidad de inmunotolerancia¹¹. La coordinación entre células inmunitarias innatas y adaptativas se produce fácilmente en el hígado gracias a la estructura única que presenta este órgano. Células residentes del tejido hepático con capacidad de presentar antígenos como los hepatocitos, las células endoteliales sinusoidales o las células estrelladas hepáticas, facilitan la tolerancia inmune adaptativa en el hígado.

El balance entre la inmunotolerancia y la actividad inmunitaria es crítico para la función fisiológica hepática y es responsable de la sensibilidad de este órgano a numerosas enfermedades. Agentes infecciosos o tóxicos, la susceptibilidad genética o una actividad anormal de células T reguladoras pueden conducir a la ruptura de la inmunotolerancia hepática provocando graves daños en células del tejido hepático como los hepatocitos o las células epiteliales biliares. En determinadas circunstancias, diversos patógenos y virus como el virus de la hepatitis B/C o la malaria, aprovechan estos mismos mecanismos tolerogénicos hepáticos para establecer infecciones persistentes¹². Otras enfermedades, como la enfermedad hepática autoinmune, también se asocian a la ruptura de la inmunotolerancia, lo cual puede acabar derivando en una hepatitis severa y dar lugar progresivamente a la cirrosis.

1.1.1.2 Estructura.

La anatomía del hígado se puede dividir en lóbulos, aunque esta división es ligeramente distinta entre humano y ratón. En el caso del ser humano, puede incluso a hablarse de hígado no lobulado al presentar este una estructura mucho más unida y definida como bloque que el hígado murino. Es decir, mientras que un hígado murino presenta lóbulos individuales que se pueden ligar y extirpar fácilmente de forma independiente, el hígado humano no.

Existen diversos modelos que describen la anatomía humana hepática basándose principalmente en las implicaciones quirúrgicas. Según el modelo de Couinaud (**Fig. 4A**), el hígado humano consta de dos lóbulos principales, izquierdo y derecho, y cada uno de ellos se puede dividir en sectores. Ambos sectores del hemi-hígado derecho, lóbulo de mayor tamaño, se subdividen a su vez en 2 "segmentos" por un plano transversal a través de la primera bifurcación de la vena porta^{13,14}. En total quedan diferenciados un total de 8 segmentos que se numeran en el sentido de las agujas del reloj (encontrándose el segmento I en la parte posterior del hígado) y que se encuentran protegidos por una cubierta de tejido conectivo denominada cápsula de Glisson (**Fig. 4B**). Externamente se aprecia cómo el hígado se encuentra dividido por el ligamento falciforme que lo mantiene unido a la pared abdominal anterior.

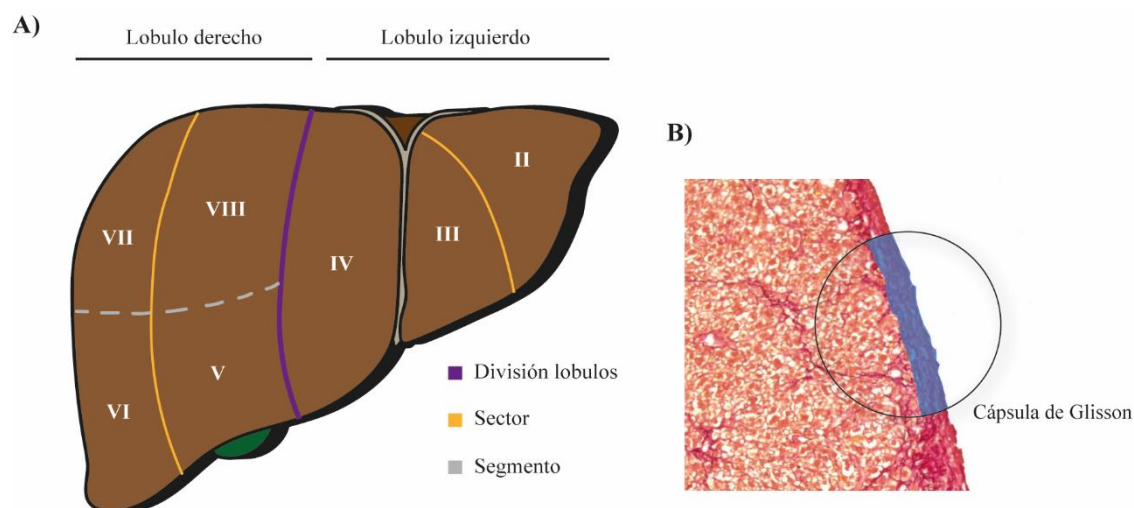


Figura 4. Anatomía hepática.

A) División de la estructura hepática en lóbulos y sectores según el modelo de Couinaud. B) Cápsula de Glisson, cubierta de tejido conectivo que recubre los lóbulos hepáticos.

Unidades funcionales hepáticas internas

La arquitectura interna del hígado es homogénea entre segmentos. Estructuralmente el parénquima del tejido hepático se compone de unidades funcionales microscópicas que pueden ser descritas de tres formas distintas (**Fig.5**):



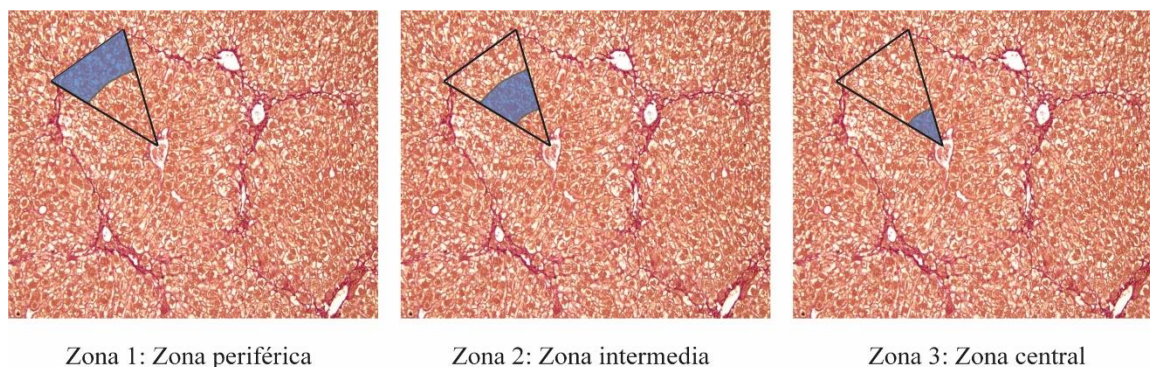
Figura 5. Unidades funcionales del tejido hepático.

Acino hepático

Unidad funcional ovoide donde el eje corto se corresponde con dos tríadas portales adyacentes y el eje largo con dos venas hepáticas terminales adyacentes (**Fig. 5**).

Si un acino hepático se divide en dos, cada mitad se divide en tres zonas a su vez (**Fig. 6**):

- Zona 1: las células de esta zona, al ser las más cercanas a las tríadas portales, son las primeras que reciben nutrientes, oxígeno o toxinas.
- Zona 2: las células de esta zona presentan características intermedias entre las zonas 1 y 3 al encontrarse entre las tríadas portales y las vénulas hepáticas (vena central en el lóbulo hepático).
- Zona 3: las células de esta zona al estar más alejadas de las tríadas portales reciben sangre más pobre, es decir con una menor concentración tanto de nutrientes como de oxígeno y toxinas.



Zona 1: Zona periférica

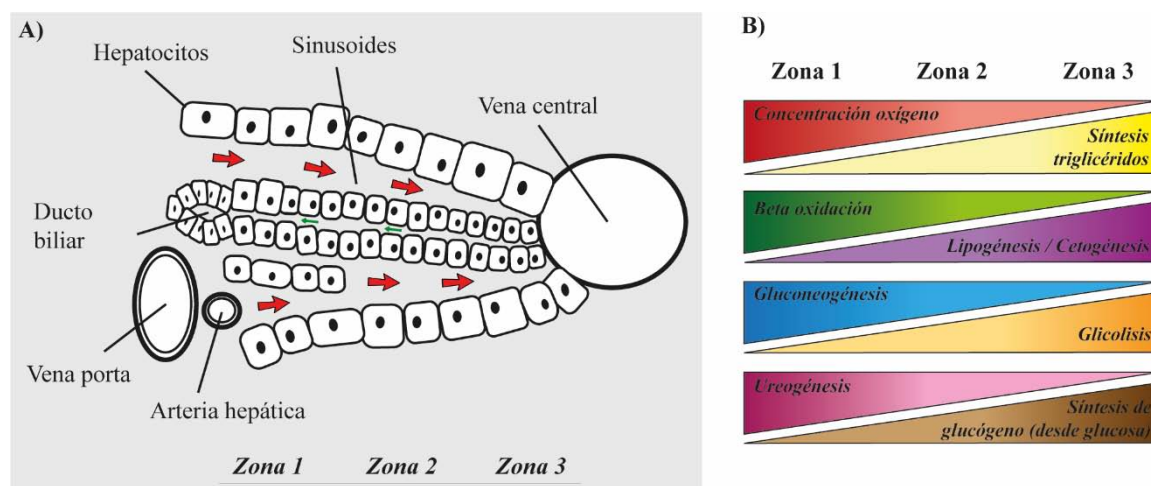
Zona 2: Zona intermedia

Zona 3: Zona central

Figura 6. Zonas del acino hepático.

En el acino hepático se pueden diferenciar tres zonas dependiendo del flujo de oxígeno y nutrientes entre la vena central del acino y las tríadas portales.

Esta forma de concebir la unidad funcional hepática destaca la dirección del flujo sanguíneo en el hígado lo cual es importante para entender cómo la actividad metabólica de los hepatocitos afecta a los diferentes grados de oxigenación al viajar desde las tríadas portales hasta la vena hepática central a través de los sinusoides.

**Figura 7. Flujo y gradientes de distribución entre zonas del acino hepático.**

A) El flujo sanguíneo (flechas rojas) atraviesa las zonas 1, 2 y 3 desde la triada portal hasta la vena central, mientras que el flujo de bilis (flechas verdes) presenta la dirección contraria. B) Los diferentes procesos que se llevan a cabo en el tejido hepático presentan distinto gradiente de distribución en función de las zonas del acino hepático.

Los gradientes que se muestran en la **Figura 7** pertenecen tanto a las moléculas esenciales como a los procesos funcionales que fueron mencionados previamente y que son fundamentales para la homeostasis metabólica tanto del hígado como del resto del organismo. Hay que tener presente la flexibilidad de estos gradientes dependiendo de factores como la disponibilidad variable de nutrientes.

Lóbulo hepático

También conocido como lóbulo clásico. Se trata de una región con forma aproximadamente hexagonal (**Fig. 5 y 8**) que tiene como centro una ramificación de la vena hepática (vena central del lóbulo) y en sus seis esquinas exteriores las tríadas portales (rama de la vena porta, rama de la arteria hepática y ducto biliar). Si lo relacionamos con las zonas del acino hepático encontraríamos

la zona 3 como la zona más cercana a la vena central mientras que la zona 1 sería la más cercana a las áreas portales que componen las aristas del hexágono.

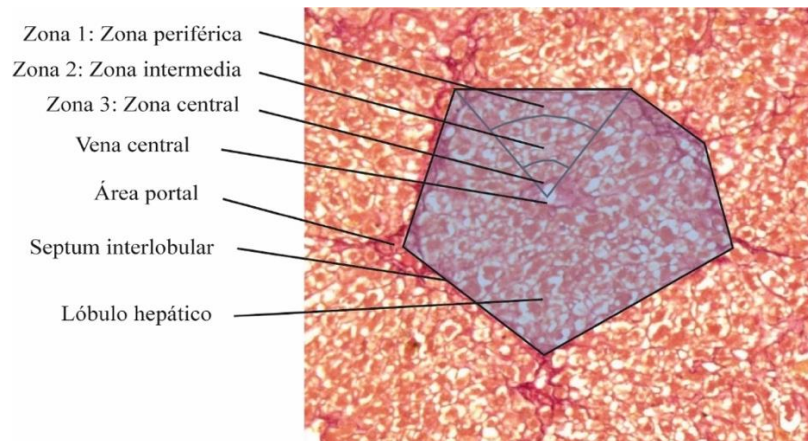


Figura 8. Lóbulo hepático.

Unidad fundamental de tejido hepático en forma de hexágono rodeada por áreas portales alrededor de una vena central y con triadas portales en sus esquinas.

Lóbulo portal

Unidad fundamental, cuya configuración de carácter triangular (**Fig. 5**), resalta la capacidad secretora exocrina del hígado. Esta unidad fundamental tiene en su centro una triada portal y en sus extremos las venas centrales de 3 lóbulos hepáticos clásicos adyacentes. Es decir, que las aristas de este tipo de lóbulo son líneas imaginarias trazadas entre dichas venas centrolobulillares.

Parénquima y espacios extracelulares

Dentro del hígado se pueden hablar de dos áreas anatómicas separadas, el parénquima hepático y los espacios portales, y dependiendo de los distintos tipos celulares y espacios presentes en el interior hepático se puede diferenciar entre células parenquimatosas, no parenquimatosas y espacios extracelulares (**Fig. 9**).

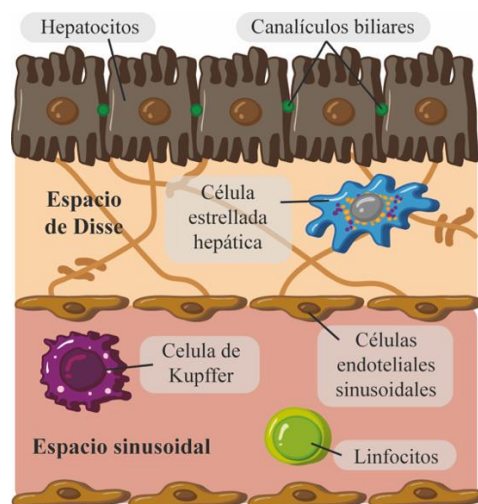


Figura 9. Principales células hepáticas y espacios extracelulares.

La mayor parte del hígado, entre un 75 y un 80%, se encuentra ocupado por células parenquimatosas (hepatocitos), mientras que las células no parenquimatosas (células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer, células estrelladas hepáticas) sólo representan un 5-6 %¹⁵ (**Fig. 9 y 10**). El resto del volumen lo componen los espacios extracelulares. Todos y cada uno de estos componentes juegan, directa e indirectamente, un papel importante en la homeostasis hepática.

Células del tejido hepático

- Hepatocitos

Los hepatocitos son las principales células parenquimatosas del tejido hepático. Contribuyen en un amplio rango de rutas metabólicas (carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, vitaminas, hormonas, factores de coagulación, secreción biliar, etc). Los hepatocitos son células altamente polarizadas con dominios apicales que representan un 10-15% del área superficial celular. El resto de la superficie celular consiste en una membrana lateral lisa y una membrana basal compuesta de microvellosidades (**Fig. 9**)^{14,16}. Estas vellosidades se extienden hacia el espacio de Disse y aumentan el área superficial disponible para el intercambio de materiales entre los hepatocitos y el plasma sanguíneo.

Los hepatocitos presentan diámetros más pequeños de luz canalicular en las zonas centrales de los lóbulos que van aumentando de tamaño a medida que se acercan a los espacios porta (**Fig. 7**).

- Células endoteliales sinusoidales

Las células endoteliales sinusoidales (LSECs) constituyen la pared sinusoidal, también denominada endotelio o revestimiento endotelial (**Fig. 9**). Representan aproximadamente el 15% de las células hepáticas, aunque sólo el 3% del volumen hepático¹⁷. En condiciones fisiológicas, las LSECs conforman una barrera permeable a través de las fenestras. El mantenimiento de esta barrera es crítico ya que actúa como un filtro dinámico que facilita el intercambio bidireccional de fluidos, solutos y partículas entre los sinusoides y las células del parénquima. Daños como el abuso crónico de alcohol provocan la defenestración, lo que junto con la capilarización del endotelio hepático parece ser importante en la iniciación de la fibrosis perisinuoidal al verse alterado también en metabolismo del retinol¹⁸. Durante la progresión de la fibrosis, las LSECs dañadas van perdiendo gradualmente las fenestras lo que aumenta la capilarización y hace que disminuya su capacidad hepatoprotectiva y se promueva la vasoconstricción intrahepática y la respuesta fibrogénica.

- Células de Kupffer

Las células de Kupffer (KCs), también conocidas como células de Browicz-Kupffer, son macrófagos especializados localizados cerca de las paredes del revestimiento de los sinusoides del hígado que forman parte del sistema retículo-endotelial (**Fig. 9**). Su función principal es la eliminación y detoxificación de agentes exógenos y endógenos (principalmente endotoxinas

bacterianas provenientes del intestino) que se introducen a través de la circulación portal. Las KCs actúan como células presentadoras de antígenos y, dependiendo de los estímulos que reciban, ejercen funciones tanto pro- como anti-inflamatorias durante la respuesta fibrogénica^{19,20}. De hecho, son capaces de destruir hepatocitos mediante la generación de mediadores solubles nocivos. Y la inflamación mediada por ellas agrava el daño en el tejido hepático y aumenta la progresión de la fibrosis.

- Células estrelladas hepáticas:

Las células estrelladas hepáticas (HSCs) residen en el espacio de Disse teniendo como función principal el almacenamiento de vitamina A (**Fig. 9**). Cuando el hígado sufre un daño estas células se diferencian y activan a miofibroblastos. Esta activación es un evento fundamental en el inicio y progresión de la fibrosis hepática ya que las HSCs activadas y diferenciadas a miofibroblastos son las principales células efectoras generadoras de matriz extracelular.

Debido a la importancia las HSCs en esta tesis doctoral, se procederá a una descripción más detallada en el apartado 1.1.3.

- Linfocitos residentes:

Dentro del tejido hepático existe gran variedad de linfocitos y otras células del sistema inmunitario que se encuentran en mayor o menor proporción (**Fig. 10**). Los linfocitos innatos tienen un carácter predominante e incluyen células NK, células innatas linfoides (ILC, del inglés *Innate lymphoid cells*) y linfocitos T de tipo innato como las células NKT o las células T invariantes asociadas a la mucosa (MAIT, del inglés *Mucosal associated invariant T cell*)²¹. Además, también se pueden encontrar linfocitos T cooperadores CD4 y citotóxicos CD8 al igual que linfocitos B generadores de anticuerpos.

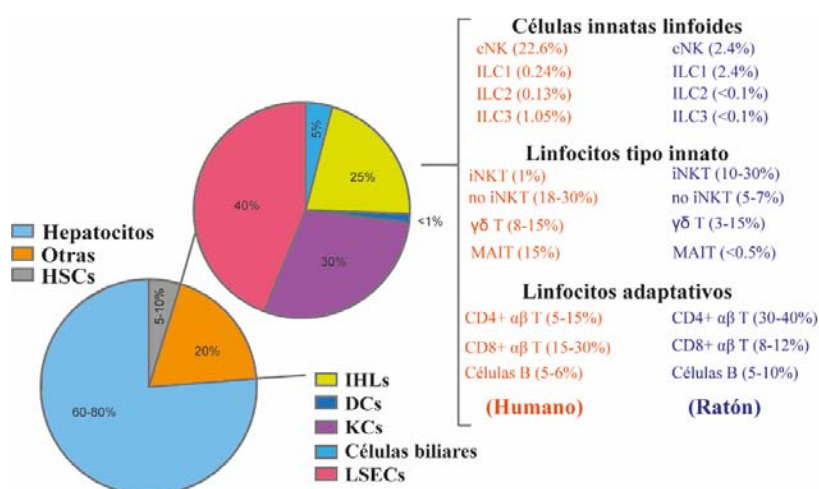


Figura 10. Células presentes en el tejido hepático.

Porcentajes asociados a la presencia de los distintos poblaciones celulares en el hígado, resaltando la diversidad de linfocitos innatos y adaptativos y de células linfoides que pueden encontrarse en el tejido hepático humano y de ratón. Figura adaptada de ref²¹.

Los linfocitos residentes en el hígado actúan como centinelas que mantienen la homeostasis hepática realizando una vigilancia inmunológica en respuesta a infecciones y otras agresiones. En condiciones patológicas, los diversos linfocitos hepáticos ejercerán efectos tanto protectores como patológicos dependiendo de la enfermedad hepática en cuestión y del punto en el que se encuentre su desarrollo.

Espacios extracelulares hepáticos

- Canaliculos biliares

Los canaliculos biliares son espacios interconectados entre hepatocitos adyacentes (**Fig. 9**) que se encuentran formando un entramado de canales intercelulares que recibe la bilis secretada por los hepatocitos y la drenan hacia los ductos biliares por donde circulan a través del árbol biliar. El diámetro canalicular varía entre 0.5 y 1 μ m en la zona perivenular y entre 1 y 2.5 μ m en la zona periportal, de acuerdo con el flujo de bilis desde la región centrolobulillar del lóbulo hepático hacia el tracto portal (**Fig. 7A**)²². Más información sobre estos espacios en relación a las vías biliares en el apartado 1.1.1.4.

- Sinusoides

Los sinusoides hepáticos son estructuras de microvasculatura únicas y dinámicas que sirven como principal espacio de intercambio entre la sangre y el espacio perisinusoidal de Disse. Estos espacios presentan un diámetro aproximado de 10-15 μ m²³. Los sinusoides hepáticos se encuentran revestidos por LSECs, de tal forma que se crea una barrera porosa a través de la que se produce el intercambio de sustancias entre la sangre y los hepatocitos a través de las fenestras (**Fig. 9**).

- Espacios de Disse

El espacio de Disse también es conocido como espacio perisinusoidal. Este espacio extracelular se encuentra entre los hepatocitos y los sinusoides hepáticos, separando el epitelio hepático (hepatocitos) del endotelio sinusoidal (**Fig. 9**). En el hígado, el espacio de Disse constituye también un nicho celular creado por proteínas de matriz extracelular, células endoteliales sinusoidales, células parenquimatosas hepáticas y terminaciones nerviosas simpáticas²⁴. En su interior se da el microambiente adecuado para el correcto funcionamiento de las HSCs, de tal forma que puedan secretar matriz extracelular a este espacio tras una lesión en el tejido hepático.

1.1.1.3 Irrigación sanguínea.

El hígado presenta una irrigación singular ya que recibe sangre de dos fuentes: la vena porta y la arteria hepática (**Fig. 11**). La sangre que entra en el hígado proviene principalmente de la vena porta (alrededor del 80%)²⁵ tras circular previamente por el tubo digestivo, el páncreas y el bazo. Esta sangre, aunque presenta baja concentración de oxígeno, es rica en nutrientes absorbidos por el

intestino, secreciones endocrinas tanto del páncreas como del tubo digestivo, y eritrocitos y sus productos de degradación provenientes del bazo. El hígado además se encuentra irrigado también por la arteria hepática la cual aporta el otro 20 % aproximadamente de la sangre, la cual es más oxigenada. Posteriormente, la salida del hígado de la circulación sanguínea se realiza a través de las venas hepáticas que desembocan en la vena cava inferior en dirección al corazón.

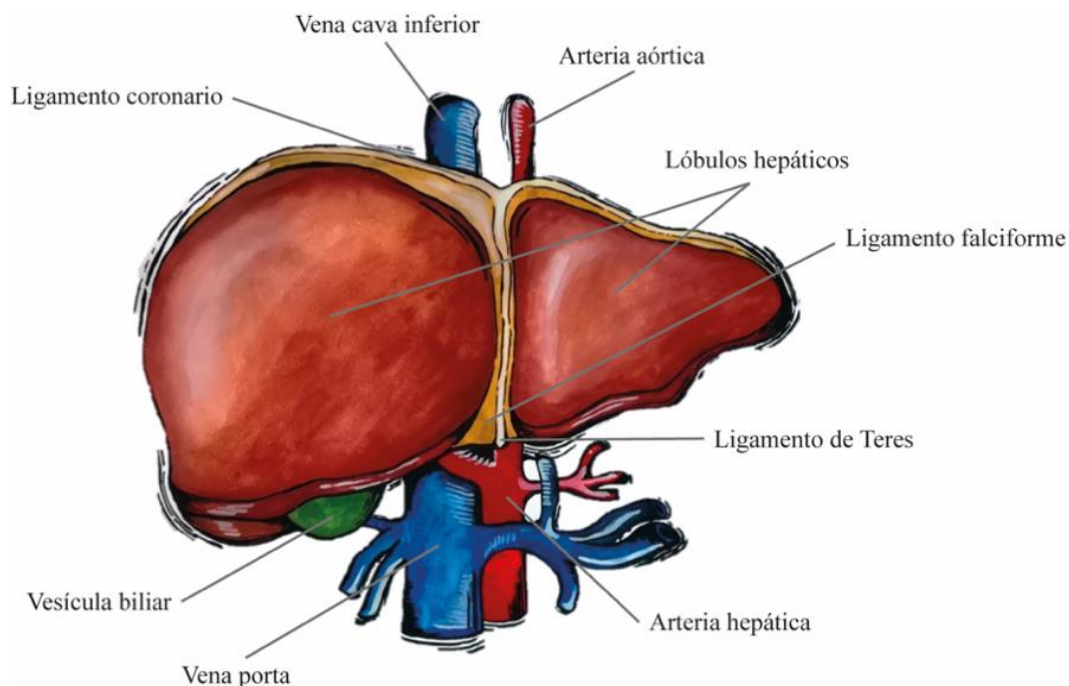


Figura 11. Anatomía hepática.

División del hígado en lóbulos con unión estructural mediante ligamentos e irrigación sanguínea a través de vena porta y arteria hepática. *Acuarela.*

Dentro del hígado, la sangre proveniente tanto de la vena porta como de la arteria hepática es distribuida por medio de múltiples ramas internas que acabarán irrigando internamente el órgano a través de los sinusoides (también conocidos como capilares sinusoidales). Estos sinusoides desembocan a su vez en la vena central, o vena centrolobulillar, que se encuentra en el centro del lóbulo hepático y a través de la cual se recoge la sangre en dirección a las venas hepáticas.

Las ramas tanto de la vena porta como de la arteria hepática y las ramas del sistema de drenaje de la vía biliar transcurren en conjunto a través del tejido hepático formando lo que se denomina como tríada portal (**Fig. 12 y 13**). Estas tríadas portales se encuentran en los espacios porta interlobulillares y sirven de conexión entre las unidades funcionales anexas que componen la estructura interna del hígado.

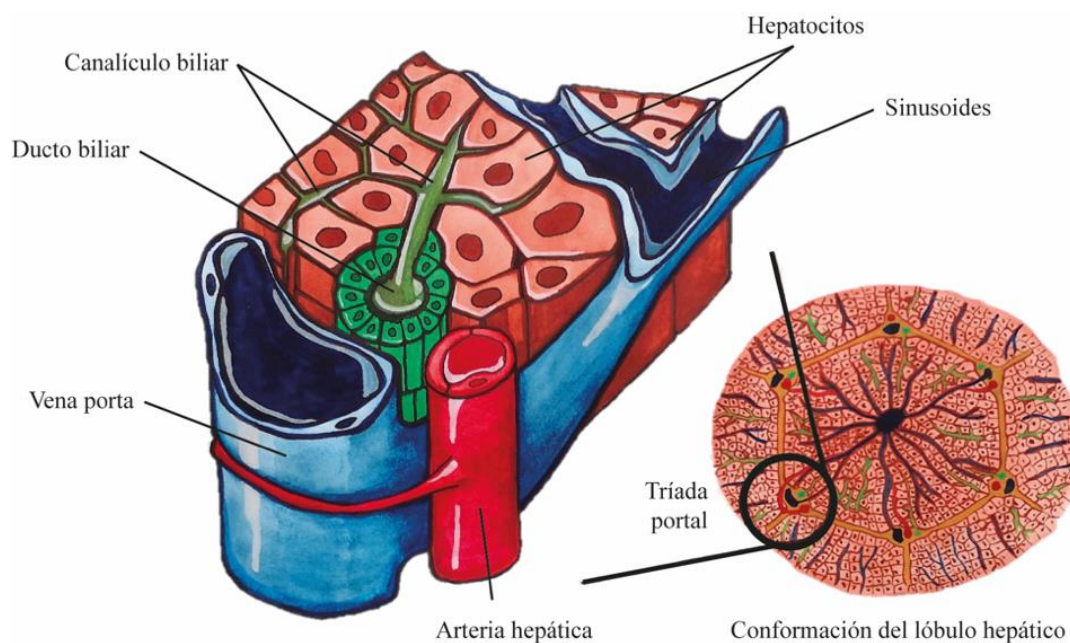


Figura 12. Triada portal.

Las triadas portales se encuentran en las esquinas de los lóbulos hepáticos y se componen de ramificaciones de la arteria hepática, la vena porta y del ducto biliar. *Acuarela.*

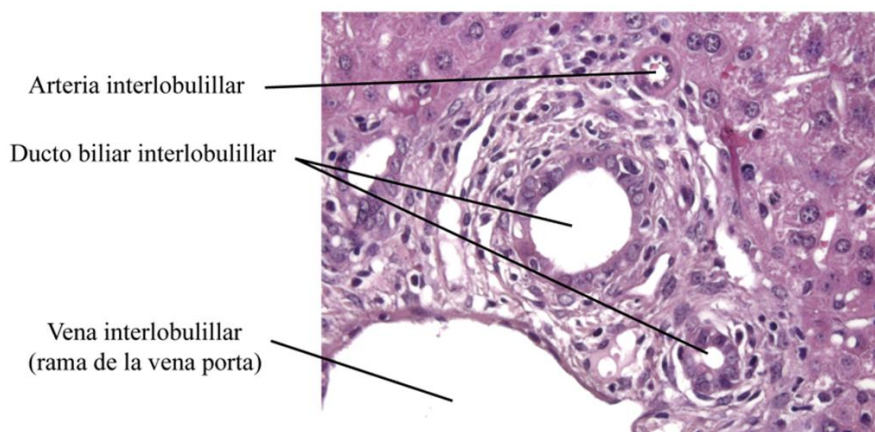


Figura 13. Triada portal en corte histológico de tejido hepático.

Tinción hematoxilina eosina sobre corte de tejido hepático murino.

1.1.1.4 Vías biliares.

Las vías biliares son conductos interconectados por los que discurre la bilis. Se habla de vías biliares intrahepáticas, que llevan la bilis desde los hepatocitos del parénquima hasta los conductos hepáticos, y vías biliares extrahepáticas, que conducen posteriormente la bilis hacia la vesícula biliar y el duodeno.

Bilis

La bilis es un componente esencial de la circulación colehepática y enterohepática y se compone principalmente de agua (alrededor de un 95%) en la que se disuelven diversos componentes tanto endógenos como exógenos. El hígado humano puede llegar a secretar alrededor de un litro de bilis al día.

La bilis se forma mediante gradientes osmóticos que se generan por el transporte de solutos activos en el lumen de los canalículos biliares, y a través del arrastre de solvente, por el que tanto el agua como solutos pequeños ingresan en el espacio biliar de forma pasiva¹⁶. Dentro de los diversos componentes disueltos y excretados en la bilis encontramos:

- Sales biliares (primarias y secundarias)
- Pigmentos biliares cargados de bilirrubina (producto de degradación de la hemoglobina de glóbulos rojos reciclados en el bazo, que se conjuga en el hígado y se almacena en la vesícula biliar)
- Fosfolípidos (fosfatidilcolina principalmente)
- Colesterol (la bilis es su principal vía de eliminación)
- Péptidos y aminoácidos (glicina, cisteína, ácido glutámico)
- Vitaminas (D, E, K, A)
- Hormonas esteroideas, estrógenos, prolactina, insulina
- Porfirinas insolubles (protoporfirina, coproporfirina)
- Trazas metálicas (arsénico, cobre, manganeso, plomo, mercurio, selenio, plata, zinc)
- Electrolitos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- o HCO_3^-)
- Inmunoglobulina A y citoquinas inflamatorias (protección ante infecciones entéricas y estimulación del sistema inmunológico innato en el intestino)
- Fármacos exógenos, xenobióticos, toxinas ambientales

Árbol biliar

El árbol biliar se compone de un sistema de conductos por los que fluye la bilis desde los hepatocitos hasta la vesícula biliar, saliendo posteriormente de ella hacia el intestino (**Fig. 14**). Los colangiocitos, células que conforman el epitelio intrahepático del árbol biliar, son los encargados del flujo y la alcalinización de la bilis a lo largo del recorrido.

Los canalículos biliares son las ramas más pequeñas del árbol biliar, con una luz de aproximadamente $0.5 \mu\text{m}$, que rodean las cuatro caras de los hepatocitos de forma que la bilis es secretada directamente de los hepatocitos a ellos. El flujo biliar que se genera es de sentido contrario al flujo sanguíneo (**Fig. 7A**), es decir, la dirección del flujo biliar parte de la zona central del lóbulo hepático hacia los espacios porta, donde confluyen los canalículos biliares formando los conductillos biliares, también conocidos como colangiolos o conductos de Hering (con un diámetro luminal de entre 1.0 y $1.5 \mu\text{m}$)¹⁶. Estos conductillos biliares llevan a su vez la bilis hasta los ductos biliares interlobulillares que forman parte de la tríada portal. La unión de los distintos ductos biliares conforma los ductos hepáticos derecho e izquierdo que a su vez forman el ducto hepático común a la altura del hilio. A medida que las distintas ramas del árbol biliar confluyen, el grosor de éstas, diámetro luminal, va en aumento. El ducto hepático común conecta finalmente con la vesícula biliar

a través del colédoco, lo que permite tanto la entrada de la bilis en la vesícula como su salida de nuevo hacia la vía biliar dirección al duodeno (**Fig. 14**).

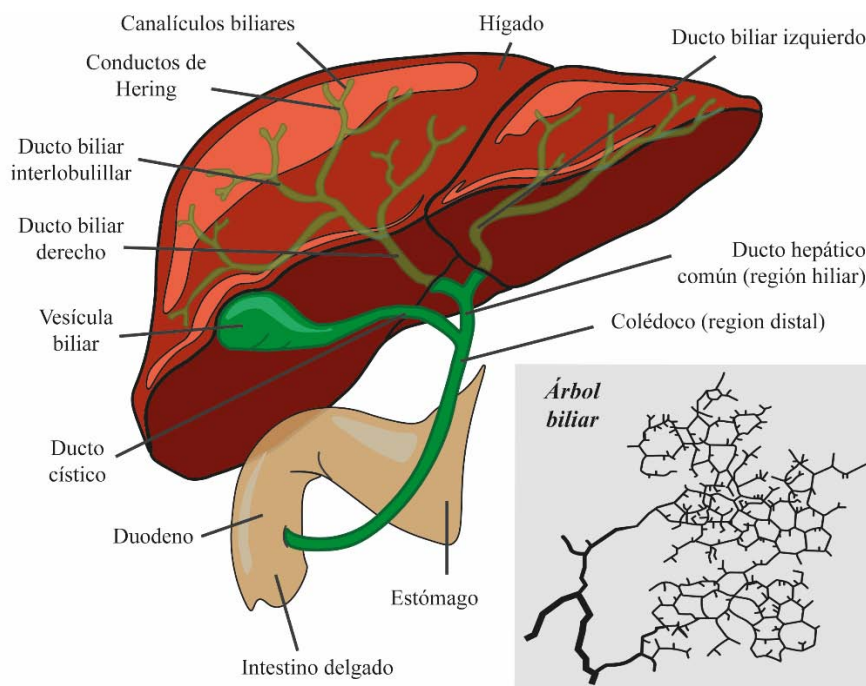


Figura 14. Árbol biliar.

Sistema de conductos por los que discurre la bilis desde los hepatocitos hacia la vesícula biliar y el intestino. El diámetro de los conductos va aumentando según el flujo biliar, siendo de menor tamaño los canaliculos biliares y de mayor tamaño el ducto hepático común.

Vesícula biliar

La vesícula biliar es un saco distensible con forma de pera que se encuentra ubicado en la superficie inferior del hígado y que puede albergar alrededor de 50mL de bilis en su interior en humanos. Se encuentra íntimamente unida al hígado mediante tejido conectivo, el cual contiene pequeñas venas y vasos linfáticos que los conectan entre sí. Asimismo, la vesícula biliar está conectada también con el ducto biliar común a través del ducto cístico conformando así el colédoco (**Fig. 14**).

En condiciones fisiológicas la vesícula biliar es capaz de manejar la mayor parte de la bilis secretada por el hígado y regular su salida al intestino. El hecho de que al salir del hígado la bilis se desvíe hacia la vesícula biliar o hacia el duodeno viene determinado por la resistencia relativa del flujo, la cual depende del estado contráctil de la vesícula y del esfínter del Oddi (válvula muscular que se encuentra en la salida del colédoco)²⁶. Esta regulación, además de hormonal, está relacionada con la digestión, de tal forma que durante el período inter-digestivo el gradiente de presión generado hace que alrededor del 90% de la bilis generada por el hígado sea almacenada y concentrada en la vesícula biliar.

1.1.2 Patogénesis de la fibrosis hepática.

La fibrosis hepática recibió muy poca atención hasta la década de los años 80, cuando las HSCs fueron identificadas como las principales células productoras de colágeno en el hígado. A partir de entonces el número de investigaciones centradas en el estudio de esta patología se ha ido incrementando.

La fibrosis es un proceso fisiopatológico dinámico de cierre de heridas que se caracteriza por una excesiva deposición de matriz extracelular (ECM, del inglés *Extracellular matrix*) y la formación de una cicatriz fibrosa.

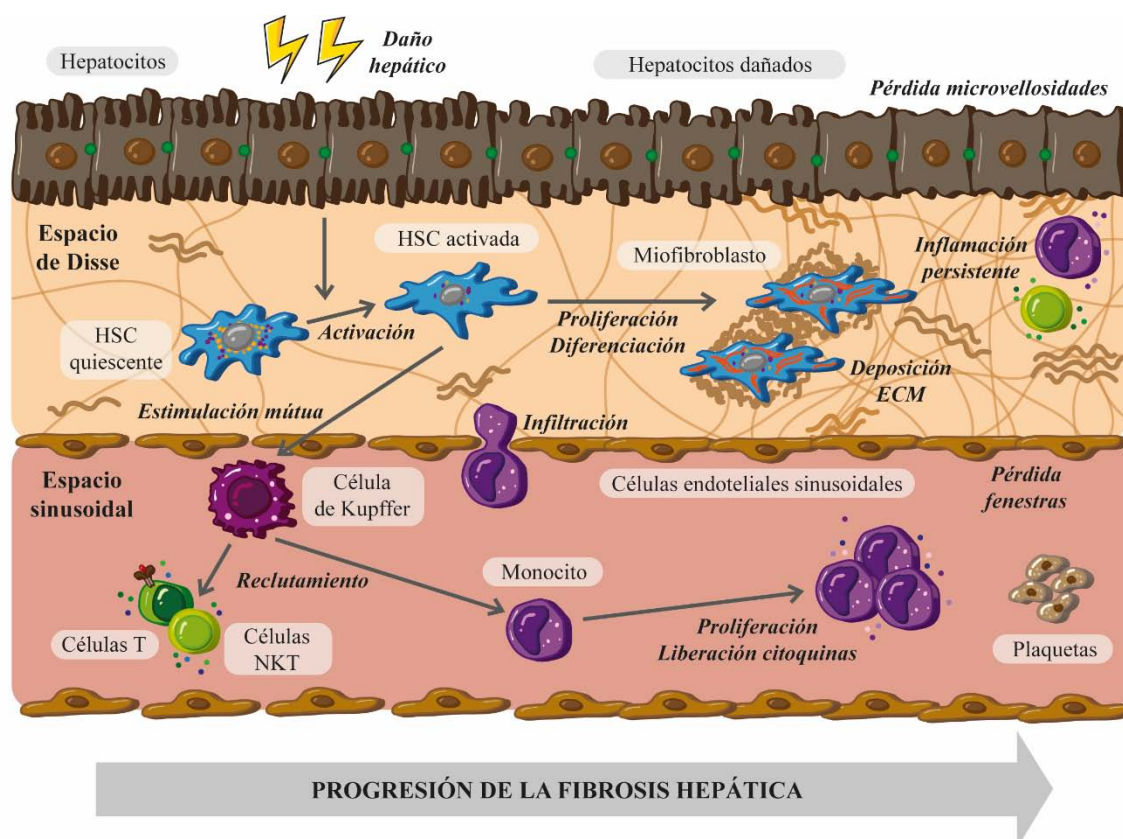


Figura 15. Patogénesis de la fibrosis hepática.

Tras el daño al tejido hepático se produce la activación de las HSCs, el reclutamiento de más células del sistema inmunitario (KCs, células T, NK, NKT, monocitos, plaquetas) y la diferenciación de las HSCs a miofibroblastos. A medida que la respuesta fibrogénica progresa, la inflamación persistente en el microambiente junto con la ECM generada por los miofibroblastos provocan la formación de cicatrices fibrosas haciendo que la distorsión del tejido hepático sea cada vez mayor y perdiendo así su correcta capacidad funcional.

Este proceso no es específico del hígado, sino que puede producirse en prácticamente cualquier órgano o tejido dando lugar a múltiples patologías. Entre las que existen rutas patogénicas comunes a pesar de desarrollarse en distintos órganos. Dentro de la respuesta fibrogénica (**Fig. 15**) se pueden distinguir cuatro fases, comenzando por el daño inicial al tejido, el hígado en este caso (fase 1), el cual desencadena una serie de respuestas que llevan a la activación de las células efectoras del proceso fibrogénico (fase 2). Estas células activadas son las encargadas de la síntesis de matriz extracelular (fase 3) para intentar reparar el daño inicial. Sin embargo, si no se produce una correcta

deposición de esta matriz y/o su reabsorción posterior es insuficiente (fase 4), el proceso fibrogénico acaba originando un daño mucho mayor que puede derivar en el fallo del propio órgano al no poder realizar sus funciones debidamente.

1.1.2.1 Fase 1: Generación del daño en el tejido hepático.

En órganos parenquimatosos como el hígado existen diversas causas que pueden conducir al daño hepático (**Fig. 16**). Estos agentes causales pueden ser agrupados en distintas categorías: dependiendo de la duración del daño y del tipo de células que se vean más severamente afectadas. De tal forma que se puede diferenciar entre daño hepático agudo o crónico, y hepatitis (que resulta principalmente en la muerte de hepatocitos) o colestasis (que da lugar a un drenaje biliar defectuoso). Y, dependiendo del tipo de agente dañino, se puede hablar de daño inducido por compuestos tóxicos, por hepatitis viral, por obstrucción biliar o de daños metabólicos, vasculares o mediados por el sistema inmunitario.

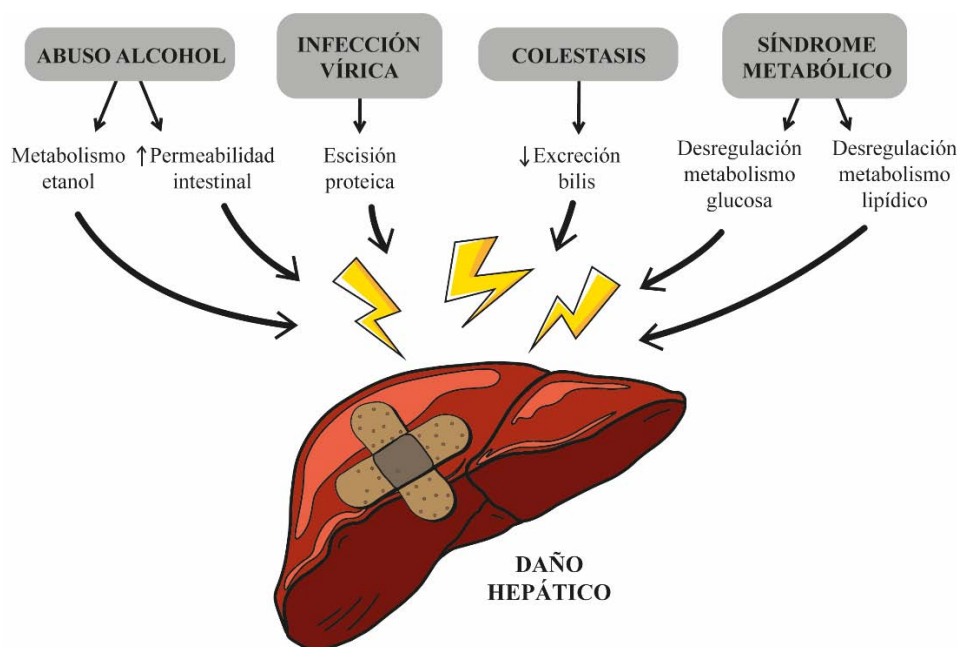


Figura 16. Causas de daño hepático.

El abuso de alcohol, las infecciones víricas, los procesos de colestasis o de desregulación metabólica son las principales causas de daño hepático que acaban desencadenando la respuesta fibrogénica.

Todos estos agentes hepatotóxicos provocan en los hepatocitos la pérdida de las microvellosidades e incluso su muerte celular (**Fig. 15**). La liberación de mediadores inflamatorios que actúan sobre las células del microambiente hepático, puede desencadenar la respuesta fibrogénica en el hígado mediante diversos eventos. Por ejemplo, la hepatitis vírica causa la activación de células T^{27,28}, con el consiguiente reclutamiento de otras células inflamatorias además de diversos mediadores, lo que conduce al desarrollo de la respuesta fibrogénica; mientras que el daño en los hepatocitos mediado por el alcohol genera una lesión inflamatoria clásica, con producción del factor de necrosis tumoral (TNF), que deriva en hepatitis y de nuevo en el desencadenamiento de la respuesta fibrogénica^{29,30}.

Por otro lado, las células epiteliales biliares y los hepatocitos dañados, debido a cualquiera de los agentes antes contemplados, son capaces de liberar citoquinas inflamatorias y factores solubles como TGF β 1 (factor de crecimiento transformante beta 1), TNF α e IGF³¹, que a su vez provocan la activación de las KCs y promueven el reclutamiento de células NKT y linfocitos T activados, lo que acentúa la respuesta fibrogénica. Es decir, distintos generadores de daño pueden hacer que los mismos o diferentes tipos celulares jueguen un papel, ya sea directa o indirectamente, en el desarrollo de la fibrosis.

1.1.2.2 Fase 2: Activación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica.

Los factores extrahepáticos, al igual que los diversos eventos celulares que se producen en el microambiente del tejido hepático dañado, inducen, ya sea de manera específica o independiente, la activación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica, los miofibroblastos (**Fig.15**).

Los miofibroblastos están ausentes en tejidos normales, pero durante la reparación tisular su activación transitoria contribuye a la restauración de la integridad del tejido. Existen diversas poblaciones celulares que pueden, en mayor o menor medida, ser considerados fuente de miofibroblastos durante la fibrosis hepática: las HSCs, los fibroblastos portales (PFs), las células epiteliales biliares y las células endoteliales (mediante la transición epitelio-mesénquima) o células reclutadas de médula ósea como las células estromales mesenquimales y los fibrocitos productores de colágeno³² (**Fig. 17**).

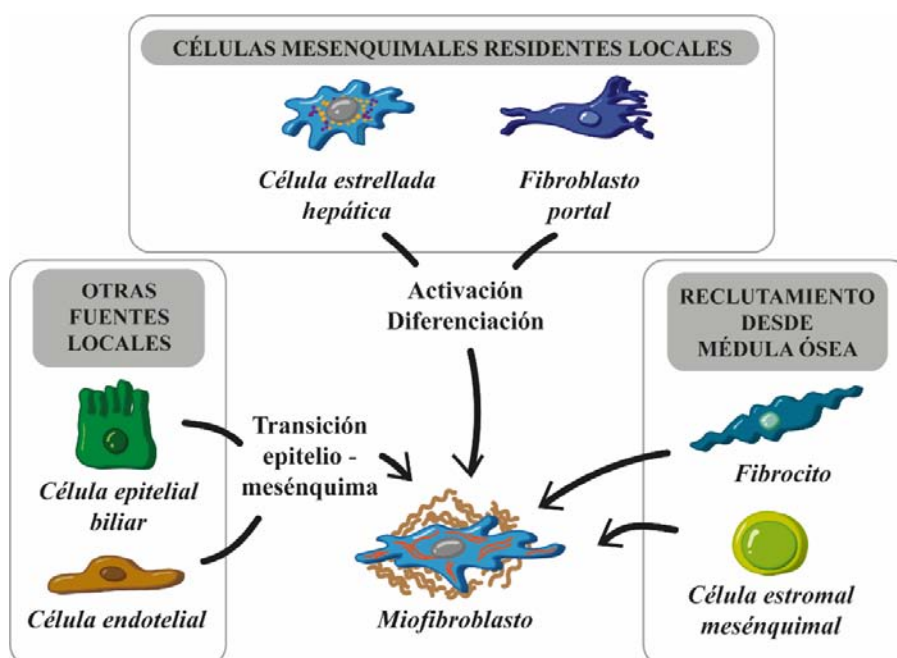


Figura 17. Tipos celulares fuente de miofibroblastos.

Las HSCs son consideradas la principal fuente de miofibroblastos en el hígado, sin embargo, existen otras fuentes: fibroblastos portales residentes, fibrocitos y células estromales mesenquimales reclutadas desde la médula ósea, y células epiteliales biliares y células endoteliales tras el proceso de transición epitelio – mesénquima.

Aunque potencialmente todos estas poblaciones celulares presentan la capacidad de activarse y diferenciarse a miofibroblastos, las HSCs son consideradas la principal fuente de miofibroblastos durante la fibrosis hepática. Diversos estudios en modelos de fibrosis hepática, como el modelo inducido por compuesto tóxico (CCl₄) o el modelo de ligación del ducto biliar, han mostrado que alrededor del 80% de los miofibroblastos eran derivados de HSCs. Los PFs también parecen ser una fuente importante de miofibroblastos ya que se ha observado que en modelos de daño colestático había una alta participación de estos fibroblastos en etapas tempranas de la respuesta fibrogénica^{33,34}.

- Células estrelladas hepáticas:

Son las principales células efectoras de la respuesta fibrogénica durante el daño hepático, y, por ello, en el apartado 1.1.3. de esta tesis doctoral serán descritas detalladamente.

- Fibroblastos portales:

Los PFs son una población de células fibroblásticas que rodean la vena porta para mantener la integridad del tracto portal. Primero fueron descritas como ‘células mesenquimales no relacionadas con sinusoides’, para posteriormente denominarse fibroblastos periductulares o fibroblastos portales/peroportales. Estos fibroblastos se asocian principalmente con la fase temprana de la respuesta a la lesión hepática colestática^{35,36}. Su contribución a la fibrosis hepática de diferente etiología aún no se comprende totalmente debido a la dificultad que presenta su aislamiento, sin embargo, se sabe que expresan marcadores como elastina, Thy1 (CD90) y ectonucleotidasa 2 (NTPDasa 2, del inglés *Ectonucleotidase 2*)³⁷, que no son expresados por las HSCs. De hecho, la expresión de NTPDasa 2 por parte de los PFs se ve regulada a la baja cuando se desarrolla una cirrosis de carácter biliar³⁸.

- Células generadas por la transición epitelio – mesénquima:

La transición epitelio – mesénquima (EMT) es el proceso biológico por el que una célula de carácter epitelial adquiere un fenotipo mesenquimal. Estas células, que normalmente interactúan con la membrana basal a través de su superficie basal, experimentan cambios bioquímicos que hacen que puedan asumir el fenotipo de célula mesenquimal con capacidad migratoria, invasividad, mayor resistencia a procesos apoptóticos y mayor producción de componentes de ECM³⁹. Con lo que las células epiteliales biliares (colangiocitos) y las células endoteliales hepáticas pueden presentar la capacidad de transformarse en miofibroblastos si la situación lo requiere⁴⁰, siendo TGFβ1 el inductor de EMT más potente de este proceso.

- Células derivadas de médula ósea

Existen dos posibles fuentes de miofibroblastos desde la médula ósea, las células estromales mesenquimales (MSCs) y los fibrocitos:

Por un lado, las MSCs se han propuesto como fuente de miofibroblastos en los tejidos lesionados a los que son reclutadas, aunque estudios recientes han demostrado su corta duración en estos tejidos³².

Y por otro, los fibrocitos, células CD34⁺ productoras de colágeno tipo I, son células mieloides derivadas de la médula ósea que en el tejido lesionado al que son reclutadas pueden diferenciarse en macrófagos o miofibroblastos liberando además diversos factores de crecimiento⁴⁰⁻⁴².

La activación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica consta de una fase de iniciación que conlleva la estimulación tanto paracrina (del resto de células del microambiente hepático) como autocrina (generándose bucles de retroalimentación) y una fase de perpetuación durante la cual las células ejercen diversas funciones en el tejido hepático iniciándose así la fase 3 de la respuesta fibrogénica.

1.1.2.3 Fase 3: Generación de la matriz extracelular.

Un evento central en el cierre de heridas es la fibrogénesis o producción de ECM (**Fig. 15**). Independientemente de la causa del daño hepático, tras él se genera una ECM de carácter provisional que permite el reclutamiento de células del sistema inmunitario, las cuales, junto con otros mediadores, promueven la proliferación y diferenciación de los miofibroblastos. Estos miofibroblastos activados se encargarán del reemplazo de la ECM provisional al aumentar su compactación y el enriquecimiento de esta en colágenos (principalmente tipo I, III y IV) y otras proteínas fibrosas que le aporten una mayor estabilidad.

1.1.2.4 Fase 4: Incorrecta deposición y/o reabsorción de la matriz extracelular.

Cuando el agente causante del daño desaparece y la herida en el tejido hepático ha sido reparada, se produce la resolución de la fibrosis dando por finalizado el proceso de generación de ECM. Si, por el contrario, la producción de ECM por los miofibroblastos no frena, el proceso de fibrosis continúa, conduciendo así al fallo hepático al no poder el hígado realizar sus funciones adecuadamente debido al exceso de cicatrices fibrosas.

Cuando la herida se ha cerrado, los miofibroblastos deben desactivarse, revertiendo a un estado pseudo-quiescente, o desaparecer a través de diversas vías como la apoptosis o la senescencia (fase de resolución)⁴³⁻⁴⁵. Sin embargo, fallos en la realización de estos procesos provocarían el mantenimiento de su estado activado generando por tanto más ECM de la necesaria.

También pueden darse errores en la síntesis de metaloproteinasas (enzimas encargadas de la degradación de la ECM) o de sus inhibidores, lo cual conduciría a una incorrecta reabsorción de la ECM generada.

1.1.3 Células estrelladas hepáticas.

Como ha sido mencionado previamente, a pesar de la heterogeneidad etiológica de la fibrosis hepática, de los mecanismos responsables de su desarrollo y de sus manifestaciones clínicas, numerosos estudios identifican la activación de los miofibroblastos como elemento celular común responsable en última instancia del reemplazamiento de tejido normal por tejido fibrótico no funcional. Dentro de los posibles orígenes de estos miofibroblastos (**Fig. 17**), las HSCs se consideran su principal fuente en el hígado.

Las HSCs fueron descritas por primera vez en 1876 por Karl Kupffer cuando investigaba la existencia de fibras nerviosas en el hígado⁴⁶. Durante su estudio identificó un grupo de células que mantenían contacto con los hepatocitos y la pared sinusoidal mediante prolongaciones que emergían de su cuerpo central y las denominó '*Sternzellen*' (células estrelladas en alemán). A partir de ese momento comenzaron a realizarse numerosos estudios sobre estas células de origen mesenquimal, creando cierta confusión al utilizar diferentes nombres dependiendo del campo de estudio de cada investigador, hasta que en 1996 se estandarizó el nombre como célula estrellada hepática en lugar de otros sinónimos como célula perisinusoidal, célula de Ito o célula almacén de grasa.

1.1.3.1 Localización.

Las HSCs son células residentes del tejido hepático que se encuentran distribuidas por el interior de los lóbulos en los espacios perisinusoidales de Disse, entre la superficie basolateral de los hepatocitos y la cara antiluminal de las células endoteliales sinusoidales, tal como se aprecia en la **Figura 9**. Este íntimo contacto entre las HSCs y las células vecinas facilita el transporte intercelular de citoquinas y otros mediadores solubles.

Teniendo en cuenta la presencia de otros tipos celulares en el microambiente hepático (hepatocitos, LSECs, KCs, células epiteliales de la vía biliar), las HSCs comprenden aproximadamente un tercio de las células no parenquimatosas⁴⁷, de tal forma que pueden llegar a suponer alrededor de 10% del número total de células residentes en un hígado normal (**Fig. 10**).

1.1.3.2 Estructura.

La estructura normal de las HSCs se basa en un cuerpo celular en forma de huso, con un núcleo ovalado central y con ramificaciones, o microproyecciones, que le permiten entrar en contacto con el resto de células vecinas y detectar señales quimiotácticas transmitiéndolas posteriormente al aparato mecánico celular para generar fuerzas contráctiles.

En el interior citoplasmático las HSCs presentan como orgánulos principales un pequeño aparato de Golgi y el retículo endoplasmático rugoso moderadamente desarrollado⁴⁸, lo cual indica una biosíntesis activa tanto de polipéptidos como de proteínas que luego son secretadas al espacio

extracelular. Además, se pueden encontrar lisosomas, endosomas y cuerpos vesiculares que contribuyen a la generación de gotas lipídicas llenas vitamina A en el interior citoplasmático, característica particular de las HSCs en su estado quiescente.

1.1.3.3 Funciones.

Las HSCs son de vital importancia para la función hepática, tanto en un hígado sano como en uno dañado, aunque no ha sido hasta la última década cuando se han estudiado en mayor profundidad sus funciones en estado no activado (**Fig. 18**).

En su estado quiescente, no activado, las HSCs actúan como almacén de ácido retinoico, metabolito de la vitamina A (retinol). Este almacenamiento en gotas citoplasmáticas es una característica única de las HSCs quiescentes, en las que se puede llegar a diferenciar hasta 2 tipos de gotas dependiendo del tamaño y localización intracelular de éstas. Sin embargo, esta capacidad de almacenamiento lipídico se va perdiendo gradualmente cuando se produce la activación y diferenciación de las HSCs a miofibroblastos⁴⁹ (**Fig. 19**).

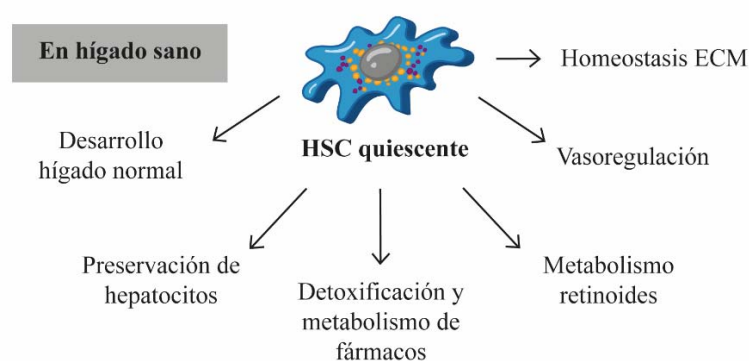


Figura 18. Funciones principales de las HSCs quiescentes.

Como principales marcadores de las HSCs en su estado quiescente se encuentran la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *Glial fibrillary acidic protein*), la sinaptofisina⁵⁰, el receptor p75 del factor de crecimiento nervioso (NGF p75, del inglés *Nerve growth factor receptor p75*) que además se ha visto implicado en la proliferación y apoptosis de los miofibroblastos⁵¹, y la desmina⁵².

Las HSCs quiescentes contribuyen al desarrollo y regeneración del tejido, promoviendo la maduración de progenitores hepáticos a través del contacto célula-célula y secretando citoquinas, quimioquinas o factores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular endothelial growth factor*), las neurotrofinas, la endotelina o la pleiotropina⁵³. Además, estudios *in vitro* muestran la capacidad de las HSCs para expresar el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, del inglés *Hepatocyte growth factor*) cuando se encuentran en su estado quiescente, capacidad que pierden al activarse⁵⁴.

Aunque las HSCs no presentan expresión de citocromo P450-2E1, sí la tienen de deshidrogenasas tanto alcohólica como acetaldehídica, y de otras formas de citocromo P450⁵⁵, lo cual hace que puedan contribuir en la desintoxicación de compuestos dañinos para el hígado (si bien su contribución no es tan marcada como la de los hepatocitos).

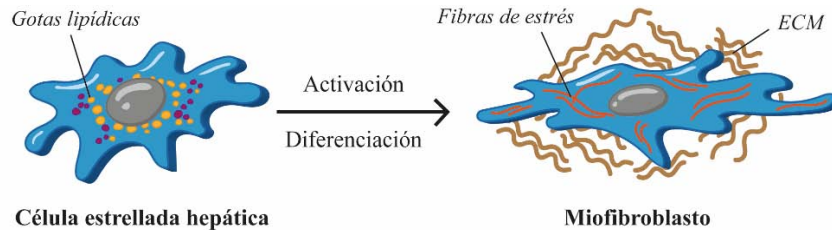


Figura 19. Pérdida de gotas lipídicas tras activación y diferenciación de HSCs.

Asimismo, las características ultraestructurales y fisiológicas de las HSCs son similares a las de los pericitos en otros órganos, lo que sugiere que las HSCs pueden funcionar como pericitos específicos del hígado. De hecho, tanto su ubicación anatómica como su capacidad para contraerse y relajarse en respuesta a mediadores vasoactivos sugiere que las HSCs pueden desempeñar un papel importante en la modulación de la resistencia vascular intrahepática y en el flujo sanguíneo a nivel sinusoidal (**Fig. 20**). Estudios de microscopía *in vivo* han revelado que la infusión del factor endotelina-1 (ET-1) en la vena porta parece promover una marcada disminución del diámetro sinusoidal y un aumento del gradiente de presión, siendo esta constricción significativa en las zonas donde se encuentran HSCs pero no KCs, de tal forma que las HSCs parecen estar mediando en la constricción sinusoidal^{56, 57}.

Mientras que en un hígado normal (**Fig. 20 izda.**), la producción de vasoconstrictores como la ET-1 y de vasodilatadores como el monóxido de nitrógeno (NO) se mantiene en equilibrio: en el sinusoide las HSCs producen poco o nada de ET-1 pero la producción de NO por parte del endotelio es normal; cuando se produce una lesión en el tejido hepático (**Fig. 20 dcha.**), la síntesis de ET-1 por parte de las HSCs activadas aumenta a la par que la producción de NO por las células endoteliales sinusoidales se reduce, conduciendo a una endotelio patía hepática⁵⁸.

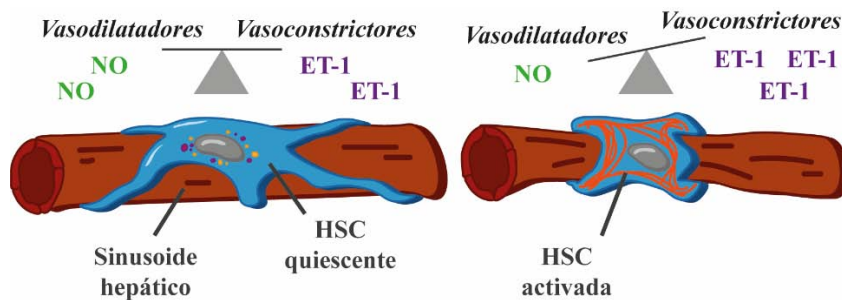


Figura 20. Capacidad vasoreguladora de las HSCs.

Las HSCs activadas tienen la maquinaria necesaria para contraerse y relajarse en respuesta a una serie de sustancias vasoactivas. Derecha: Hígado normal con expresión de vasodilatadores y vasoconstrictores en equilibrio; Izquierda: Hígado dañado, vasoconstricción del sinusoide hepático.

Múltiples y variados estímulos contribuyen a la inducción y mantenimiento del estado de activación de las HSCs. Entre estos estímulos, de carácter tanto paracrino como autocrino, podemos encontrar citoquinas, péptidos y la propia ECM.

1.1.3.4 Proceso de activación de las HSCs.

La activación de las HSCs es un proceso complejo que puede dividirse en una fase de iniciación seguida de una fase de perpetuación. La resolución de la activación de las HSCs es considerada por muchos investigadores la tercera fase del proceso, siendo esta asociada a la propia resolución de la fibrosis hepática.

Fase de Iniciación:

La fase de iniciación se considera la etapa inicial en la se producen cambios fenotípicos en las HSCs de carácter paracrino, es decir, provenientes de otras poblaciones celulares como los hepatocitos, las KCs, las LSECs, las plaquetas las células del sistema inmunitario y de cambios en la propia matriz extracelular que las rodea (**Fig. 21**). A continuación, se van a recoger algunas de las células y estímulos más importantes que convergen sobre las HSCs y promueven su activación:

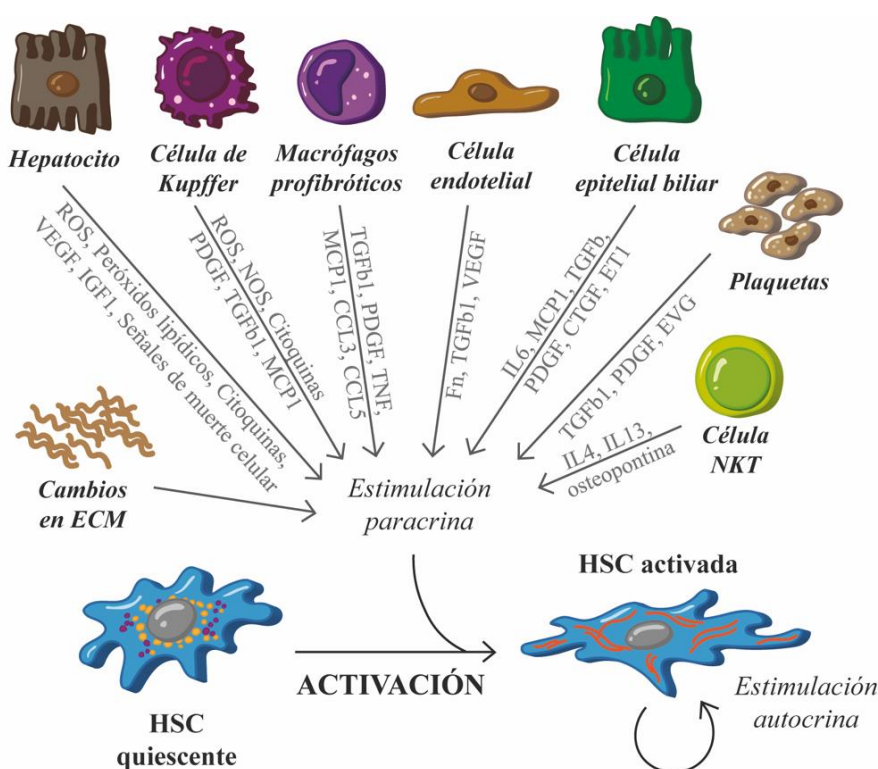


Figura 21. Estimulación paracrina y autocrina durante fase de iniciación.

Durante la activación las HSCs reciben estímulos de diversos elementos del microambiente celular al igual que se genera un bucle de retroalimentación autocrino al liberar ellas mismas factores que mantienen su estado de activación.

- Hepatocitos:

El estrés oxidativo tiene un papel claro en la activación de las HSCs. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por los hepatocitos dañados, o generados por el citocromo P450-2E1 al

procesar xenobióticos como el etanol^{29,59}, conllevan señales paracrinas de activación para las HSCs. Tras la lesión, estos hepatocitos dañados generan y liberan a su vez una importante cantidad de peróxidos lipídicos y cuerpos apoptóticos que inician el proceso de activación de las HSCs a través de Fas y TRAIL^{53,60}. Esta contribución de los cuerpos apoptóticos en la activación de las HSCs es independiente de la respuesta inflamatoria.

La muerte hepatocitaria provoca además la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs)⁶¹, cuerpos apoptóticos y de citoquinas como IL-33 (que a su vez activa y expande a las ILCs)⁶², IL-20 (citoquina de la familia de IL-10 que activa las HSCs quiescentes y regula al alza la expresión de TGFβ)⁶³, IL-17 (que puede directamente inducir la producción de colágeno tipo I por las HSCs activando la ruta de señalización del transductor de señal y activador de transcripción 3, STAT3)⁶⁴ que promueven la activación de las HSCs, tanto directa como indirectamente^{65,66}.

- Macrófagos:

Las KCs activadas facilitan a su vez la activación de las HSCs ya que son una fuente importante de mediadores inflamatorios (citoquinas, ROS, óxido nítrico, eicosanoides, quimioquinas, enzimas lisosomales y proteolíticas)⁶⁷. Estas células también liberan otros elementos como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés *Platelet derived growth factor*), TGFβ1 o la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP1, del inglés *Monocyte chemoattractant protein 1*), que influyen directamente sobre las HSCs activándolas. Otro mecanismo por el que pueden inducir el cambio fenotípico en las HSCs es a través de la producción de gelatinasas (tipo de metaloproteinasas de ECM)⁶⁸ ya que se ha demostrado que las proteínas de matriz extracelular juegan un papel crucial en el mantenimiento de la función normal de los hepatocitos y de las HSCs.

Sin embargo, hay que tener presente que en el hígado existen más poblaciones de macrófagos además de las KCs. En el tejido hepático también se pueden encontrar otros macrófagos hepáticos y macrófagos derivados de monocitos (monocitos derivados de médula ósea, que tras recibir señales de daño e inflamación migran al tejido hepático y se diferencian en macrófagos). Los macrófagos juegan un papel tanto en la inducción de la fibrogenesis como en su resolución: los monocitos reclutados se pueden dividir a su vez en al menos dos subgrupos, unos de carácter pro-inflamatorio y otros considerados como ‘macrófagos alternativos’ que moderan la respuesta inflamatoria y promueven la degradación de la matriz fibrótica. Asimismo, los macrófagos hepáticos producen citoquinas y quimioquinas que influyen directamente en la activación de las HSCs, encontrándose entre ellas TGFβ, PDGF, TNF, IL1b, MCP1, CCL3 (proteína inflamatoria de macrófagos) y CCL5 (RANTES)^{66,69-71}. Sin embargo, los macrófagos también han sido reconocidos como elementos clave en la resolución de la fibrosis siendo fuente de metaloproteinasas fibrolíticas como MMP12 y MMP13, y de elementos promotores de la apoptosis de las HSCs como TRAIL.

- Células endoteliales sinusoidales:

Al formar el revestimiento vascular de los sinusoides hepáticos, las LSECs juegan un papel vital durante las primeras etapas de la respuesta fibrogénica. A través de la secreción de fibronectina y la activación de la forma latente de TGF β inducen la activación de las HSCs al igual que modulan la respuesta inflamatoria mediante variedad de mediadores⁵³. Además, las LSECs liberan el factor VEGF que induce tanto la proliferación de las HSCs como el proceso de angiogénesis en el parénquima hepático dañado⁶⁶. Este factor también es secretado por las propias HSCs de forma autocrina.

- Células epiteliales biliares:

Las células epiteliales biliares, también denominadas colangiocitos, además de contribuir en el desarrollo de la fibrosis hepática a través de la transición epitelio – mesénquima, son fuente de TGF β 1, del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF, del inglés *Connective tissue growth factor*), MCP1, PDGF, IL-6 y ET-1, que como ya se ha comentado previamente, son factores activadores de HSCs^{66,72}.

- Plaquetas:

Las plaquetas también participan en la activación paracrina de las HSCs mediante la liberación de factores como TGF β 1, PDGF o el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *Epidermal growth factor*)⁶⁵.

- Células NKT:

Aunque la participación de estas células se ve más implicada en la resolución de la fibrosis hepática al matar las HSCs activadas, apoptóticas y senescentes; una subpoblación de células NKT son capaces de producir IL4, IL13, osteopontina y ligandos ‘erizo’, que promueven la activación de las HSCs y la fibrosis hepática vía CXCR6-CXCL16 en enfermedades hepáticas crónicas como la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, del inglés *Non alcoholic steatohepatitis*)⁷³.

- Matriz extracelular:

La deposición progresiva de proteínas de ECM en el espacio de Disse conduce a una mayor densidad y rigidez de la ECM, como se verá más detalladamente en el apartado 1.1.4. Estos cambios en la composición y la rigidez de la ECM también promueven la activación de las HSCs, lo que sugiere un bucle de retroalimentación donde los cambios mediados por las HSCs en la ECM impulsan aún más su propia activación⁵³.

- HSCs:

Las propias HSCs son capaces de inducir su propia activación de forma autocrina. La autofagia realizada por las HSCs, durante la cual generan ácidos grasos por la escisión de los ésteres de

retinilo en el interior de las gotas citoplasmáticas, conduce a su activación. Señales de estrés del retículo endoplásmico de las HSCs se han visto relacionadas con un aumento de la autofagia y la activación de estas células⁶⁶.

- Otros:

Otros eventos como el aumento de la permeabilidad epitelial intestinal pueden derivar en la activación de las HSCs debido una mayor translocación de metabolitos derivados de bacterias, como el lipopolisacárido LPS que estimula tanto la activación de las HSCs⁷⁴ como de las KCs a través de los receptores tipo Toll (TLR, del inglés *Toll like receptor*)⁶⁶.

Fase de Perpetuación:

Si el daño en el tejido hepático se mantiene, tras el inicio de la activación de las HSCs existen elementos que perpetúan este estado activado provocando su diferenciación en miofibroblastos. Otros eventos lo que hacen es evitar la depuración o muerte de estas células, como por ejemplo la capilarización, caracterizada por la pérdida de la capacidad de diferenciación de las LSECs tras el daño hepático, que atenúa supresión de las HSCs activadas. Las ROS, producidas por hepatocitos y macrófagos, inician también procesos posteriores como la síntesis de osteopontina que induce a su vez la síntesis de colágeno y perpetúa la activación de las HSCs^{53,59}.

El desarrollo y mantenimiento de esta fase implica de nuevo bucles de estimulación tanto paracrinos como autocrinos ya que, como se mencionó previamente, una vez activadas, las HSCs producen diversos factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y péptidos vasoactivos que pueden tener efectos pleiotrópicos en el medio local y efectos autocrinos sobre las propias HSCs⁷⁵.

La fase de perpetuación se compone de varios tipos de respuesta por parte de las HSCs entre los que se incluyen la proliferación, la contractilidad, la fibrogénesis, la degradación de ECM, la quimiotaxis y la inducción de la infiltración inflamatoria (**Fig. 22**). De tal forma que el efecto final en conjunto de todos estos procesos es un aumento en la acumulación de ECM.

- Proliferación:

Tras un daño en el tejido hepático, se produce la expansión de las HSCs. Esta proliferación es un componente importante en la cascada de activación ya que amplifica la respuesta fibrogénica mediada por las HSCs tras el daño. Diversos mitógenos han sido relacionados con la proliferación de estas células, como PDGF, EGF, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés *Fibroblast growth factor*), ET-1, la trombina o el TGF α ⁷⁵⁻⁸¹. Sin embargo, el PDGF es considerado el factor mitogénico de HSCs más potente⁷⁸.

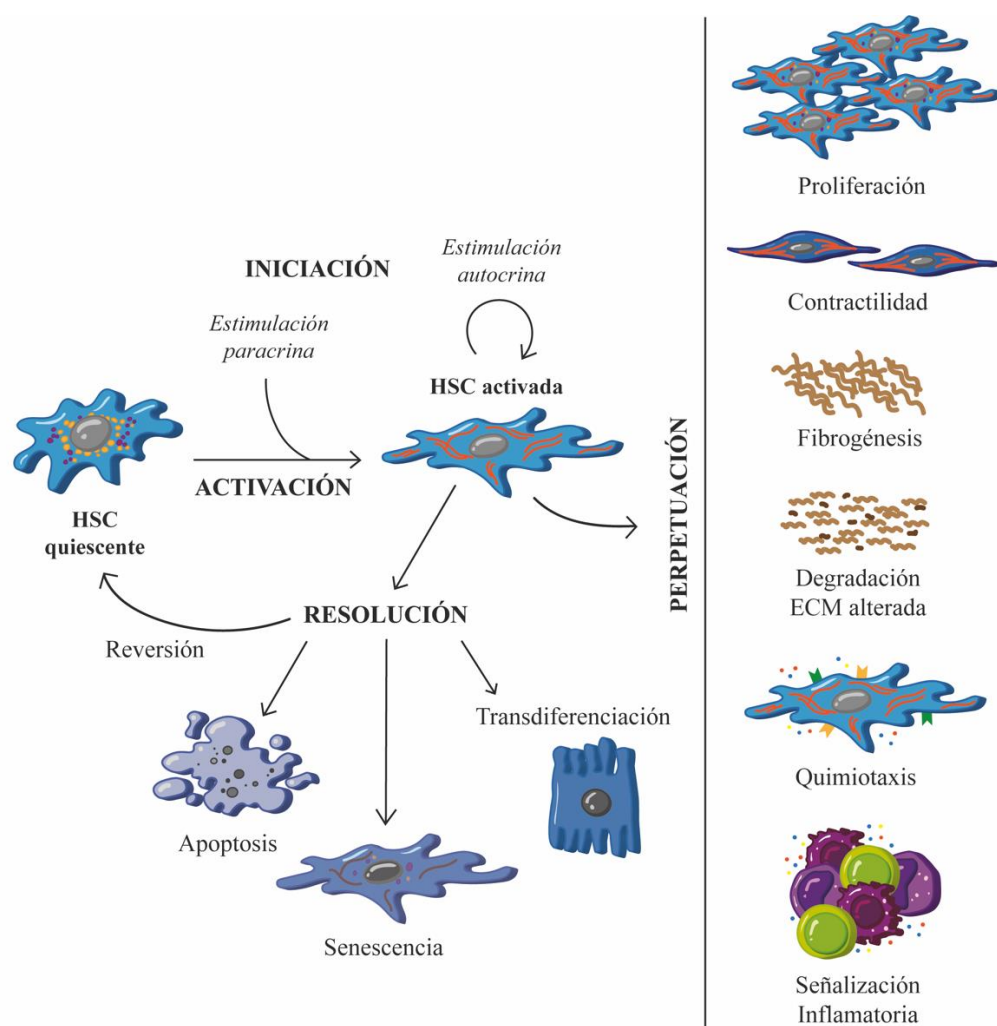


Figura 22. Fases de iniciación, perpetuación y resolución de la activación de las HSCs.

Las HSCs pueden ser activadas mediante estimulación tanto paracrina como autocrina en una primera fase (iniciación) y mantenerse en ese estado activado (perpetuación) durante el cual son capaces de proliferar, contraerse, producir y degradar ECM, atraer a otras células, incluyendo células del sistema inmunitario, y detectar y responder ante quimioatrayentes del microambiente. El número de HSCs activadas puede disminuir durante la fase de resolución mediante la apoptosis o la senescencia principalmente, pero también revertiendo a un estado inactivo o pudiendo transdiferenciarse a otro tipo celular bajo determinadas circunstancias.

- Contractilidad:

La capacidad de contraerse de las HSCs puede ser un factor determinante en el aumento, tanto temprano como tardío, de la resistencia portal durante la fibrosis hepática. Durante la activación de las HSCs se produce la regulación al alza de muchas proteínas que son características de células contráctiles como la actina α o las miosinas de músculo liso, lo cual es característico de los miofibroblastos en general (apartado 1.1.3.5 de esta tesis doctoral).

La adquisición de un fenotipo contráctil durante la activación de las HSCs ha sido documentada tanto en cultivo como *in vivo* y esta mediada en parte por receptores que interactúan con la ECM. Además, como ya se describió previamente, la contracción de estas células parece deberse también a factores como la ET-1, los prostanoides, la sustancia P, la angiotensina II y la vasopresina arginina (**Fig. 20**). Tal como ya se explicó, la capacidad de contracción puede ser contrarrestada

por el compuesto vasodilatador NO, que puede derivarse de las propias HSCs o del endotelio sinusoidal junto con el monóxido de carbono (CO) y la adrenomedulina que inducen la relajación⁷⁵.

PDGF

Factor de crecimiento derivado de plaquetas. Es un mitógeno crítico en el hígado y un quimioatrayente que conduce a la proliferación y a la migración de las HSCs. Tras el daño hepático y durante el inicio de la activación de las HSCs se produce una rápida inducción tanto del ligando PDGF como de su receptor (PDGFR β), mejorando las respuestas inflamatorias y fibrogénicas.

Se ha demostrado un aumento de la expresión de PDGF en células que también expresan PDGFR tras un daño, tanto agudo como crónico, en el tejido hepático en modelos experimentales y durante enfermedades hepáticas en humanos. La síntesis y liberación de PDGF se mantiene principalmente por las células biliares proliferativas.

Aunque las HSCs son capaces de expresar tanto los receptores α como β , sólo se ha observado la regulación al alza del receptor PDGFR β durante la activación de las HSCs tanto *in vitro* como *in vivo*. Mediante experimentos con HSCs cultivadas, se demostró que sólo la unión de este mitógeno al receptor β daba como resultado la activación de las vías de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (ERK/MA-PK) y de la proteína quinasa B (AKT/PKB) de la ruta de la fosfoinositol 3 - quinasa (PI3K), provocando la proliferación de las HSCs.

- Fibrogénesis:

Las HSCs generan fibrosis no sólo a través del aumento de número de células sino también aumentando la capacidad de generar ECM por célula. El estímulo más potente para inducir en las HSCs la producción de colágeno tipo I y de otros constituyentes de la matriz es el TGF β . Este factor es producido por las KCs, las LSECs, los hepatocitos, las células epiteliales de los conductos biliares y por las propias HSCs de forma autocrina. Existen tres ligandos de TGF β , sin embargo, TGF β 1 es el más estudiado en el contexto de la fibrosis^{82, 83} (**Fig. 23**):

Otro potente factor fibrogénico es CTGF/CCN2. Aunque cuando se descubrió recibió el nombre de CTGF, no se comporta como un factor de crecimiento tradicional, sino que lo hace más como una proteína matricelular que modula la interacción entre células y ECM para modificar el fenotipo celular^{84, 85}. Mientras que los niveles hepáticos de CTGF suelen ser bajos, se producen niveles elevados en pacientes con fibrosis hepática y en modelos animales experimentales de fibrosis hepática⁸⁶.

Productos de la peroxidación lipídica también están siendo estudiados como estímulos promovedores de la producción de ECM siendo sus efectos amplificados por la pérdida de la capacidad antioxidante de las HSCs a medida que se activan⁴⁹.

TGFβ1

Factor de crecimiento transformante beta 1. TGFβ1 está considerado como la citoquina fibrogénica y proliferativa más potente. Diversas células implicadas en la respuesta fibrogénica expresan este factor en respuesta al daño hepático. Entre ellas se encuentran las propias HSCs que secretan su forma latente de forma que se produce un bucle de retroalimentación positiva de carácter autocrino.

TGFβ1 se secreta con un propéptido asociado a la latencia (LAP) que se escinde intracelular pero permanece unido de forma no covalente. Esta forma biológicamente latente, L-TGFβ1, se almacena tras su liberación dentro de la ECM a través del factor de unión a L-TGFβ1 (LTF). Tras la escisión de LTF, TGFβ1 se convierte en su forma biológicamente activa y puede unirse a sus receptores transmembrana tipo I y tipo II.

El TGFβ1 se une a su receptor heteromérico compuesto por los receptores TGFβRI y TGFβRII, que activan la vía canónica (a través de las proteínas SMAD) o cascadas de señalización no canónicas:

En la vía canónica, SMAD2/3 es fosforilado por TGFβRI, lo que permite la formación de complejos al unirse SMAD4 y finalmente la transcripción de genes profibrogénicos tras la traslocación del complejo al núcleo.

La señalización no canónica funciona a través de TGFβRII activado. Este receptor recluta factores intermedios que activan varias cascadas de señalización aguas abajo incluyéndose entre ellos las proteínas MAPK, Rho-GTPasa-Actina, PI3K/ (AKT/PKB) y el factor asociado al receptor TNF (TRAF).

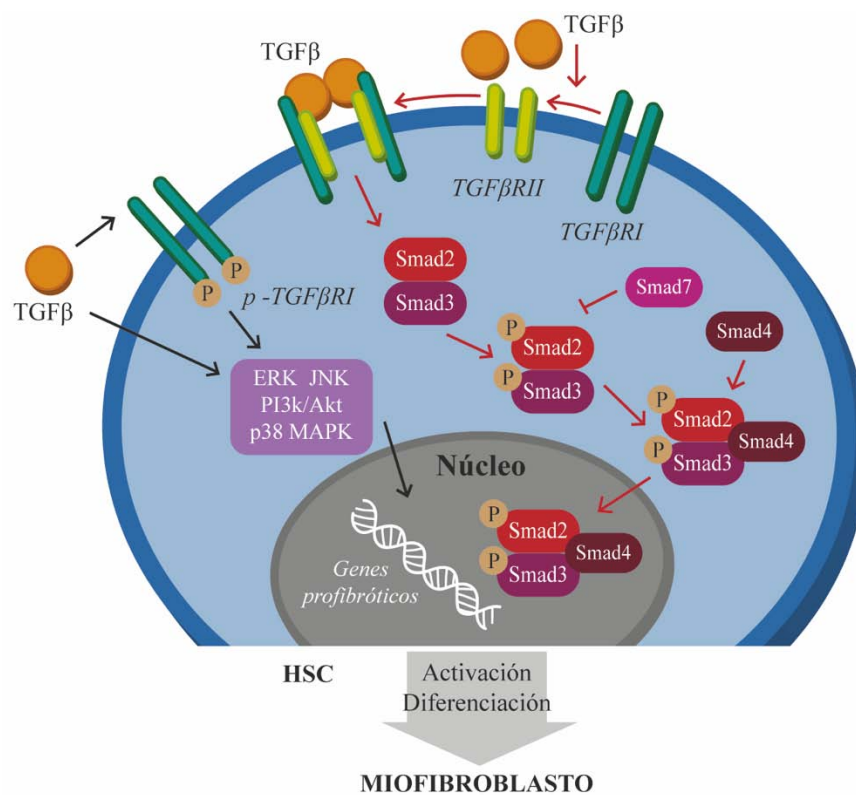


Figura 23. Rutas de activación de HSCs mediante estimulación con TGFβ .

Vía de señalización canónica de TGFβ a través de la familia de proteínas Smad y vía no canónica, independiente de las proteínas Smad, a través de ERK, JNK, PI3k/Akt, p38, MAPK.

CTGF

Factor de crecimiento de tejido conectivo. CTGF es un mediador central de la remodelación tisular y la fibrosis: Su presencia induce la formación de miofibroblastos a través de la transdiferenciación de otras células, incluidas las HSCs, las células epiteliales (a través de EMT, transición epitelial a mesenquimatosas), los fibroblastos portales residentes o fibrocitos (médula ósea- células madre mesenquimales circulantes derivadas). Además, CTGF interactúa con diversas citoquinas y factores de crecimiento como IGF1, VEGF, TGF β , y proteínas de matriz como la fibronectina o los proteoglicanos. Esta capacidad de modulación afecta a las capacidades de las HSCs en relación a la adhesión y migración celular, la permeabilidad vascular, la activación y diferenciación a miofibroblastos y la deposición y remodelación de ECM, lo cual se traduce en una importante remodelación del tejido hepático.

Si la remodelación tisular ocurre en la vasculatura del tejido, la hipertensión local puede inducir la expresión de CTGF, creándose así un bucle de retroalimentación positiva que conduce a una mayor remodelación tisular. La inducción de la expresión de TGF β y VEGF por parte de CTGF genera otro bucle al inducir estos una mayor expresión de CTGF.

- Degradación de la matriz:

El mantenimiento de las proteínas de ECM en el hígado fibrótico se debe a la interacción entre las metaloproteinasas (MMPs) y los inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs). Las MMPs pueden clasificarse en cinco categorías basadas en las especificidades de sus sustratos: a) colagenasas intersticiales (MMP1, 8 y 13); b) gelatinasas (MMP2, 9 y la proteína de activación de fibroblastos); c) estromelinas (MMP3, 7, 10, 11); d) tipo membrana (MMP14, 15, 16, 17, 24, 25); e) metaloelastasa (MMP12).

Las HSCs son fuente de MMP12, 9 y 13 (esta última tiene su equivalente en roedores bajo el nombre de MMP1)⁴⁹. MMP1 es la principal proteasa degradante de colágeno tipo I (principal colágeno del hígado fibrótico). Las HSCs son también fuente de TIMP1 y 2, y la producción sostenida de estas proteínas durante la lesión hepática podría inhibir la actividad de las colagenasas intersticiales, lo que conduce a una degradación reducida de la matriz de acumulación durante la lesión del tejido hepático. Además, TIMP1 ejerce función antiapoptótica sobre las HSCs lo que promueve su expresión mantenida durante la lesión hepática y, por tanto, aumenta la población de HSCs activadas al evitar su eliminación^{49,87,88}

- Quimiotaxis:

Las HSCs activadas se caracterizan por la producción de quimioquinas que promueven la migración de células madre hematopoyéticas activadas al lugar de la lesión, lo que estimula la respuesta inflamatoria. Quimioquinas como el PDGF, MCP1 o el receptor de quimioquinas CXCR3^{65,89}, participan en la quimiotaxis celular ejercida por las HSCs.

Por otro lado, las propias HSCs pueden migrar hacia los elementos quimioatrayentes que se encuentran en las zonas de la lesión. Las HSCs activadas son también fuente de citoquinas proinflamatorias que se comportan como quimioatrayentes de células del sistema inmunitario que participan en la respuesta inflamatoria.

Fase de Resolución:

Durante la resolución del proceso fibrogénico, el número de miofibroblastos y de HSCs activadas se reduce drásticamente. Esta disminución puede producirse a través de varias vías entre las que se encuentran la apoptosis, la senescencia, la reversión a un estado inactivo (pseudo-quiescente) e incluso una posible transdiferenciación a otro tipo celular^{43-45,90,91} (**Fig. 22**). Varios elementos del microambiente celular ejercen sus funciones antifibróticas actuando sobre estas vías. Las células NK muestran sus propiedades antifibróticas induciendo la muerte de las HSCs activadas a través del interferón ($IFN\gamma$) y también la apoptosis de las HSCs mediante la expresión de ligandos receptores de muerte como TRAIL y FASL^{66,92,93}. De forma similar, las células NKT también ejercen su papel antifibrótico matando directamente las HSCs activadas o a través de la producción de $IFN\gamma$.

- Reversión

Hasta hace poco, esta vía sólo se había podido demostrar en cultivo, pero recientes estudios de rastreo del linaje celular genético en ratones han demostrado que las HSCs activadas pueden revertirse a un estado similar a la quiescencia tras la retirada de los agentes dañinos⁶⁶. Alrededor de la mitad de las HSCs activadas que escapan al proceso de apoptosis durante la resolución de la fibrosis hepática llegan a adquirir este fenotipo inactivo.

Sin embargo, este estado no es de total quiescencia ya que, a pesar de la reversión, estas células están sensibilizadas a la reactivación por exposición a estímulos fibrogénicos⁷³. De hecho, estas células presentan una mayor capacidad de reactivación en comparación con aquellas que nunca lo han hecho. Mientras que las HSCs revertidas regulan a la baja la expresión de genes fibrogénicos como la cadena $\alpha 2$ colágeno tipo I (*Colla2*), la actina $\alpha 2$ (*Acta2\alpha*), *Tgfb1* y *Timp1*, no vuelven a expresar genes asociados al estado quiescente como Gfap o el receptor 1 de la adiponectina (*Adipor1*)^{45,94}.

- Apoptosis

La apoptosis es el proceso de muerte celular programada de forma que se eliminen las células que ya no son necesarias o que han sido dañadas irreversiblemente.

Las HSCs activadas expresan receptores de muerte que incluyen FAS (CD95), el receptor 1 de TNF, y los receptores de p75NTR y TRAIL^{66, 94}, que estimulan su apoptosis. Algunas poblaciones

pueden contribuir durante este proceso, células como las NK provocan apoptosis a través de TRAIL y del receptor NKG2D, mientras que otras como las KCs pueden inducirla a través de un mecanismo mediado por caspasa 9⁵³.

Sin embargo, citoquinas proinflamatorias como TNF e IL1 β , el factor TGF β o TIMP1, promueven la resistencia de las HSCs al proceso de apoptosis⁶⁶, lo que promueve el mantenimiento de la respuesta fibrogénica por parte de estas células.

- Senescencia

La senescencia natural es un mecanismo fisiológico controlado genéticamente que restringe la división celular dentro de una capacidad proliferativa finita para prevenir la acumulación de células dañadas genéticamente.

El proceso de senescencia en las HSCs da como resultado una expresión reducida de las proteínas de ECM, un aumento de la expresión de las MMPs y la regulación positiva de los genes implicados en la vigilancia inmunitaria como ligando para el receptor NKG2D de las células NK^{66,91}. Estudios recientes han establecido que las HSCs pueden entrar en senescencia vía dependiente de p53, tanto en cultivo como *in vivo*, volviéndose éstas más inflamatorias que fibrogénicas⁹¹.

- Transdiferenciación

En algunos estudios *in vivo* recientes en los que se han utilizado técnicas de reprogramación han observado la capacidad de las HSCs activadas para transdiferenciarse en células no fibrogénicas tipo hepatocitos, denominados como hepatocitos inducidos (iHep)⁹⁵.

1.1.3.5 Miofibroblastos.

Los miofibroblastos son la forma activada y diferenciada de las células efectoras de la respuesta fibrogénica, principalmente HSCs en el caso del tejido hepático, que se caracteriza por una abundante expresión de proteínas de matriz pericelular⁹⁶ (**Fig. 24**). Aunque, como ya se ha descrito previamente, pueden tener orígenes heterogéneos (**Fig. 17**), su desarrollo sigue una secuencia de eventos bien establecida.

En condiciones normales, en el tejido hepático el número de células efectoras es bajo, con baja producción de ECM y no existe un contacto estrecho tipo célula-célula y célula-ECM. Cuando se produce la lesión tisular, se produce la activación de las HSCs que proliferan y migran a la zona dañada debido a las citoquinas liberadas localmente por células tanto residentes como inflamatorias infiltrantes (**Fig. 15**).

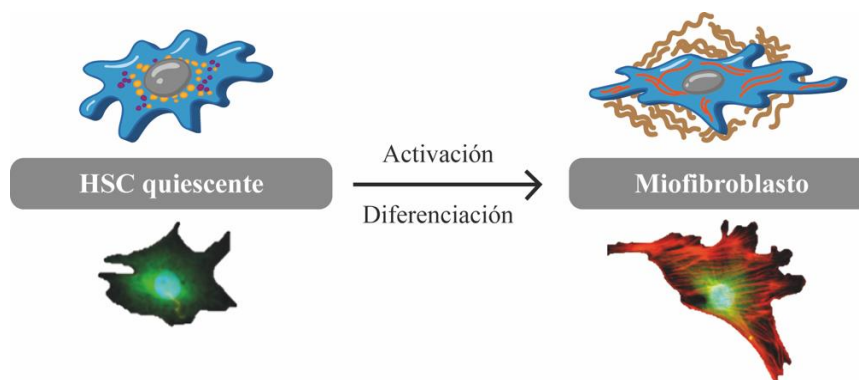


Figura 24. Activación y diferenciación de las HSCs a miofibroblastos.

Al activarse y diferenciarse las HSCs pierden las gotas lipídicas características de su estado quiescente y aparecen fibras de estrés que les confieren una potente capacidad de contracción. Abajo: Imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia indirecta de HSCs primarias murinas (Azul: Dapi - núcleo. Verde: GFAP - marcador de HSCs. Rojo: α SMA - fibras de estrés características de miofibroblasto completamente activado).

Otro estímulo importante para generar la transición fenotípica de las HSCs es el cambio en el microambiente mecánico⁹⁷. En un hígado sano, las HSCs se encuentran generalmente protegidas del estrés mecánico gracias a la reticulación de la ECM en equilibrio. Sin embargo, esta estructura se pierde al verse la ECM continuamente remodelada en respuesta a la lesión. Debido a este estrés mecánico, las HSCs adquieren fibras de tensión contráctiles que se componen primero de actinas citoplasmáticas, formándose así un paso intermedio en la diferenciación, los protomiofibroblastos, que posteriormente serán miofibroblastos completamente diferenciados positivos para la actina alfa del músculo liso (α SMA, del inglés *α Smooth muscle actin*). Dentro de las características moleculares típicas de los miofibroblastos diferenciados se encuentra la expresión *de novo* α SMA y de la variante de empalme de fibronectina ED-A⁹⁸.

Durante la generación de los miofibroblastos diferenciados α SMA⁺ se producen una serie de eventos locales como la acumulación de TGF β 1 biológicamente activo, la presencia de proteínas de ECM especializadas como la fibronectina ED-A y un elevado estrés extracelular derivado de las propiedades mecánicas de la ECM y su remodelación (**Fig. 25**), siendo estas diferencias mecánicas mediadas por uniones adherentes entre células y adhesiones focales entre célula y ECM (también conocidas como fibronexos).

La expresión de fibras de estrés α SMA⁺ confiere a los miofibroblastos una actividad contráctil más fuerte en comparación con las HSCs o los protomiofibroblastos α SMA⁻⁹⁷. Los miofibroblastos combinan características ultraestructurales y funcionales del músculo liso, formando fibras contráctiles de tensión que contienen actina y miosina, con un retículo endoplasmático sintéticamente activo.

Los microfilamentos, conformados por la polimerización de monómeros de actina, son el componente principal del esqueleto que determina la forma celular. Los filamentos de actina junto con los gruesos filamentos de miosina conforman el aparato contráctil de la célula. Durante la

contracción celular se protegen y desprotegen los sitios de unión entre miosina y actina, sitios que en reposo son bloqueados por la tropomiosina. La unión del calcio a la troponina provoca el movimiento de la tropomiosina de tal forma que se expone el sitio de unión de la miosina en la actina, al que posteriormente se une la miosina y activa la actomiosina ATPasa para dar lugar a la contracción⁹⁹.

Para resaltar la importancia del potente citoesqueleto contráctil, el nombre de ‘protomiofibroblasto’ fue introducido para aquellas células que contienen fibras de estrés, pero son αSMA^- , siendo αSMA^+ para los miofibroblastos completamente diferenciados. La actina citosólica se recolocaliza en estas fibras de estrés αSMA^+ . Este proceso se encuentra asociado a la formación de adhesiones focales supermaduras (**Fig. 25**), creándose tensiones en el propio cuerpo celular frente a la resistencia de la ECM. La formación de las adhesiones focales permite no sólo anclar las fibras de tensión al sustrato, sino que también proporcionan a los miofibroblastos información sobre la mecánica y la química del microambiente. En comparación con las adhesiones focales clásicas (de alrededor de 6mm de largo), los miofibroblastos diferenciados desarrollan adhesiones supermaduras de mayor tamaño (entre 10 y 30 mm de largo)¹⁰⁰ lo que les permite ejercer una tensión más potente que puede transmitirse a la ECM circundante (participando en el cierre de heridas).

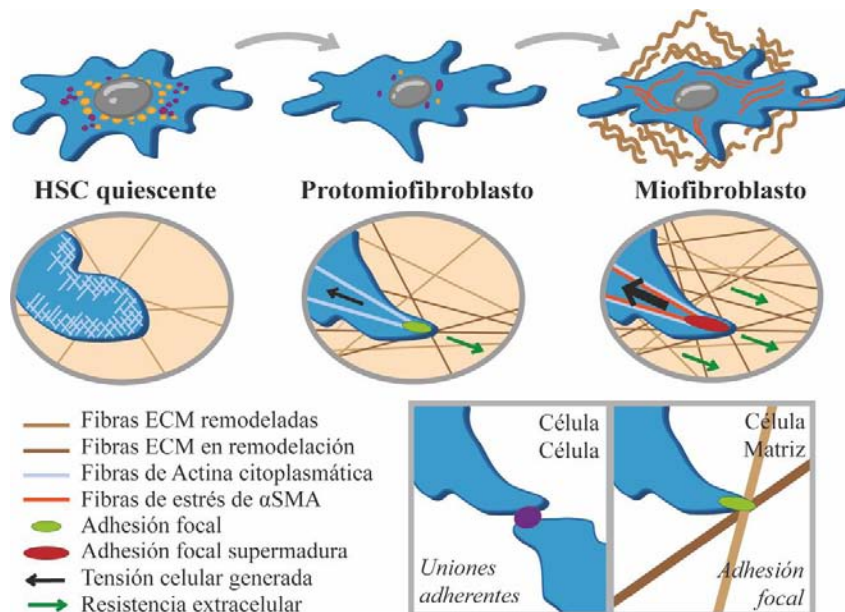


Figura 25. HSC quiescente, protomiofibroblasto y miofibroblasto.

A pesar del parecido entre las células del músculo liso y los miofibroblastos, existen diferencias entre ellas en cuanto a la regulación de la contracción. Mientras que las células del músculo liso necesitan contraerse y relajarse en respuesta a las señales ambientales, los miofibroblastos necesitan generar fuerza continuamente durante largos periodos de tiempo. El mantenimiento de esta contracción sostenida por los miofibroblastos se produce mediante la inhibición de la miosina fosfatasa a través de la vía Rho-Rho quinasa, mientras que la contracción provocada por las células

del músculo liso se rige por un sistema dependiente de calcio (el cual no se regula tan fácilmente por los miofibroblastos)⁸². Los miofibroblastos son capaces de mantener la fuerza contráctil durante largos periodos de tiempo, sin embargo, al final de la reparación del tejido hepático, la ECM reconstruida vuelve a asumir la carga mecánica y el número de los miofibroblastos disminuye (fase de resolución de la activación de las HSCs), siendo esta liberación del estrés mecánico un poderoso promotor de la apoptosis celular

1.1.4 Matriz extracelular.

La matriz extracelular, ECM, interactúa con las células de alrededor influyendo en sus capacidades de adhesión, proliferación, migración y supervivencia, y a su vez, las células remodelan la ECM, permitiendo que estos mismos eventos tengan lugar. Los diversos componentes de la ECM pueden actuar como reservorio de citoquinas y factores de crecimiento listos para ser liberados cuando sean requeridos, estableciéndose así un posible punto de control dependiendo de las respuestas celulares. Por lo tanto, la composición de la ECM está en constante estado de cambio durante el desarrollo y la enfermedad, estando estos cambios controlados por la regulación diferencial y coordinada de la síntesis y el recambio de cada uno de sus componentes individuales.

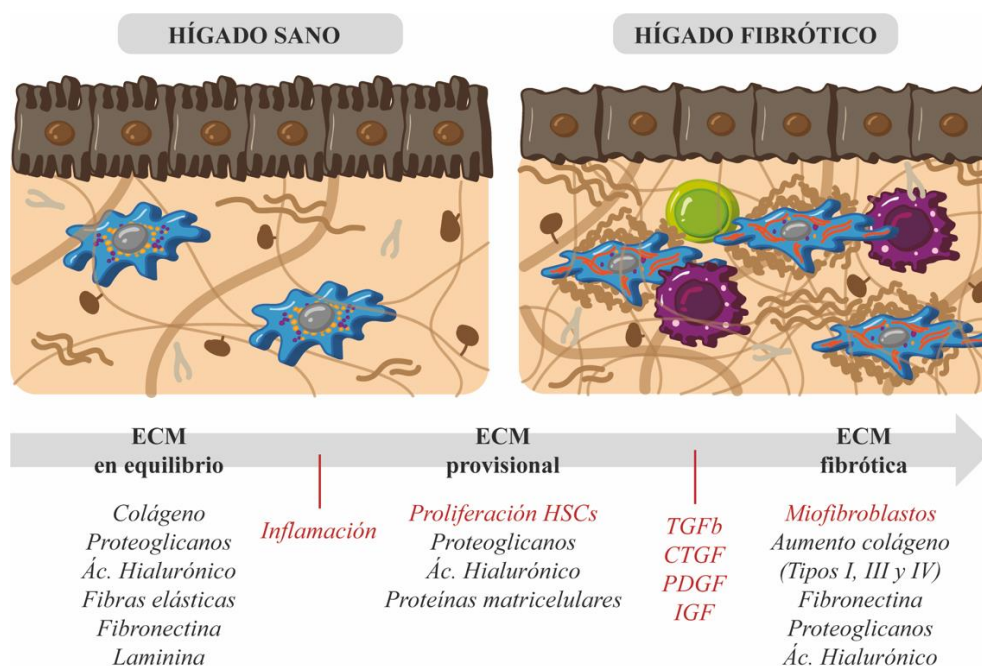


Figura 26. Reestructuración de la matriz extracelular del tejido hepático.

La ECM del tejido hepático normal (Fig. 26) se compone de una serie de macromoléculas que incluyen colágenos, glucoproteínas como laminina y fibronectina, y proteoglicanos¹⁰¹. Cambios específicos en la composición de la ECM son muy similares en todas las formas de daño hepático y fibrogénesis hepática. La fibrosis hepática es el resultado de la acumulación anormal de colágenos

fibrilares, principalmente colágeno tipo I, que surge debido a una síntesis elevada y/o recambio reducido por parte de las HSCs.

Durante el cierre de heridas generadas en el tejido sano se genera primeramente una ECM provisional formada por proteínas plasmáticas como la fibrina, el fibrinógeno o la fibronectina que se genera en el sitio de la herida (**Fig. 26**). Esta ECM provisional tiene un carácter reticulado para que las HSCs, así como otros fibroblastos residentes del tejido hepático, puedan adherirse y comenzar a reparar la herida. Las HSCs sintetizan y secretan otras moléculas, como el ácido hialurónico y los proteoglicanos, que interactúan entre sí y con el resto de componentes estabilizando la matriz enriquecida en fibrina. Esta composición proporciona el microambiente adecuado para la proliferación y la migración de las HSCs además del reclutamiento de células inflamatorias. La formación de una ECM fibrótica sigue a esta fase temprana e implica la renovación de la ECM provisional, la generación de fragmentos de ECM biológicamente activos y el reemplazo de elementos para aumentar la compactación y el enriquecimiento en colágenos (principalmente tipo I, III y IV) y otras proteínas fibrosas¹⁰². Factores como TGF β 1 o PDGF estimulan la producción de ECM enriquecida en ácido hialurónico y versicano generando una capa viscoelástica que permite que las células proliferen, se diferencien y migren. Entre los elementos implicados en la renovación de la ECM durante la respuesta fibrogénica se encuentran proteínas fibrilares como el colágeno fibrilar (tipos I – III, V y XI), la fibronectina (ED-A, ED-B), la elastina y la vitronectina; glicoproteínas como los colágenos no fibrilares (tipos IV, VI-VIII, XIV), fibrilina (tipos 1-3), LTBP, tenascina, ácido hialurónico, versicano, sindecano, fibulina y pequeños proteoglicanos ricos en leucina; proteínas matricelulares como las CCN (CCN1-6, siendo CCN2 = CTGF)¹⁰¹. La fibronectina celular se presenta en las variantes A y B. Mientras que la fibronectina ED-A es característica de la reparación tisular y la fibrosis, la fibronectina ED-B se asocia más a menudo con el desarrollo de tumores y la angiogénesis¹⁰². La fibronectina actúa también en el almacenamiento de LTBP y de la forma latente de TGF β 1 en la ECM fibrótica, siendo la ED-A la más eficaz en su reclutamiento.

En el tejido hepático fibrótico se observa una mayor alineación de los haces de colágeno que hace que aumente la migración de las HSCs y la fibrosis. La acumulación de los colágenos crece haciendo que la arquitectura del hígado se altere significativamente. Este aumento de la organización y la densidad de la ECM se traduce en una mayor rigidez del tejido que genera un estrés mecánico fundamental para la activación y la persistencia de los miofibroblastos. Este hecho, junto con las actividades de remodelación ejercidas por los propios miofibroblastos, que se vuelven más contráctiles a la vez que se sigue endureciendo el tejido, establece un bucle de retroalimentación muy perjudicial que conduce a la persistencia de la activación de los miofibroblastos.

Como ya se ha descrito previamente, la ECM puede ser degradada por varias familias enzimáticas, siendo las MMPs las más importantes. Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc y calcio que son producidas por células del tejido conjuntivo y células inflamatorias, incluyendo hepatocitos, HSCs, KCs, neutrófilos y otros macrófagos hepáticos reclutados durante la respuesta fibrogénica. Las colagenasas son un tipo de MMPs fundamental para el proceso de remodelación del tejido hepático ya que se encargan de la escisión de la hélice nativa de colágenos fibrilares siendo el producto de esta reacción susceptible de la degradación por otras MMPs¹⁰³.

Cada vez hay más pruebas de la presencia de una extensa gama de MMPs con amplia especificidad de sustrato combinada en el hígado fibrótico. Produciéndose, por tanto, el recambio de la ECM no sólo en relación a los colágenos fibrilares sino también a las elastinas, las gelatinas y otros componentes no colagenosos. La MMP1 (MMP13 en roedores) es expresada tanto por macrófagos como por HSCs. La expresión de MMP13 por las HSCs es una característica de la activación temprana, pero cuando éstas se activan completamente y se diferencian a miofibroblasto esta expresión se regula negativamente. Mientras que la gelatinasa B (MMP9) es expresada también por las KCs y otros macrófagos inflamatorios, la gelatinasa A (MMP2) es expresada por las HSCs activadas¹⁰¹.

La actividad extracelular de las MMPs, como cabría esperar de toda esta potente familia de proteasas, se encuentra regulada en diversas etapas. Todas ellas se regulan en mayor o menor medida a nivel génico respondiendo ante diversas señales celulares que incluyen citoquinas y factores de crecimiento como TNF, PDGF, EGF o IL1¹⁰³. Otro punto de regulación se produce mediante la escisión del elemento pro del zimógeno inactivo. Finalmente, las MMPs activas son susceptibles de ser inhibidas por inhibidores extracelulares, los TIMPs. Estos inhibidores son proteínas solubles que se unen de forma no covalente a las MMPs activas estabilizando la proenzima e inhibiendo así su actividad enzimática.

Un determinante principal del avance de la fibrosis progresiva es la incapacidad de degradar el aumento de la matriz intersticial o cicatrizal. Los inhibidores TIMP1 y TIMP2 son expresados por las HSCs. La expresión de TIMP1 se encuentra estrechamente relacionada con la activación de las HSCs y es paralela al desarrollo de otros marcadores como la expresión de la α SMA y de colágeno tipo I¹⁰¹. De hecho, los niveles séricos de este inhibidor se han correlacionado con el estado de la fibrosis siendo por tanto considerado como posible biomarcador del desarrollo de la respuesta fibrogénica hepática. TIMP2 por su parte, es también expresado por las HSCs en su estado tanto inactivo como fibrogénico.

El equilibrio entre MMPs y TIMPs proporciona un mecanismo a través del cual la degradación de la ECM puede regularse estrechamente durante la fibrosis hepática.

1.1.5 Modelos experimentales de fibrosis hepática.

Debido al incremento de investigaciones relacionadas con la fibrosis hepática, se han generado diversos modelos experimentales para poder ahondar en su estudio de cara a la posible futura traslación a humanos.

Dentro de los modelos *in vivo* que se han ido desarrollando se encuentran aquellos modelos basados en la administración de agentes químicos (etanol¹⁰⁴, tetracloruro de carbono (CCl₄)¹⁰⁵, tioacetamida¹⁰⁶, dimetilnitrosamida¹⁰⁷) ya sea vía intraperitoneal o por inhalación. El uso de este tipo de modelos es bastante popular debido a su gran reproducibilidad, fácil uso y por considerarse un reflejo apropiado de mecanismos involucrados en la fibrosis hepática humana.

Otro tipo de modelo experimental de fibrosis hepática es el realizado mediante procedimientos quirúrgicos como la ligación del ducto común biliar (BDL, del inglés *Bile duct ligation*)¹⁰⁸ para estudiar una fibrosis de carácter colestático. También existen modelos basados en la dieta para inducir la progresión de la enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD, del inglés *Non alcoholic fatty liver disease*) o la esteatohepatitis no alcohólica (NASH)^{109,110}. Dentro de estos modelos se encuentran las dietas deficientes en metionina o en colina o las dietas ricas en grasas⁶⁵.

Es relevante el hecho de que las enfermedades hepáticas de carácter colestático y las enfermedades hepatotóxicas muestran síntomas y fenotipos muy diferentes en sus primeras etapas, apoyando así el concepto ‘cirrosis impulsada por etiología’.

Además, el uso de animales modificados genéticamente es una herramienta muy potente que permite el estudio específico de determinados elementos y rutas de señalización implicadas en el desarrollo de la fibrosis hepática. El uso de estos animales modificados permite también la generación de modelos que sin ellos no podrían realizarse, como los basados en infecciones que no se producen en condiciones normales (ej. La generación de fibrosis hepática por el virus de la hepatitis no se produce en roedores, pero sí en humanos).

Otra forma de estudiar la fibrosis hepática es mediante el uso de modelos *in vitro* que implican el aislamiento de células primarias o la utilización de líneas celulares. De esta forma se pueden estudiar los efectos directos del elemento de interés sobre las principales células y rutas implicadas en la respuesta fibrogénica.

1.1.5.1 Fibrosis hepática tóxica inducida por CCl₄.

El compuesto hepatotóxico CCl₄ es uno de los xenobióticos manufacturados más utilizados para estudiar la fibrosis hepática. Este compuesto químico consigue generar un daño hepático que mimetiza en muchos aspectos la lesión causada por agentes tóxicos en humanos (**Fig. 27**).

El CCl₄ es procesado mediante escisión homolítica por el citocromo P450-2E1 generándose el radical libre triclorometilo que posteriormente es oxigenado dando como resultado el radical

triclorometilperóxido¹¹¹ (**Fig. 28**). Ambos radicales se ven involucrados en procesos como la mutación, la hipometilación o la peroxidación de elementos metabólicos esenciales (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos)⁶⁵ contribuyendo así a una reacción de fase aguda caracterizada por la necrosis de hepatocitos centrolobulillares, la activación de KCs y la inducción de una fuerte respuesta inflamatoria.

Todas estas complejas alteraciones en el interior del tejido hepático (**Fig. 28**) resultan en el desarrollo de la fibrosis que puede derivar en cirrosis y carcinoma hepatocelular (HCC).

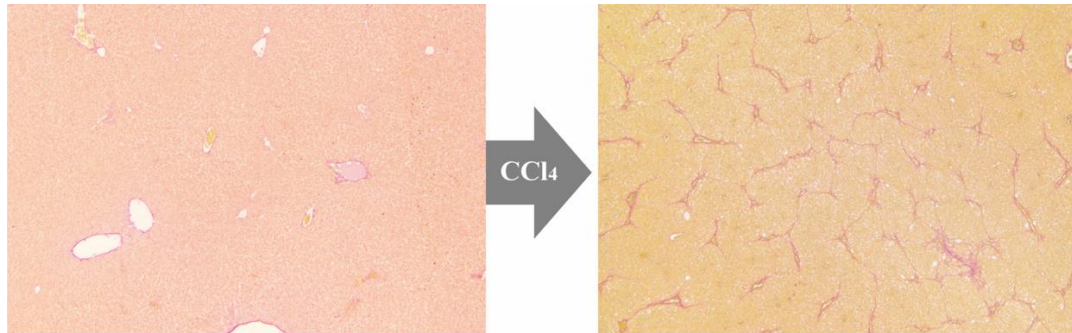


Figura 27. Daño en tejido hepático por CCl₄.

Tinción Rojo Sirio. Izquierda: muestra de tejido hepático sano (en rojo se marca el tejido conectivo alrededor de los vasos). Derecha: muestra de tejido hepático tras administración de CCl₄ (en rojo se observa el entramado fibrótico generado entre zonas portales y centrolobulillares).

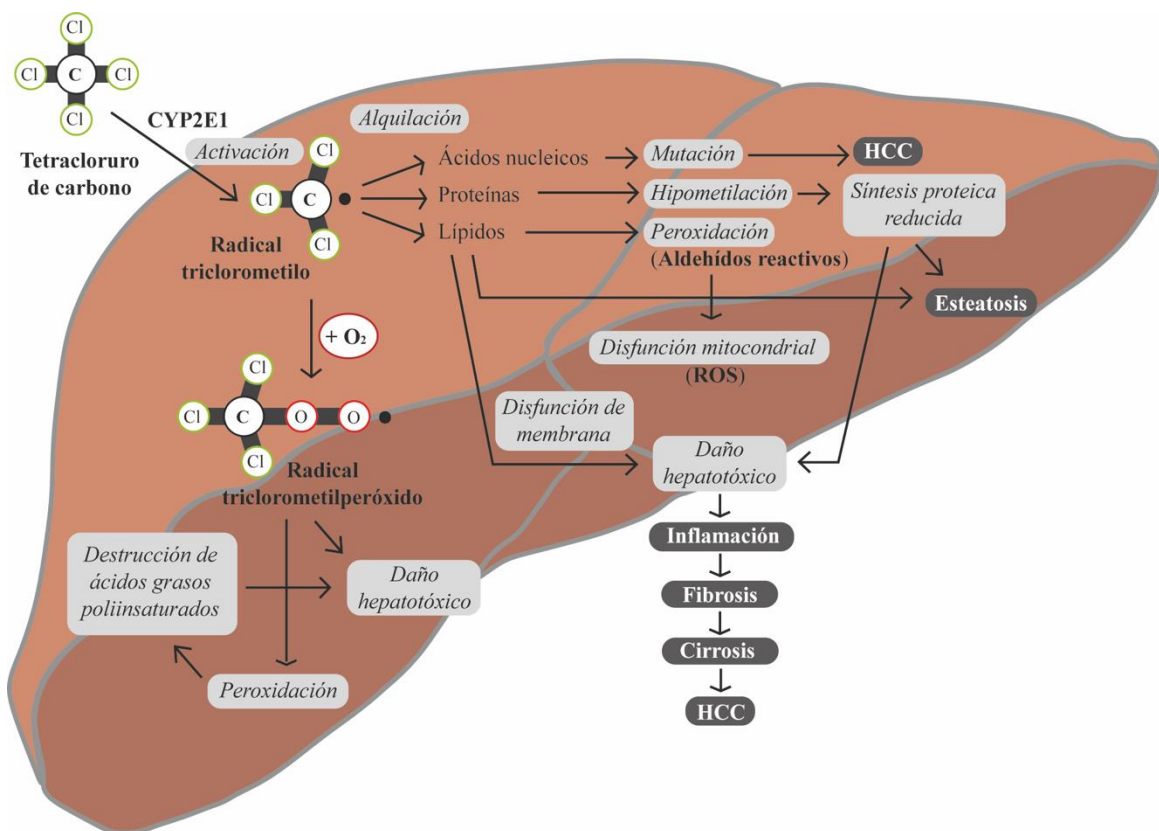


Figura 28. Daño hepático desencadenado por CCl₄.

1.1.5.2 Fibrosis hepática colestática inducida por BDL.

El modelo murino más comúnmente utilizado para el estudio de la fibrosis colestática es la BDL. Mediante un procedimiento quirúrgico que implica la doble ligación del ducto biliar común (proceso descrito en materiales y métodos), este modelo genera una ictericia obstructiva que resulta en colestasis. A través de la toxicidad de los ácidos biliares, la BDL provoca la proliferación de células epiteliales biliares conduciendo esto a una elevada proliferación de conductillos biliares (**Fig. 29**), muchos de ellos no funcionales (pseudo-ductulillos) y a la generación de un fuerte inflamación portal¹¹². Por tanto, con este modelo se produce una fibrosis progresiva junto con una vasoconstricción del tejido vascular hepático que deriva en una alta hipertensión portal, cirrosis hepática e insuficiencia hepática.

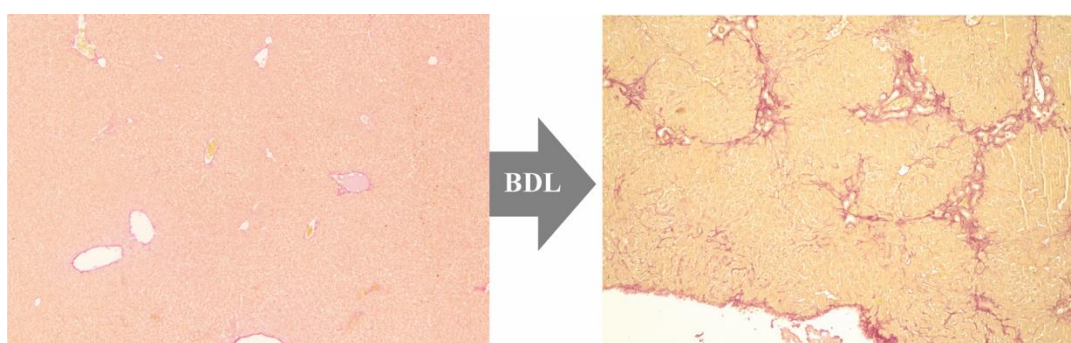


Figura 29. Daño en el tejido hepático por BDL.

Tinción Rojo Sirio. Izquierda: muestra de tejido hepático sano (en rojo se marca el tejido conectivo alrededor de los vasos). Derecha: muestra de tejido hepático tras BDL (en rojo se observa el entramado fibrótico y los nuevos pseudo-ductulillos biliares generados).

1.1.5.3 Línea celular LX2.

Para el estudio de las HSCs humanas, se puede trabajar con células primarias aisladas de tejido hepático humano o con líneas celulares inmortalizadas. Sin embargo, una limitación importante del uso de HSCs primarias humanas es la baja y poco predecible disponibilidad de tejido para su aislamiento, además del hecho de que las HSCs se encuentran dentro del propio tejido en reducido número (5-8% de las células totales en un hígado sano). Además, los cultivos de HSCs primarias se ven limitados a una serie finita de pases antes de perder características importantes que las definen. Por ello, el uso de líneas celulares inmortalizadas es una herramienta de gran utilidad ya que esto permite superar dichos problemas proporcionando una fuente estable e ilimitada de HSCs humanas homogéneas.

La línea celular LX2 es una línea inmortalizada de HSCs humanas desarrollada en 2005 por el grupo del Dr. Scott L. Friedman¹¹³. Esta línea celular está ampliamente caracterizada y conserva las características clave que definen a las HSCs, incluyendo el metabolismo retinoide, la fibrogénesis, la señalización de citoquinas o la expresión de genes neurales como *Gfap*.

1.1.6 Terapias para la fibrosis hepática.

1.1.6.1 Regeneración del tejido hepático.

El hígado es un órgano con una gran capacidad de regeneración que puede llegar a recuperar completamente su masa tras gran variedad de daños sin comprometer la viabilidad de todo el organismo. Este mecanismo de regeneración hepática es observado en todos los organismos vertebrados, desde los humanos hasta los peces, siendo común su estudio en roedores mediante la técnica denominada hepatectomía parcial¹¹⁴. Este procedimiento quirúrgico consiste en la eliminación de 2/3 de la masa hepática, es decir, la extirpación de 3 de los 5 lóbulos hepáticos que tienen los ratones. Pasados entre 5 y 7 días tras la cirugía, los roedores regeneran los lóbulos extirpados por completo.

Los mecanismos de regeneración del tejido hepático pueden dividirse entre tres categorías principales: a) replicación de las células existentes, b) expansión y diferenciación de células progenitoras, y c) transdiferenciación o desdiferenciación de células de un tipo a otro. El hígado, en condiciones homeostáticas, presenta una baja tasa de recambio celular (las células aguantan sin dividirse durante semanas e incluso meses). No obstante, tras una lesión, el hígado puede generar gran cantidad de células nuevas, hepatocitos principalmente. Si la lesión es generada por una resección parcial, el proceso para recuperar su tamaño original se debe a una combinación de división celular e hipertrofia, sin embargo, cuando la lesión viene causada por otros agentes dañinos (toxinas, infecciones virales, ataque del sistema inmunitario) la respuesta regenerativa desencadenada depende de procesos como la producción de un gran número de células epiteliales pequeñas que actúan como células madre - progenitoras¹¹⁵. De hecho, un hallazgo interesante es la reciente observación de que el hígado conserva cierta plasticidad en la edad adulta, con los hepatocitos preparados para adquirir un fenotipo ductal ante variedad de circunstancias¹¹⁶, confirmando así la capacidad de transdiferenciación y reprogramación de ciertas células hepáticas.

Sin embargo, el proceso de regeneración hepática debe tener una terminación, y las vías que conducen a ella deben ser tan importantes como las que inician el proceso, de tal forma que la masa generada no exceda la original. Por ello, se ha planteado la existencia de un conjunto de puntos de control, englobados bajo el nombre de 'hepatostato'^{114, 117}, que aseguren que el ratio órgano/cuerpo sea el que debiera y el hígado sea capaz de desempeñar sus funciones homeostáticas.

1.1.6.2 Evaluación de la función hepática.

La biopsia hepática sigue considerándose el método estándar de elección para el seguimiento del daño hepático. El estado de avance del daño en el tejido hepático se evalúa mediante análisis histológico utilizando escalas como Metavir y Ishak¹¹⁸. Para ello se pueden usar tinciones específicas de proteínas de la matriz extracelular, como por ejemplo la tinción rojo sirio, de forma que se cuantifique el grado de fibrosis aplicando al entramado fibrótico un análisis morfométrico.

Sin embargo, no hay que olvidar que la biopsia hepática es un procedimiento invasivo que implica dolor y posibles complicaciones durante su realización. El riesgo asociado a este procedimiento varía desde dolor e hipertensión, sangrado y daño al sistema biliar, con una tasa de mortalidad de aproximadamente 0.01%⁵⁰.

Otras formas de evaluar la función hepática incluyen pruebas de laboratorio de rutina, como recuento de plaquetas, niveles séricos de aminotransferasas, de proteínas de fase aguda o tiempo de protrombina. Es decir, que los niveles séricos de proteínas directamente relacionadas con el proceso fibrogénico hepático también se utilizan como marcadores sustitutos de la fibrosis hepática³¹. Aunque hay tener en cuenta el hecho de que algunos de estos marcadores específicos de fibrosis pueden estar reflejando procesos fibrogénicos en otros órganos como en el caso de pacientes alcohólicos que pueden estar sufriendo a la vez una fibrosis pancreática¹¹⁹.

BIOMARCADORES FIBROSIS HEPÁTICA	
NO INVASIVOS	INVASIVOS
Marcadores directos	Biopsia hepática
Colágenos Colágeno tipo IV Péptido carboxi de procolágeno I (PICP) Péptido amino de procolágeno III (PIINP)	Escala Ishak Escala METAVIR Escala Knodell
Glicoproteínas y polisacáridos Ácido hialurónico // Laminina // YKL-40	
Colagenasas Metaloproteinasas de matriz (MMPs) Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs)	
Citoquinas Factor de crecimiento tisular beta 1 (TGFb1) Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	
Marcadores indirectos	
Albúmina // Bilirrubina Aspartato aminotransferasa (AST) Alanina aminotransferasa (ALT) Gamma glutamil transferasa (gGT) Fosfatasa alcalina (ALP) Tiempo de protrombina (TP)	
Combinación de marcadores	
Índice ratio AST/plaquetas (APRI) Ratio AST/ALT // Índice Bonacini // Fibrosis 4 Índice de fibrosis hepática mejorada (ELF) Índice Fibro // Test fibrómetro // FibroSpect II Test Forns // Hepascore // Índice Lok	

Tabla 1. Biomarcadores de fibrosis hepática.

El análisis de la fibrosis hepática puede realizarse de forma invasiva (biopsia hepática) o a través de diferentes biomarcadores no invasivos (directos, indirectos mediante combinación de ambos).

La principal ventaja del estudio de biomarcadores sobre la biopsia hepática es que las estimaciones en suero son realizadas mediante un procedimiento mínimamente invasivo. Además, este tipo de estudio es fácilmente aplicable y reproducible entre laboratorios. Los biomarcadores séricos de la fibrosis hepática se pueden clasificar en dos categorías: a) marcadores directos, directamente

involucrados en la deposición y eliminación de matriz extracelular; b) marcadores indirectos, moléculas liberadas a la sangre que reflejan alteraciones de la función hepática (**Tabla 1**)⁵⁰. Además, la medición de diversas proteínas como la apolipoproteína A1 (apoA1), la a2 macroglobulina, el ácido hialurónico u otras enzimas hepáticas se puede evaluar mediante baterías de laboratorio bajo nombres como Fibrotest/Test fibrómetro, Fibrosure, Hepascore o FibroSpect entre otros (**Tabla 1**).

La fibrosis hepática puede además ser estimada mediante el uso de técnicas de imagen *in vivo* como la ecografía, la tomografía computarizada o la resonancia magnética, que pueden detectar cambios en el parénquima hepático debido a una fibrosis de moderada a severa³¹. Por ejemplo, la elastografía es un método no invasivo que permite estudiar la elasticidad y rigidez del hígado mediante el uso del equipo de ultrasonido Fibroscan que mide la velocidad de transmisión de ondas de baja frecuencia a través del tejido hepático de forma que la propagación de la onda elástica es proporcional a la rigidez del tejido y, por tanto, al grado de fibrosis hepática¹²⁰.

1.1.6.3 Terapias para la fibrosis hepática.

Como se ha podido comprobar a lo largo de esta introducción, la fibrosis hepática es un proceso complejo que conlleva la participación y coordinación de numerosos elementos en todas sus etapas. A pesar del conocimiento que actualmente se posee sobre ella y de las numerosas investigaciones realizadas y en curso, actualmente no existe ninguna terapia estándar para el tratamiento de la fibrosis hepática.

Aunque durante mucho tiempo la fibrosis hepática se consideró irreversible, durante el desarrollo de estudios tanto experimentales como clínicos se ha observado la regresión de la fibrosis al retirar el agente causante del daño, como en el caso de la terapia antiviral frente a la hepatitis C, el cambio de estilo de vida en pacientes con NALFD o la abstinencia alcohólica. Desde la demostración, en los años 90, de que la fibrosis hepática avanzada era reversible, se han realizado muchos estudios tratando de identificar posibles terapias antifibróticas con diferentes enfoques que se pueden clasificar en las siguientes estrategias: a) eliminar el agente causante del daño o tratar la enfermedad subyacente; b) tratar y bloquear la inflamación que pueda estar conduciendo a la fibrosis; c) actuar sobre las HSCs a distintos niveles para inhibir su activación, proliferación y respuesta fibrogénica además de promover su apoptosis; d) promover la degradación de la ECM generada en exceso.

Desgraciadamente, para pacientes con cirrosis y diversas complicaciones clínicas, el trasplante de hígado todavía sigue siendo el único acercamiento curativo que consigue mejorar la tasa de supervivencia y aumentar su calidad de vida. En la actualidad, en Europa se realizan más de 5.500 trasplantes ortotópicos de hígado al año, con un coste de hasta 100.000 € el primer año y 10.000 € a partir de entonces⁶⁵. Sin embargo, se ha visto que en pacientes con cirrosis inducida por el virus de la hepatitis C (HCV, del inglés *Hepatitis C virus*) es común que tras el trasplante la infección

viral reaparezca y se desarrolle una hepatitis crónica agresiva que acabe derivando de nuevo hacia cirrosis¹²¹. Por ello, es vital encontrar tratamientos que eviten tener que llegar a este procedimiento y que sean capaces de regular la respuesta fibrogénica cuando comienza a desarrollarse o, al menos, en alguna de sus etapas posteriores. Actualmente hay diversos factores con características anti-fibróticas prometedoras que se encuentran ya en fase 2 y 3 de ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades como NASH, NAFLD, HCV o la colangiocitis primaria biliar. Dentro de un ensayo clínico, la fase 2 contempla el estudio de la eficacia de la prueba y la evaluación de la seguridad; y la fase 3 pretende confirmar la efectividad, monitorizar los posibles efectos secundarios, y comparar con otros tratamientos estándar. Algunos de los principales posibles agentes terapéuticos que se están evaluando se recogen a continuación:

- Cenriviroc – inhibidor de CCR2/CCR5 (Fase 3 en curso)

La progresión de NASH se encuentra asociada al reclutamiento y acumulación de macrófagos y monocitos pro-inflamatorios a través del receptor CCR2¹²² y del reclutamiento de HSCs y linfocitos mediante el CCR5¹²³. Cenriviroc es un antagonista dual de CCR2 y 5. La mayoría de los pacientes con NASH que fueron tratados con Cenriviroc y respondieron bien al tratamiento durante el primer año mantuvieron su efecto durante el segundo año también, incluso aquellos en un estado de fibrosis avanzado¹²⁴, lo cual pone de manifiesto la durabilidad de su efecto beneficioso. Actualmente este fármaco se encuentra en la fase 3 de los ensayos clínicos.

- Selonsertib (GS-4997) – inhibidor de ASK-1 (Fase 3 en curso)

El uso de este inhibidor se plantea como tratamiento para NASH. Debido a la presencia de señales de estrés durante el desarrollo de la enfermedad se activa la quinasa reguladora de señales de apoptosis (ASK-1, del inglés *Apoptosis signal-regulating kinase 1*), lo que causa apoptosis, inflamación y fibrosis. El estudio del efecto terapéutico del inhibidor Selonsertib, sólo o en combinación con Simtuzumab (inhibidor de la lisil oxidasa 2), en pacientes con NASH en un estado de fibrosis avanzada ha mostrado una ligera capacidad para reducir la severidad de la enfermedad¹²⁵. Sin embargo, existe una gran preocupación con respecto al riesgo de una tumorigénesis hepática al haberse detectado un aumento de la susceptibilidad al desarrollo de hepatocarcinoma en ratones deficientes en ASK1¹²⁶.

- Simtuzumab – inhibidor de LOX2 (Fase 2 finalizada)

La lisis oxidasa (LOX, del inglés *lysyl oxidase*) es una enzima que contribuye significativamente en la estabilización del colágeno en enfermedades hepáticas crónicas. Simtuzumab es un anticuerpo frente a LOX2 para bloquear la reticulación del colágeno al promover ésta la progresión de la fibrosis hepática y limitar su reversión. A pesar de ello, el tratamiento con Simtuzumab no ha mostrado un efecto anti-fibrótico real en la fase 2 de los ensayos clínicos con pacientes con NASH en estados 3 de fibrosis o 4, cirrosis¹²⁷.

- Emricasan (IDN-6556) – inhibidor de apoptosis (Fase 2 en curso)

La apoptosis de los hepatocitos es un punto clave en las enfermedades hepáticas crónicas. Emricasan es un inhibidor pan-caspasa irreversible que disminuye la actividad de las caspasas 3 y 7 y que originalmente mostró efectos beneficiosos sobre la extensión de la esteatosis y la fibrosis en modelos experimentales de ratones con dieta grasa¹²⁸ y redujo los niveles de la aminotransferasa de alanina en pacientes con HCV^{129,130} y NAFLD¹³¹.

- Pirfenidona (Fase 2 terminada)

La pirfenidona es una piridinona que inhibe la formación de colágeno y ha sido aprobada para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática. No está aún claro su mecanismo de acción, pero se ha descrito su posible capacidad para atenuar la proliferación de las HSCs inducida por PDGF y para reprimir la expresión de colágeno asociada a TGF β en HSCs primarias de rata¹³². Además, *in vivo*, pirfenidona mejora la progresión de la fibrosis en modelos de daño hepático en ratas¹³³. En humanos, el tratamiento con pirfenidona redujo la inflamación hepática, fibrosis y esteatosis en pacientes con hepatitis C crónica¹³⁴.

- Agonistas del receptor Farnesoid X (Fase 3 para NASH en curso. Tratamiento clínicamente aprobado y en uso como terapia de colangiocitis primaria biliar)

El receptor Farnesoid X (FXR, del inglés *Farnesoid X receptor*) es un receptor nuclear que juega un papel importante en la regulación del metabolismo lipídico, de la glucosa y de los ácidos biliares, lo que lo hace un candidato atractivo para el tratamiento de patologías colestáticas y por ello el uso de agonistas de este receptor ha sido ya aprobado para el tratamiento de la colangiocitis primaria biliar¹³⁵.

- NGM282 – análogo de FGF19 (Fase 2 en curso)

FGF19 es una hormona que regula la síntesis de ácidos biliares y la homeostasis de la glucosa. Se ha descrito que FGF19 es capaz de reducir la esteatosis hepática en modelos animales al inhibir la síntesis de ácidos grasos e incrementando su oxidación¹³⁶. Sin embargo, su uso como tratamiento para NASH/NAFLD es controvertido ya que se ha descrito que también promueve la fibrogénesis y la hepatocarcinogénesis en modelos murinos¹³⁷. Para mitigar este efecto se está estudiando el uso del análogo NGM282, que no desencadena la activación de STAT3¹³⁸, ruta esencial en la hepatocarcinogénesis desencadenada por FGF19, pero que sí muestra propiedades moduladoras de la esteatosis, anti-inflamatorias y anti-fibróticas.

- Agonistas de PPAR

Los receptores PPARs se pueden dividir en 3 subtipos (α , β , γ). Por un lado, PPAR α muestra su efecto anti-inflamatorio en el hígado a través de la inhibición de NF κ b y la inducción de FGF-21^{139,140}. Actualmente, se está evaluando el uso de agonistas para PPAR α como bezafibrate (en fase

3) y de fenofibrate (en fase 1-2) para el tratamiento de pacientes con colangiocitis primaria biliar. Y por otro, PPAR γ se encuentra altamente expresado en las HSCs quiescentes y regulado a la baja durante su activación¹⁴¹. Las tiazolidinedionas son agonistas selectivos para PPAR γ que están siendo utilizados en la clínica como sensibilizadores de insulina. Uno de estos agonistas de PPAR γ que mejores resultados está dando hasta la fecha es pioglitazone. En estudios con este compuesto se ha observado una cierta mejora en la resolución de la fibrosis en pacientes con NASH^{142,143}.

- FGF-21 (Fase 2 terminada):

Pegbelfermin (BMS-986036), un análogo de FGF-21, factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21, del inglés *Fibroblast growth factor 21*), ha sido sugerido como tratamiento para pacientes con NASH al prolongar la vida media de FGF-21 manteniendo su efecto de forma más prolongada en el tiempo^{144,145}, y actualmente se están realizando dos ensayos clínicos en fase 2 con este compuesto.

- Aramchol (Fase 2 terminada):

El ácido colanoicoamidoaraquidil tiene como diana la desaturasa 1 de la estearoil - coenzima - A (SCD1, del inglés *stearoyl-coenzyme A desaturase 1*), lo que limita la síntesis de ácidos grasos mono-insaturados. Estudios *in vitro* han mostrado que Aramchol es capaz de inhibir la activación de HSCs (LX2)¹⁴⁶. Durante la fase 2 de tratamiento a pacientes con NAFLD no se observaron problemas de seguridad, fue bien tolerado y se redujo significativamente el contenido graso en el hígado.

- Vitamina E (Fase 3 terminada)

Conocido anti-oxidante propuesto para el tratamiento de NASH. La vitamina E, o α - tocoferol, protege contra la peroxidación lipídica al reaccionar con los radicales libres. La administración diaria de altas dosis de vitamina E durante dos años en pacientes no diabéticos con NASH indujo una mejoría de la inflamación hepática, la esteatosis y el aumento del volumen de los hepatocitos¹⁴². Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la resolución de la fibrosis y por ello finalmente no se ha recomendado su uso.

- Inhibidores de ACC (Fase 2 terminada)

Se han detectado efectos anti-fibróticos con la inhibición de la Carboxilasa de Acetil-CoA (ACC, del inglés *Acetyl-CoA carboxylase*) y el uso de GS-0976 como inhibidor de ambas isoformas de ACC en los ensayos clínicos en fase 2 ha demostrado una reducción significativa en el contenido graso hepático y una mejora en la bioquímica hepática, incluyendo marcadores de fibrosis¹⁴⁷.

Además de todos estos factores, existen más compuestos prometedores con los que también se están llevando a cabo estudios con modelos experimentales o incluso con ensayos clínicos en distintas fases como los antagonistas de la galectina 3¹⁴⁸, agonistas de la hormona tiroidea T3¹⁴⁹ o compuestos

interferentes en el sistema renina-angiotensina-aldosterona^{150, 151}. Asimismo, no hay que perder de vista la posible combinación de algunos de estos factores entre sí para potenciar sus efectos beneficiosos.

A la hora de realizar los ensayos clínicos con todos los posibles candidatos terapéuticos ha de tenerse en cuenta la necesidad de un seguimiento a largo plazo y que la biopsia de tejido hepático sigue siendo hasta la fecha el método estándar para la detección de cambios en la fibrosis hepática. La utilización de nuevos biomarcadores, como los mencionados previamente, permitiría intentar llevar a cabo esos seguimientos a largo plazo de forma mínimamente invasiva. Por tanto, queda claro que, por un lado, el desarrollo de biomarcadores no invasivos y que sean fiables debería tener un impacto positivo en el diseño de los ensayos clínicos, y por otro, que la terapia antifibrótica ideal sería aquella terapia que fuese específica para el hígado y las células efectoras de la respuesta fibrogénica en este órgano, que fuese además bien tolerada en su administración durante períodos prolongados de tiempo y eficaz en la atenuación de la deposición excesiva de colágeno, pero sin afectar la síntesis normal de matriz extracelular. Teniendo en cuenta por tanto todo lo anterior, factores endógenos que puedan ser expresados por las células tanto residentes como infiltrantes del tejido hepático podrían estar jugando un papel importante limitando el desarrollo de la respuesta fibrogénica en condiciones fisiológicas o incluso variando su expresión y/o liberación en el tejido dañado. De igual forma, la carencia o menor nivel de expresión de estos mismos factores endógenos podría implicar un empeoramiento del proceso fibrogénico al no estar presentes regulando el complejo microambiente tisular.

1.2 NEUROPEPTIDO CORTISTATINA.

Dentro de estos factores endógenos con capacidad para intervenir y modular multitud de procesos tanto celulares como bioquímicos se encuentran los neuropéptidos, que fueron definidos en los años 70s por el doctor David de Wied como aquellas moléculas pequeñas similares a las proteínas que son producidas y liberadas por neuronas a través de rutas secretoras muy bien reguladas. Aunque diversos autores consideran como características distintivas de los neuropéptidos su expresión génica y biosíntesis por parte de las neuronas, el almacenamiento y la liberación regulada a demanda, y la capacidad de modular o mediar el funcionamiento neural directamente a través de receptores neurales¹⁵², hay que tener presente que la continuación de su estudio ha permitido ampliar el concepto que se tiene sobre ellos.

La existencia de una comunicación bidireccional entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario requiere el uso de un lenguaje bioquímico común. Los neuropéptidos, al poder ser tanto expresados como reconocidos por los tres sistemas, forman, por tanto, parte de este lenguaje común que además cuenta con otros elementos como citoquinas, interleuquinas, neurotransmisores y hormonas¹⁵³. Esta constante comunicación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario permite la modulación coordinada de las distintas respuestas necesarias para el mantenimiento de la homeostasis interna del organismo tras la generación de un daño.

1.2.1 Cortistatina.

De entre los neuropéptidos de interés, durante esta tesis doctoral se ha trabajado en concreto con el neuropéptido Cortistatina. Diversos motivos, que se irán describiendo a continuación, indujeron a pensar en el posible papel regulador que Cortistatina podría estar ejerciendo durante el desarrollo de la respuesta fibrogénica.

Este neuropéptido fue descubierto y caracterizado por el grupo de investigación del doctor Luis de Lecea en 1996, y recibe su nombre tanto por su expresión predominantemente cortical como por sus propiedades depresoras neuronales en dicha zona del cerebro¹⁵⁴.

Cortistatina es un neuropéptido de la familia génica de Somatostatina, con quien comparte una notable homología estructural. A pesar de compartir aminoácidos, tanto sus secuencias nucleotídicas como sus localizaciones cromosomales indican que son productos de genes separados^{155,156}. Cortistatina se encuentra codificado por el gen *cortistatin* (*Cort*) que se localiza en el cromosoma 1 en la especie *Homo sapiens* (Gene ID. 1325) y en el cromosoma 4 en *Mus musculus* (Gene ID. 12854) (**Fig. 30**).

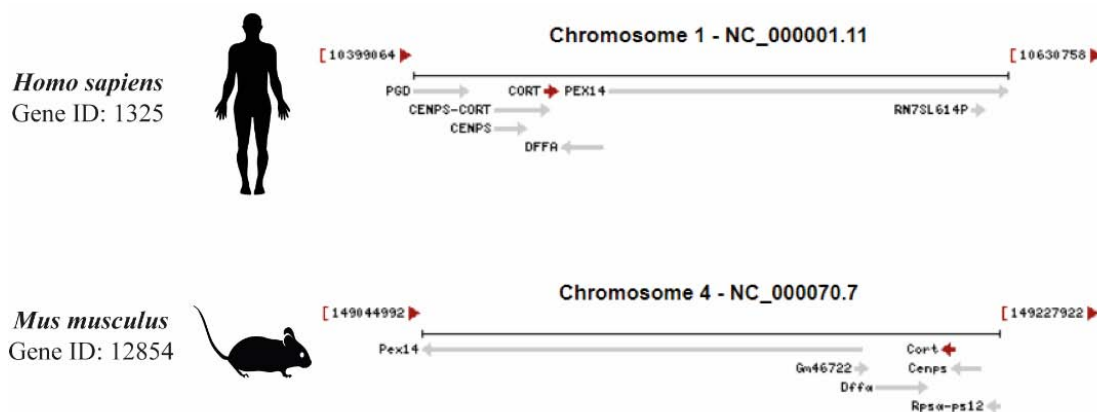


Figura 30. Localización cromosómica del gen de Cortistatina en humano (*Homo sapiens*) y ratón (*Mus musculus*). Información extraída de NCBI^{157,158}.

1.2.1.1 Expresión de Cortistatina.

La síntesis de los neuropéptidos es un proceso complejo. Virtualmente todos los neuropéptidos bioactivos son parte de un precursor molecular inactivo más largo que, tras su síntesis en el retículo endoplasmático, se transfiere al aparato de Golgi para su empaquetamiento, seguido de su transporte y liberación exocítica¹⁵⁹. Tras el procesamiento proteolítico, el pre-pro-péptido, pre-pro-Cortistatina, es liberado del péptido señal dando así lugar al pro-Cortistatina. Tras la acción de las enzimas de procesamiento llamadas convertasas, se pierden también los aminoácidos dibásicos (KR, RK, KK, RR) del extremo carboxílico liberándose finalmente el neuropéptido bioactivo Cortistatina¹⁵⁵. Cortistatina, como producto maduro biológicamente activo, puede secretarse como Cortistatina-14 o Cortistatina-29 en ratón, y Cortistatina-17 o Cortistatina-29 en humanos, dependiendo de los sitios de escisión sobre los que hayan actuado las convertasas (**Fig. 31**). Aunque pueden darse otras variantes del procesamiento proteolítico generador de Cortistatina, aún se desconocen sus capacidades funcionales, siendo por tanto de mayor relevancia actualmente los productos maduros 14, 17 y 29.

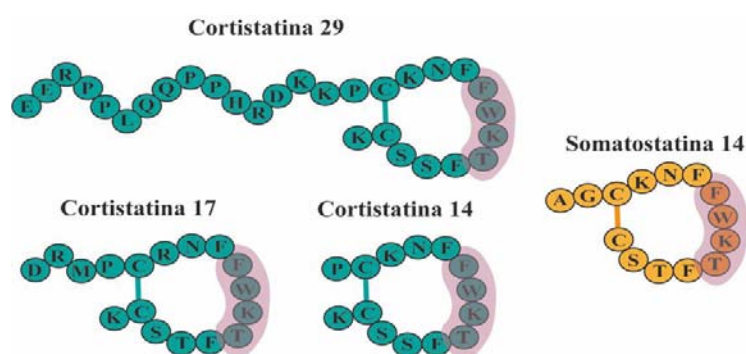


Figura 31. Estructura secundaria de Somatostatina-14 y Cortistatina-14 (14 aa), -17 (17 aa) y -29 (29 aa).

Principales productos maduros de los neuropéptidos Somatostatina y Cortistatina y sus longitudes aminoácidas (aa = aminoácidos). Marcado el tetrámero hidrófobo FWKT común entre ambos neuropéptidos.

La expresión del ARN mensajero (ARNm) de pre-pro-Cortistatina se regula en respuesta al ciclo circadiano, a las perturbaciones del sueño y al estrés¹⁶⁰⁻¹⁶². Aunque la principal fuente de este

neuropéptido se considera el cerebro, donde su expresión se ha observada principalmente en la corteza y el hipocampo, Cortistatina también se encuentra ampliamente distribuido a través del cuerpo, siendo, no obstante, expresado en menor proporción en localizaciones periféricas^{154, 163}. Se ha observado su expresión en otros órganos y tejidos como los testículos, el corazón, el páncreas, la próstata, la piel, los riñones o los pulmones entre otros (NCBI). Además, tanto células del sistema nervioso (interneuronas GABAérgicas, neuronas nociceptivas, microglía, astrocitos), como del sistema endocrino (tiroides, paratiroides, colon, riñones, glándula adrenal, páncreas) y del sistema inmunitario (linfocitos, tanto B como T, células dendríticas, monocitos, macrófagos) son consideradas fuente de Cortistatina permitiendo así la ya mencionada comunicación bidireccional entre sistemas^{163,164}.

1.2.1.2 Funciones y receptores de Cortistatina.

Entre los residuos comunes que presentan los neuropéptidos Cortistatina y Somatostatina se incluye un núcleo hidrófobo constituido por el tetramero FWKT (Phe7, Trp8, Lys9, Thr10) y dos residuos de cisteína que hacen que ambos neuropéptidos tengan una estructura secundaria cíclica a través del puente disulfuro generado entre ellas (**Fig. 31**).

Gracias a esta homología estructural entre ambos neuropéptidos, Cortistatina es capaz de ejercer sus múltiples efectos biológicos a través de los receptores de Somatostatina (SSTR, del inglés *Somatostatin receptor*), al ser capaz de unirse a los distintos subtipos de SSTR (SSTR1, SSTR2A, SSTR2B, SSTR3, SSTR4 y SSTR5) con alta afinidad^{165,166}. Dentro de las funciones compartidas con SST se encuentran la depresión de la actividad neuronal, la inhibición de la hormona del crecimiento o la secreción de insulina en jóvenes sanos, así como en pacientes acromegálicos e hiperprolactiménicos^{160,167}. Diversas proteínas efectoras celulares como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C, los canales de calcio y potasio, el intercambiador de iones sodio/hidrógeno (Na⁺/H⁺), la proteína tirosina fosfatasa, la fosfolipasa 2, la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) o p53 son moduladas por los distintos subtipos de SSTR¹⁶⁸.

De hecho, se conoce que la unión de Cortistatina a los SSTR (**Fig. 32**) desencadena cambios en la señalización intracelular como la disminución de los niveles de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) por una menor actividad enzimática de la adenilato ciclasa^{164,169}, la reducción de calcio intracelular o la disminución de la actividad de la proteína quinasa C (PKC)¹⁷⁰.

Sin embargo, pronto se descubrió que Cortistatina también era capaz de ejercer una serie de actividades biológicas distintas a las de Somatostatina como la reducción de la actividad locomotora o el aumento del sueño de onda lenta^{154,155}, lo que llevó a postular la capacidad de Cortistatina para unirse a otros receptores que no fueran los de Somatostatina.

Cortistatina es capaz de unirse al receptor secretagogo de la hormona de crecimiento tipo 1a (GHSR1a, del inglés *Growth hormone secretagogue receptor type 1a*) con una afinidad comparable a la de su ligando endógeno Grelina^{171,172}. Su unión a este receptor desencadena su activación y da lugar a un aumento de AMPc intracelular, lo que activa así la enzima proteína quinasa A (PKA), favoreciendo por tanto la señalización intracelular a través de la vía AMPc/PKA (**Fig. 32**).

Y, aunque aún no se han identificado receptores específicos para el neuropéptido Cortistatina, lo que sí se ha demostrado es la interacción de Cortistatina con el receptor humano del gen X2 relacionado con Mas (MrgX2, del inglés *Mas-related gene X2 receptor*)¹⁷³. MrgX2 es un receptor previamente huérfano perteneciente a una familia de secuencias codificantes relacionadas con el oncogén Mas1. Este receptor sólo se ha descrito en humanos (toda la familia MrgX está ausente en roedores) y aunque fue identificado inicialmente en las pequeñas neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal ahora se conoce su expresión en diversos tejidos (testículo, intestino delgado, médula espinal, páncreas, pulmón, corazón, timo o colón)^{174,175}. El papel biológico de la unión de tanto Cortistatina-14 como Cortistatina-17 a MrgX2 no está claro, más allá de un mayor transporte de calcio hacia el interior celular, no obstante, éste puede estar relacionado con la modulación de la nocicepción, la percepción del dolor¹⁷³.

Al contrario que Cortistatina, Somatostatina no es capaz de unirse ni a GHSR1 ni a MrgX2, y el motivo de ello parece ser la carencia de la prolina N-terminal extracíclica y de la amida de la lisina C-terminal que sí presenta Cortistatina y que parecen ser esenciales en la activación de ambos tipos de receptor (**Fig. 31 y 32**).

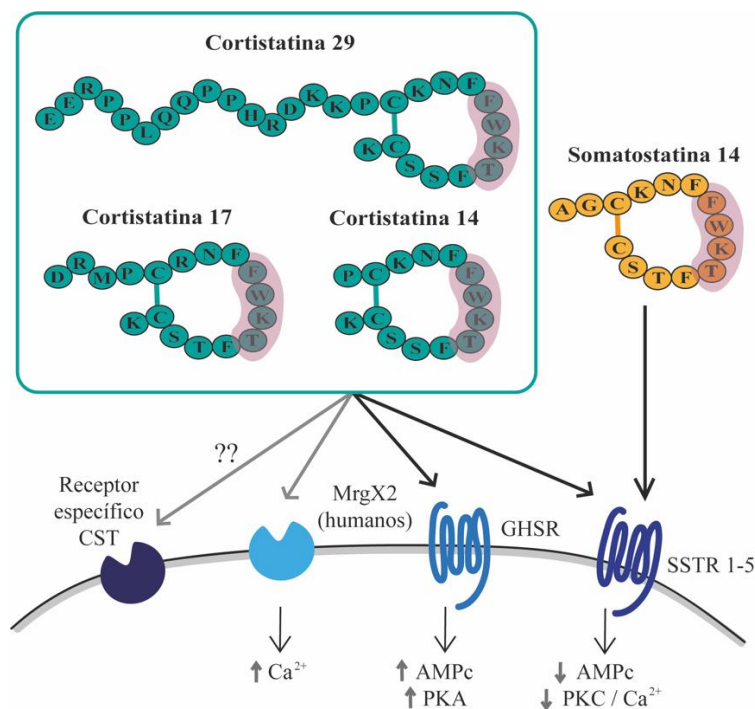


Figura 32. Receptores de Cortistatina.
CST = Cortistatina.

La habilidad de Cortistatina para activar estos diferentes receptores y vías de transducción, junto el hecho de ser expresado por parte de células del sistema inmunitario, podría explicar su potente capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora^{164,166}. Y es que no sólo Cortistatina es expresado por tejidos linfoides como el timo, células inmunitarias o líneas celulares linfoides, sino también parte de sus receptores son expresados por ellas (**Tabla 2**). Como ejemplo se puede destacar la capacidad de los linfocitos T para expresar tanto Cortistatina como SSTR3, MrgX2 y GHSR; de los linfocitos B para expresar Cortistatina, SSTR3y GHSR; o de los macrófagos y células dendríticas para expresar SST2 además de Cortistatina¹⁶⁸.

Mediante el uso de diversos estudios con modelos experimentales como los de choque séptico, inflamación intestinal, artritis reumatoide, miocarditis, aterosclerosis o esclerosis múltiple¹⁷⁶⁻¹⁸¹ (**Tabla 2**), se ha observado que Cortistatina es capaz de ejercer como factor inmunomodulador de forma más potente que Somatostatina y sus agonistas, consiguiendo así proteger al organismo frente a respuestas inflamatorias exacerbadas.

Fuentes principales	Funciones principales	Receptor		Modelos Terapia
		Tipo	Expresión	
SNC Riñones Estómago Hígado Testículos Retina Corazón Piel Pulmón <i>Linfocitos T</i> <i>Macrófagos</i> <i>Monocitos</i> <i>Cél. Dendríticas</i>	↓ Actividad locomotora ↑ Sueño de onda lenta ↓ Hormona crecimiento ↓ Proliferación celular ↓ <i>Factores inflamatorios</i> ↓ <i>Quimioquinas</i> ↑ <i>Producción IL10/TGFβ1</i> ↓ <i>Proliferación células T</i> ↓ <i>Diferenciación y respuestas Th1/Th17</i> ↑ <i>Células T reg</i>	SSTR 1-5	SNC Riñon Pulmón Páncreas Estómago Pituitaria Hígado <i>Linfocitos T Macrófagos</i> <i>Monocitos Cél.Dendríticas</i> <i>Astroцитos Microglía</i>	Sepsis RA IBD EAE Dolor Aterosclerosis Miocarditis autoinmune Isquemia Meningoencefalitis bacteriana
		GHSR	SNC Tej.Gastrointestinal Pituitaria Páncreas Corazón Pulmón Músculo <i>Linfocitos T Macrófagos</i> <i>Monocitos Monocitos</i> <i>Astroцитos</i>	

Tabla 2. Principales fuentes, funciones y tipos de receptores de CST y modelos experimentales de terapia.

SNC: Sistema nervioso central, RA: artritis reumatoide (del inglés *rheumatoid arthritis*), IBD: enfermedad intestinal inflamatoria (del inglés *Inflammatory bowel disease*), EAE: encefalomiélitis autoinmune experimental (del inglés *Experimental autoimmune encephalomyelitis*). Flecha azul: promueve. Flecha gris: disminuye. Cursiva: relacionado con el Sistema inmunitario.

Dentro de estos modelos es destacable la capacidad de Cortistatina para proteger frente al daño tisular como el generado en un modelo de artritis inducida por colágeno durante el cual el tratamiento con Cortistatina disminuyó la severidad del daño mediando la infiltración neutrófila en el tejido sinovial, reduciendo los niveles de expresión proteica de factores inflamatorios como las citoquinas TNF α e IFN γ , las interleuquinas IL6, IL1 β e IL12, y las quimioquinas RANTES y MIP2, y aumentando además los niveles de la citoquina reguladora IL10¹⁷⁸. Estos efectos protectores también fueron observados en un modelo de endotoxemia letal donde, con la administración de Cortistatina, se consiguió una mayor expresión de IL10, citoquina anti-inflamatoria, junto con una menor infiltración y expresión, tanto local como sistémica, de mediadores pro-inflamatorios como

TNF α , IL6, IL1 β e IL12, RANTES y NO producido por macrófagos. Durante este estudio se observó también que Cortistatina era capaz de ejercer este efecto inhibitorio en la expresión de componentes inflamatorios de forma más potente que Somatostatina o el agonista de su receptor Octreótido¹⁷⁶.

Además de ser capaz de disminuir la expresión de factores pro-inflamatorios, citoquinas y quimioquinas, Cortistatina también reduce las respuestas autorreactivas tipo Th1 y Th17 (desencadenadas por linfocitos T cooperadores 1 y 17, del inglés *lymphocyte T helper*) y promueve la generación de células T reguladoras (T reg) y respuestas de tipo Th2^{177,181}.

1.2.2 Cortistatina y fibrosis.

Además de su ya descrito papel como potente factor anti-inflamatorio e inmunomodulador, existen también evidencias que nos llevan a pensar en un posible papel anti-fibrótico directo de este neuropéptido.

Como ya se ha señalado previamente, Cortistatina presenta, no sólo una expresión preferencial en determinadas áreas del sistema nervioso central, sino que también es expresado en otros tejidos periféricos susceptibles a verse afectados por respuestas fibróticas, como los riñones, el corazón, los pulmones, la piel o el hígado (**Tabla 2**). Asimismo, también es de gran relevancia el hecho de haberse observado una menor expresión de Cortistatina en estos tejidos tras el desarrollo de un daño. De hecho, resultados preliminares analizando la expresión de Cortistatina en hígados de individuos sanos y de pacientes con distintas patologías asociadas a la fibrosis hepática (virus de la hepatitis B [HBV, del inglés *Hepatitis B virus*]¹⁸², virus de la hepatitis C [HCV, del inglés *Hepatitis C virus*]¹⁸³, NAFLD¹⁸⁴ y colestasis biliar y atresia biliar infantil¹⁸⁵) utilizando la base de datos 'National Cancer for Biotechnology Informatoin Gene Expression Omnibus database' reveló una disminución significativa en la expresión de Cortistatina en los hígados fibróticos e incluso cirróticos de los pacientes con respecto a la expresión en personas sanas en todas las patologías analizadas (**Fig. 33**).

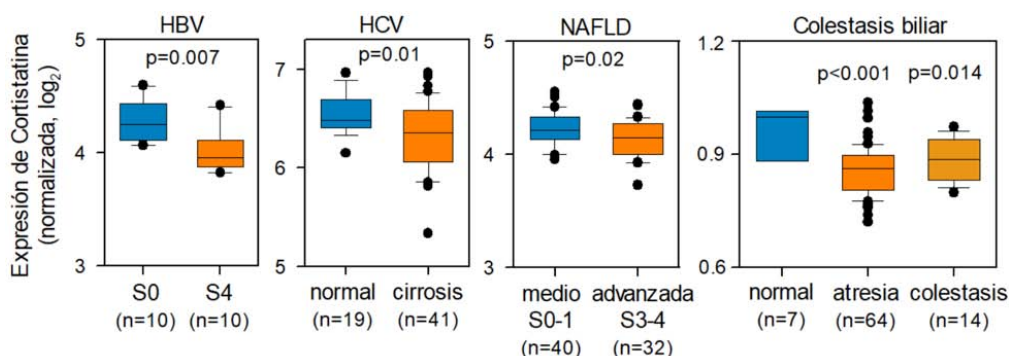


Figura 33. Expresión de Cortistatina en pacientes con enfermedades hepáticas asociadas a fibrosis.

HBV: virus de la hepatitis B, HCV: virus de la hepatitis C, NAFLD: enfermedad de hígado graso no alcohólico. S: grado de daño.

Lo que coincide además con lo observado durante otros estudios en los que se detectó también la menor expresión de otro factor anti-fibrótico, Grelina, en pacientes con esclerodermia¹⁸⁶, y también menores niveles séricos de Grelina en pacientes con fibrosis hepática derivada de hepatitis alcohólica y de hepatitis C crónica¹⁸⁷. Estos datos junto con los resultados preliminares antes presentados hacen patente la existencia de una regulación de la expresión de ambos factores ante el daño tisular generado y durante la progresión de la fibrosis.

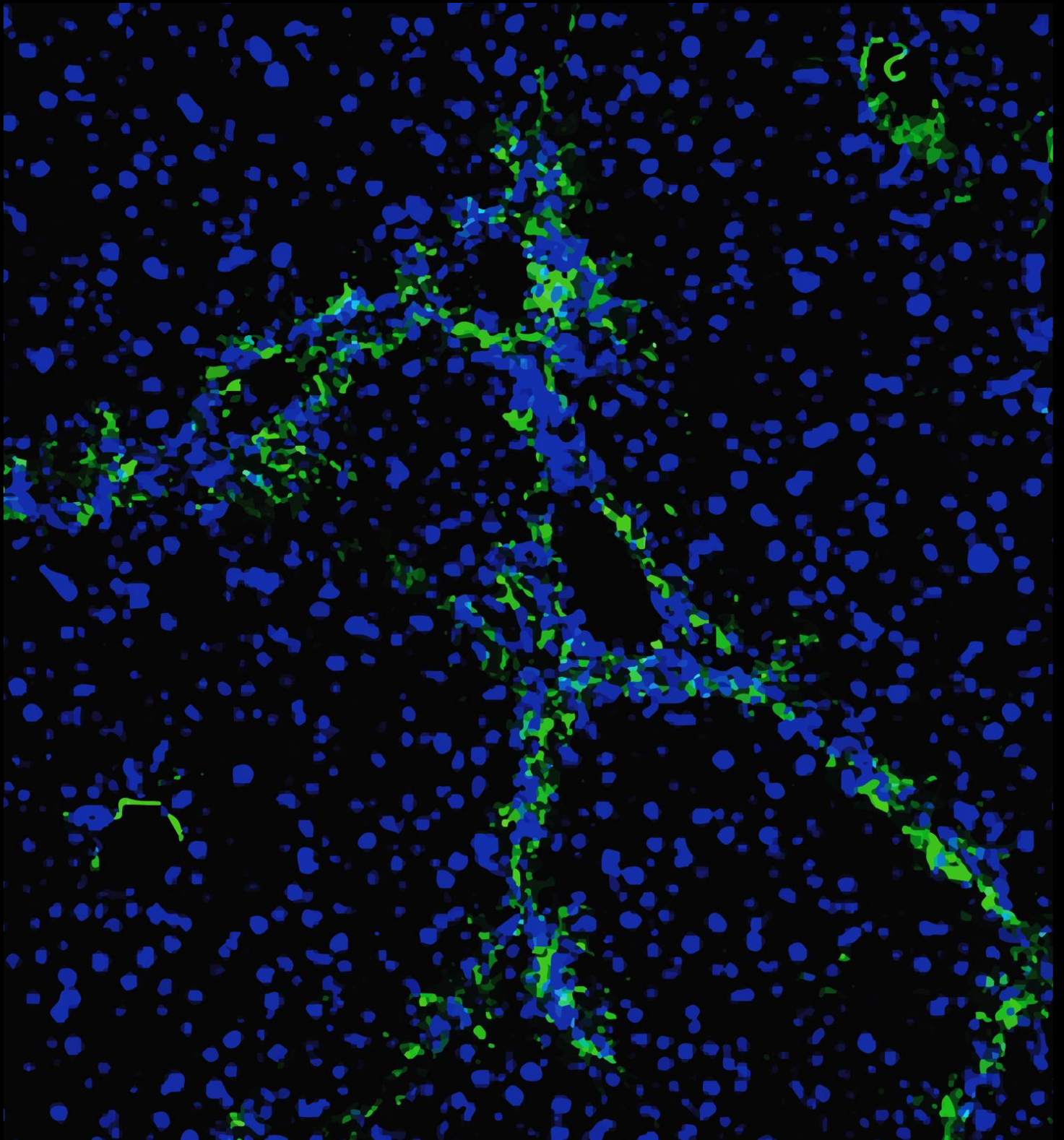
Se ha descrito también la expresión tanto de Cortistatina como de sus receptores, SSTR y GHSR, en células efectoras de la respuesta fibrogénica como son los fibroblastos de piel, pulmón y corazón y las células estrelladas hepáticas^{179,188-191}. Expresión que también ha sido detectada en otras células que, aunque no son de carácter fibrogénico directo, sí se ha demostrado su intervención en el desarrollo de la fibrosis, como son las células endoteliales, las células del músculo liso, los pericitos vasculares o las células mesangiales^{179,180,192}. Por tanto, Cortistatina podría ejercer sus funciones directas sobre estos tejidos y poblaciones celulares además de participar en el establecimiento de una comunicación bidireccional entre todos estos elementos. Es decir, que la administración de Cortistatina podría conseguir modular la participación de diversas poblaciones celulares, con implicación tanto directa como indirecta en la respuesta fibrogénica, en el microambiente interno del tejido dañado. De hecho, la capacidad de Cortistatina para regular multitud de citoquinas y quimioquinas inflamatorias permite modular la tormenta citoquímica que se genera tras un daño en el tejido y que tiene un importante papel en el desencadenamiento de la respuesta fibrogénica.

Asimismo, diferentes estudios han mostrado la capacidad de Cortistatina para evitar la aparición de fibrosis en los tejidos afectados durante el desarrollo de modelos experimentales como los de sepsis, RA, EAE, aterosclerosis o miocarditis autoinmune¹¹⁴⁻¹¹⁹. La administración de Cortistatina como tratamiento para la endotoxemia letal llevó también una menor expresión de componentes inflamatorios debido a la desactivación de macrófagos tanto residentes como infiltrantes¹⁷⁶. Esta capacidad de Cortistatina para modular la activación de los macrófagos fue también observada durante el estudio del papel de este neuropéptido sobre el desarrollo de la enfermedad de la aterosclerosis, donde se encontró que Cortistatina era capaz de inhibir la progresión de dicha enfermedad y la formación de células espumosas promoviendo el eflujo de colesterol en los macrófagos a través del aumento de la expresión de PPAR γ (factor que también ha sido relacionado con la disminución de la respuesta fibrótica)¹⁸⁰. Además, es interesante el hecho de que Cortistatina también sea capaz de inhibir la activación inducida por PDGF de células del músculo liso, al igual que su proliferación y migración, a través de mecanismos que involucran los SSTR y GHSR, y la inhibición de la ruta de Akt, ERK y p38 MAPK¹⁹², ya que podría ejercer esos mismos efectos sobre las células fibrogénicas.

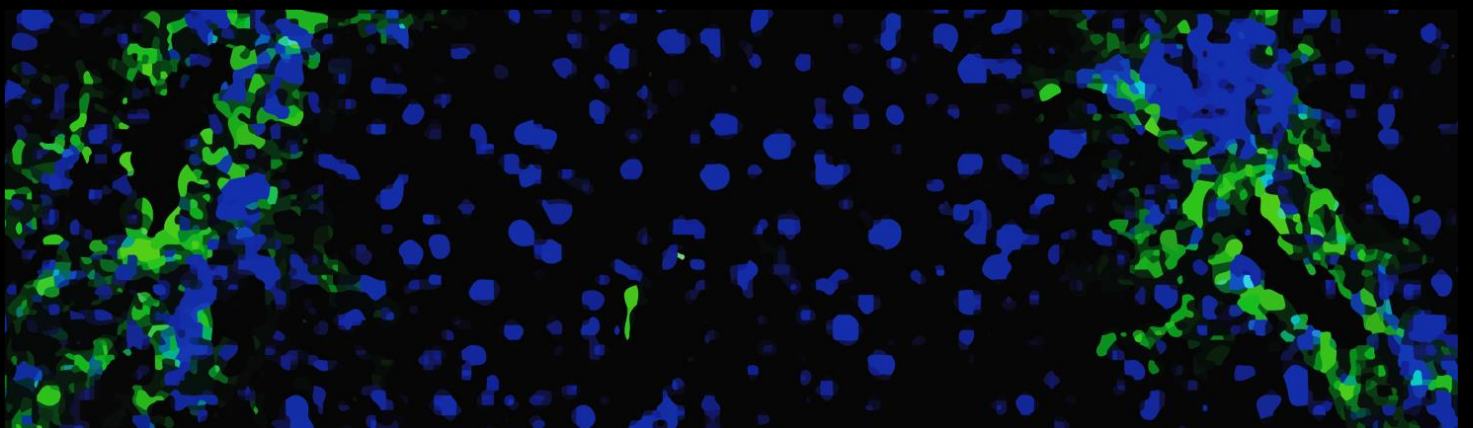
La habilidad de Cortistatina para unirse tanto a los receptores SSTR como a GHSR es de gran interés para este estudio. Esto es debido a que diversos estudios han identificado a Somatostatina,

a Grelina y a otros agonistas de sus receptores (SOM230, Octreótido), como factores anti-fibróticos^{187,191,193}. Por tanto, Cortistatina, al poder unirse a ambos tipos de receptores, podría hacer converger de forma sinérgica una respuesta anti-fibrótica directa mucho más potente que estos factores por separado.

Teniendo todo lo anterior presente, cabe preguntarse si todas estas características y propiedades de Cortistatina podrían ser trasladadas al desarrollo de la fibrosis hepática de forma que este neuropéptido pueda estar ejerciendo un papel modulador de la respuesta fibrogénica en el hígado, de tal forma que su ausencia afecte negativamente al desarrollo de la enfermedad y su administración pueda considerarse una posible terapia para ésta.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



La fibrosis hepática consiste en una respuesta anormal de reparación tisular ante un daño en el tejido hepático que conlleva la excesiva generación de matriz extracelular. Entre los numerosos elementos que toman parte en las etapas que se van sucediendo durante su desarrollo se encuentran mediadores inflamatorios (células del sistema inmunitario, citoquinas, quimioquinas) y células efectoras fibrogénicas como las células estrelladas hepáticas activadas y diferenciadas a miofibroblastos. A través de todos estos elementos, la respuesta fibrogénica tiene que ser finamente controlada en extensión y duración, para que no pase de ser un proceso de reparación fisiológico a uno patológico que pueda llevar al fallo orgánico o incluso a la muerte del propio individuo. Por ello, es necesaria la búsqueda de factores endógenos que jueguen un papel clave en la regulación del desarrollo y la progresión de la fibrosis hepática y que puedan ser capaces de regular las distintas fases de la respuesta fibrogénica, ya sea actuando en conjunto o de forma más concreta sobre algunos de los elementos implicados. Dentro del marco de la hipótesis de esta tesis doctoral, pensamos que el neuropéptido Cortistatina podría ser uno de esos factores endógenos con capacidad reguladora en procesos patológicos asociados a daño tisular como es la fibrosis hepática. Además de su capacidad anti-inflamatoria y reguladora de la respuesta inmunitaria, Cortistatina podría ejercer efectos anti-fibróticos directos. De esta forma, la deficiencia total o parcial de este neuropéptido implicaría una mayor progresión y severidad de la fibrosis hepática, mientras que su administración como posible terapia anti-fibrótica podría limitar el desarrollo de la misma e incluso promover la resolución del daño ya establecido.

Para demostrar esta hipótesis, se han planteado los siguientes **Objetivos Generales**:

- **Objetivo 1:** Estudiar el papel endógeno de Cortistatina en el desarrollo de la fibrosis hepática experimental.
- **Objetivo 2:** Estudiar el efecto directo de Cortistatina sobre las células efectoras de la respuesta fibrogénica en el hígado.
- **Objetivo 3:** Estudiar el efecto terapéutico de la administración de Cortistatina en modelos experimentales de fibrosis hepática.

Para el abordaje de estos **Objetivos** se plantearon las siguientes **estrategias experimentales**:

Como parte del *Objetivo 1*, confirmamos los resultados preliminares descritos en la introducción en relación a la expresión de Cortistatina en pacientes con patologías asociadas a la fibrosis hepática. Para ello, analizamos la expresión de este neuropéptido en hígado de ratón y en las principales poblaciones celulares del tejido hepático implicadas en la respuesta fibrogénica, tanto en condiciones sanas como de inducción de fibrosis hepática. El papel endógeno de cortistatina se abordó desarrollando dos modelos experimentales de fibrosis hepática en ratones con distinta

dotación genética para este neuropéptido, incluyendo animales con dotación normal (*Cort+/+*), con deficiencia parcial (*Cort+/-*) y con deficiencia total (*Cort-/-*). Los modelos experimentales elegidos fueron, por un lado un modelo de fibrosis hepática colestática inducido mediante ligación del ducto biliar común, que se corresponde con un modelo preclínico de daño hepático similar al que desarrollan pacientes con cirrosis primaria biliar o colangitis esclerosante, y por otro lado, un modelo de fibrosis hepática tóxica inducida por CCl_4 , que se asemeja a la fibrosis presente en pacientes con hepatitis crónica viral, esteatohepatitis no alcohólica y otras enfermedades asociadas a hepatotoxicidad. Analizamos cómo la deficiencia en cortistatina afectaba a la tasa de supervivencia, al daño tisular asociado al desarrollo de fibrosis, la expresión de marcadores fibróticos, la capacidad funcional hepática y la respuesta inflamatoria en los hígados (**Fig. 34**).

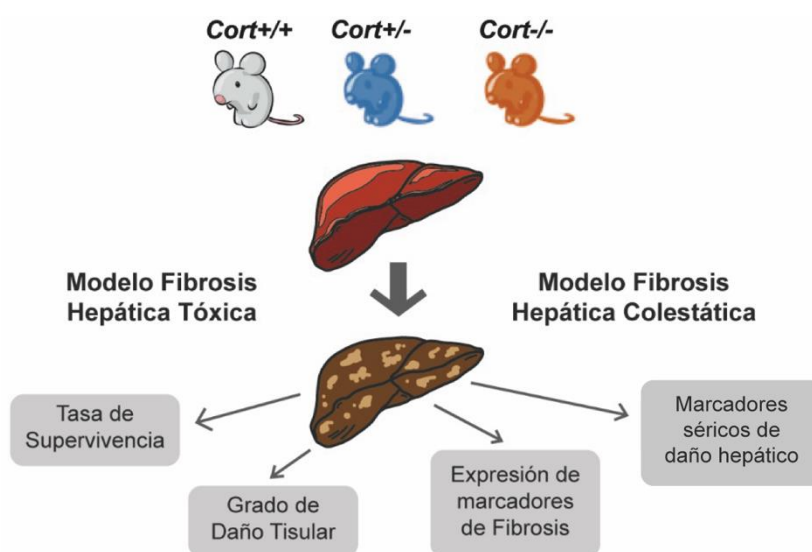


Figura 34. Estrategias principales para el abordaje del *Objetivo 1*.

Para llevar a cabo el *Objetivo 2*, aislamos en primer lugar HSCs de hígados de ratones *Cort+/+* y *Cort-/-* y analizamos la respuesta fibrogénica y su capacidad de diferenciación a miofibroblastos activados *in vitro*, así como su perfil genético por RNAseq de nueva generación. Por otro lado, examinamos el efecto de la administración de cortistatina en cultivos de HSCs de ambos genotipos para estudiar la acción directa de este neuropéptido en las principales células fibrogénicas del hígado. Además, investigamos la potencial actividad antifibrótica de cortistatina en un escenario más cercano al de un paciente mediante el uso de líneas de HSCs humanas (LX2 y HHStC) y de fibroblastos primarios humanos, analizando su activación y diferenciación a miofibroblastos y sobre su capacidad de contracción celular (**Fig. 35**). Por último, la identificación de los receptores implicados en el potencial efecto antifibrótico de cortistatina se abordó con el uso de antagonistas específicos de SSTR y GHSR1 en cultivos de HSCs.

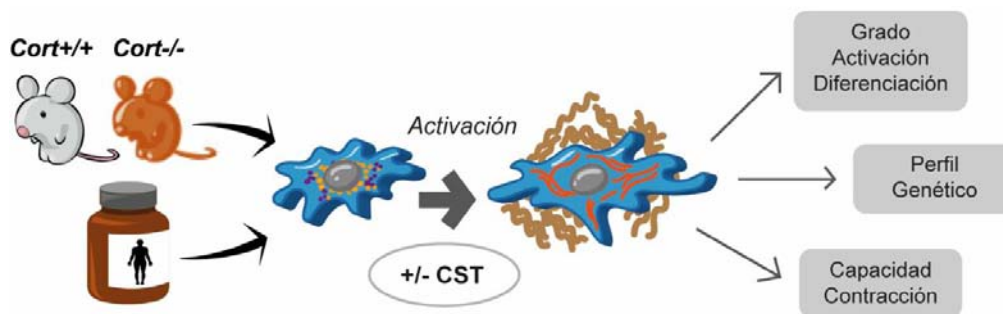


Figura 35. Estrategias principales para el abordaje del *Objetivo 2*.

El estudio del efecto terapéutico de cortistatina en el desarrollo y severidad de fibrosis hepática planteado en el *Objetivo 3* se llevó a cabo en los modelos experimentales de fibrosis hepática colestática y fibrosis hepática tóxica, inducidos en ratones *Cort+/+*, *Cort+/-* y *Cort-/-* y usando una amplia ventana de intervención con cortistatina que incluía un régimen de tratamiento protector temprano y un régimen de tratamiento terapéutico tardío. Analizamos la tasa de supervivencia, el daño tisular asociado al desarrollo de la fibrosis, la expresión de marcadores fibróticos y la capacidad funcional de los hígados de los ratones tratados con vehículo o con Cortistatina (**Fig. 36**).

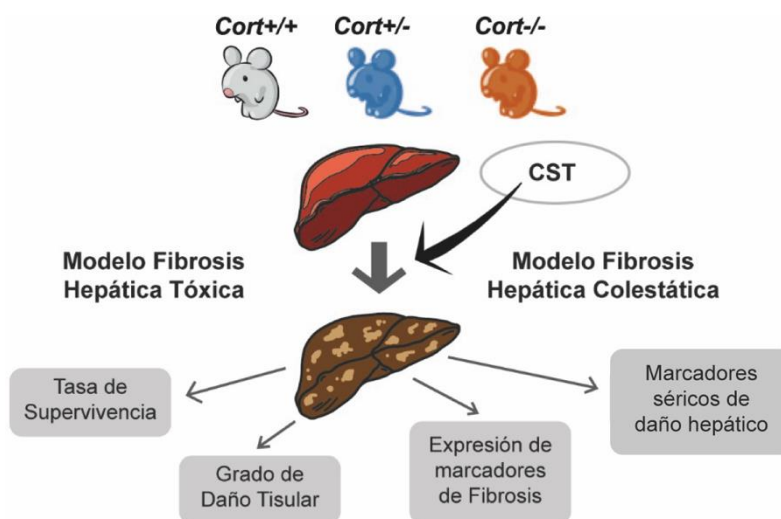
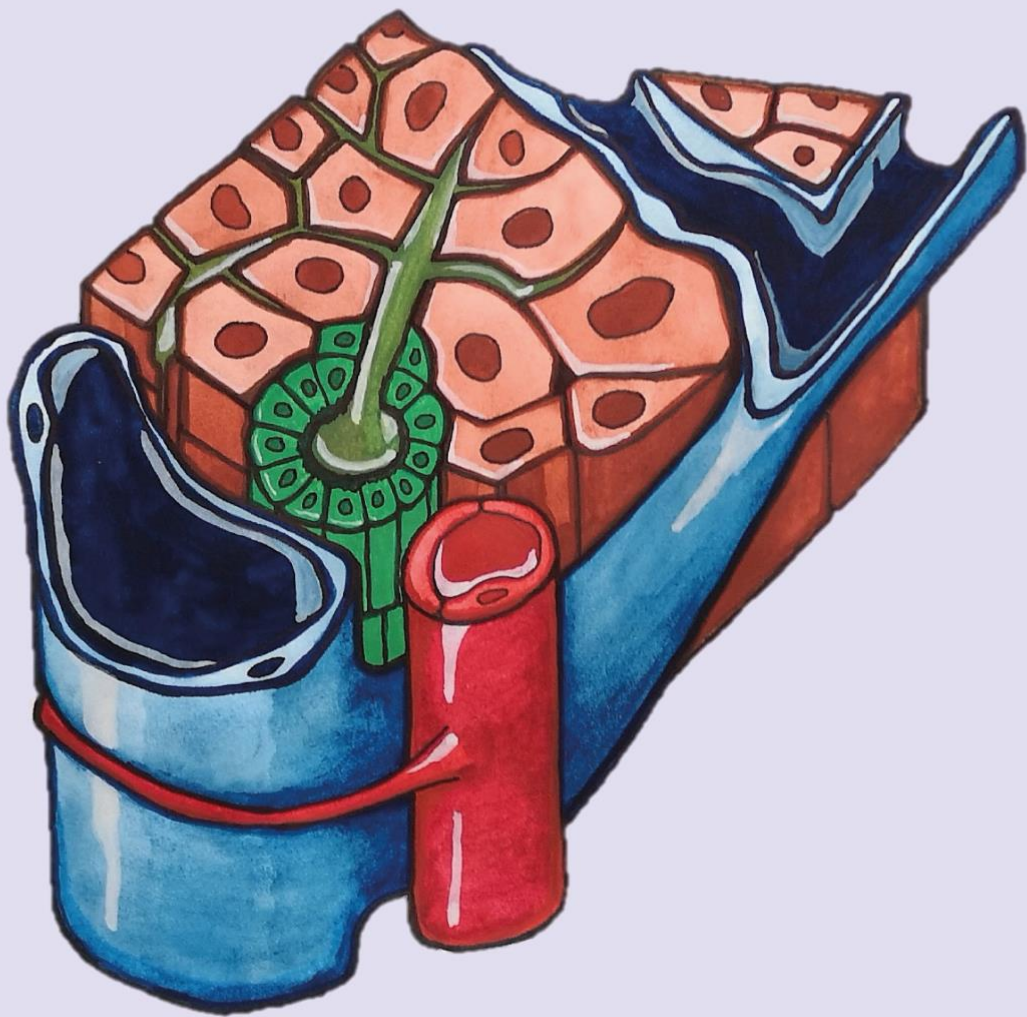


Figura 36. Estrategias principales para el abordaje del *Objetivo 3*.



Acuarela
Raquel Benítez Ruiz

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBJETIVO 1. Estudiar el papel endógeno de Cortistatina en el desarrollo de la fibrosis hepática experimental.

Teniendo presente las distintas etiologías de las enfermedades hepáticas asociadas al desarrollo de fibrosis, para este primer objetivo se trabajó con dos modelos experimentales de fibrosis hepática, uno contemplando un daño hepatotóxico y otro un daño de tipo colestático. Ambos modelos fueron inducidos en ratones C57BL/6J de la misma camada con distinta dotación génica para Cortistatina para de ese modo estudiar el efecto de la presencia/ausencia endógena de este neuropéptido en el desarrollo de la fibrosis hepática.

3.1.1 Animales de experimentación.

Todos los procedimientos experimentales necesarios para la realización de esta tesis doctoral se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices éticas europeas (Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo) y fueron aprobados por el Comité de la Unidad de Cuidado Animal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España (CSIC).

Durante el estudio de los efectos de la deficiencia endógena de Cortistatina en modelos experimentales de fibrosis hepática fueron empleados ratones C57BL/6J (3 meses de edad), tanto hembras como machos, con dotación génica total para este neuropéptido (ratones *Cort+/+*) y dos cepas de ratones C57BL/6J con dotación génica para Cortistatina modificada: ratones con expresión génica nula (*Cort-/-*) y ratones con expresión génica parcial (*Cort+/-*). La colonia *Cort-/-* fue generada en colaboración con el Dr. Luis de Lecea de la Universidad de Standford siguiendo protocolos descritos previamente¹⁹⁴. Mediante el cruce de ratones C57BL/6J *Cort-/-* hembra con ratones macho C57BL/6J *Cort+/+* se generaron las parejas reproductores de ratones *Cort+/-* que con su cruce dieron lugar a la colonia de ratones de los 3 genotipos en colaboración con la Unidad de Experimentación Animal del Instituto de Parasitología y Biomedicina López – Neyra. Todos los animales se alojaron en un entorno de temperatura y humedad controladas en jaulas individuales (10 ratones por jaula, con virutas de madera y material de anidación) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y agua corriente ad libitum.

3.1.2 Modelo experimental de fibrosis hepática colestática.

El modelo de fibrosis hepática colestática fue inducido mediante la ligación del ducto biliar común (BDL, del inglés *Bile duct ligation*).

Para la realización de este procedimiento los ratones *Cort+/+*, *Cort+/-* y *Cort-/-* fueron anestesiados mediante administración intraperitoneal de la solución xilacina (10mg/kg)-ketamina (80 mg/kg). Mediante una laparotomía de la línea media se abrió la cavidad peritoneal y tras levantar el hígado

con un hisopo de algodón humedecido en PBS se movió el intestino para exponer el ducto biliar, que fue separado muy cuidadosamente de la vena porta y la arteria hepática. Con ayuda de unas pinzas y seda del 6-0 se realizaron dos ligaciones alrededor del ducto biliar común, primero una por encima del duodeno y la segunda cerca del hilio del hígado, con dos nudos quirúrgicos cada una (**Fig. 37**). Una vez realizado este proceso se enjuagó la cavidad peritoneal con una solución de PBS, se recolocaron los órganos abdominales en las posiciones normales y se cerraron con suturas las capas abdominales tanto del peritoneo como de la piel. Tras un periodo de recuperación se les devolvió a sus respectivas cajas observando posibles complicaciones.

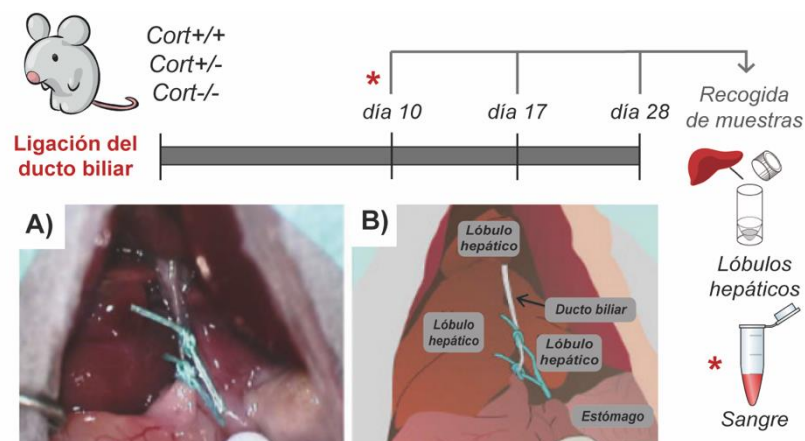


Figura 37. Modelo experimental de fibrosis hepática colestática inducida mediante ligación del ducto biliar.

La correcta realización del modelo conllevó un gran aumento del volumen de la vesícula biliar al verse afectado el flujo biliar y la adquisición del característico tono amarillo en el tejido epitelial de los ratones con daño hepático (**Fig. 38**).

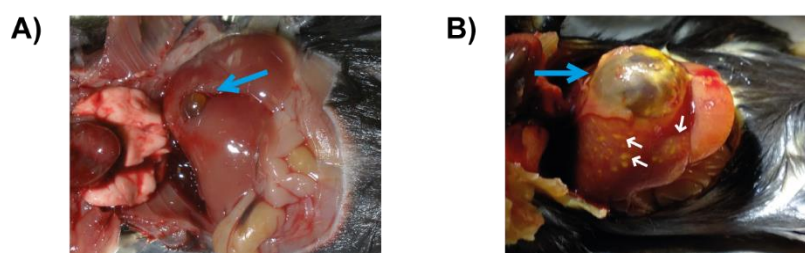


Figura 38. Signos macroscópicos de la evolución del modelo de fibrosis hepática colestática.

A) Ratón *Cort+/-* sin fibrosis hepática colestática. B) Ratón *Cort-/-* con fibrosis hepática colestática. Flechas azules: Vesícula biliar. Flechas blancas: daños macroscópicos en el tejido hepático.

A lo largo del modelo, debido a los daños asociados al desarrollo de la fibrosis hepática generada, se fueron produciendo bajas en el número de ratones y las fechas en cuestión fueron anotadas para la realización de una curva de supervivencia.

Para estudiar el desarrollo de la fibrosis hepática a lo largo del modelo se tomaron muestras a 10, 17 y 28 días tras el comienzo del modelo. Los ratones *Cort+/-*, *Cort+/-* y *Cort-/-* fueron sacrificados

mediante inhalación de CO₂ en las fechas señaladas y se recogieron muestras de sangre a día 10 tras la inducción del modelo y de tejido hepático (lóbulos hepáticos) a los 10, 17 y 28 días.

La sangre fue obtenida directamente del corazón utilizando para ello una jeringa de 23G y fue procesada a continuación para obtener el plasma de cada muestra según se describirá en el apartado 3.1.7. Los lóbulos hepáticos fueron separados y almacenados según el análisis posterior que se fuese a realizar: para el estudio histológico los lóbulos fueron fijados en formalina tamponada al 10% y para el estudio de expresión génica en las muestras recogidas y guardadas en criotubos fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas -80°C.

3.1.3 Modelo experimental de fibrosis hepática tóxica.

El modelo de fibrosis hepática tóxica fue inducido mediante administración intraperitoneal de CCl₄ (*Sigma*, 289116).

Para la realización de este objetivo el agente tóxico CCl₄ fue disuelto en el vehículo aceite de oliva (*Sigma Aldrich*, O1514) inicialmente en una proporción 1:3. Sin embargo, la administración de CCl₄ a esta concentración se tradujo en un 80% de mortalidad en ratones con deficiencia parcial y total en Cortistatina, hecho que en sí mismo confirmó nuestra hipótesis de partida acerca de una mayor susceptibilidad ante la deficiencia en Cortistatina. Teniendo presente esta elevada mortalidad, la administración de CCl₄ se realizó finalmente con una proporción de 1:9, es decir, con una dilución 3 veces mayor. La administración de CCl₄ en los animales (*Cort+/+*, *Cort+/-* y *Cort-/-*) fue llevada a cabo mediante inyecciones intraperitoneales (0.5µL/g de ratón) 2 veces por semana durante un total de 6 semanas (**Fig. 39**).

Durante el desarrollo de este modelo experimental se tomó nota de las bajas que se fueron produciendo para poder realizar el estudio de la mortalidad de las 3 cepas de ratón sometidas al daño hepatotóxico.

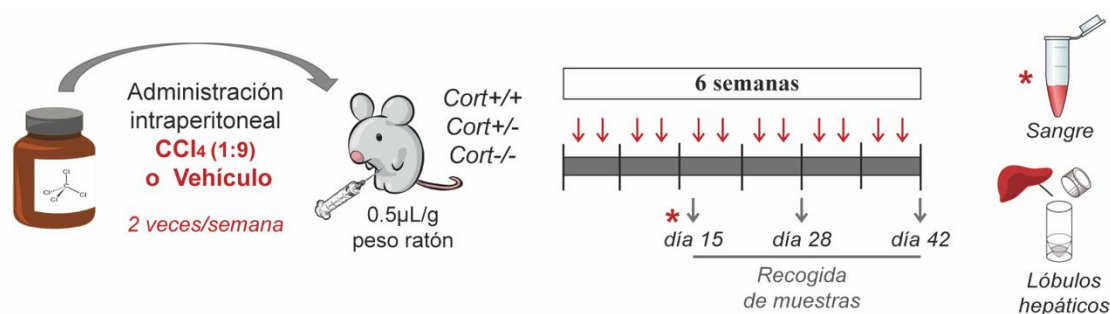


Figura 39. Modelo experimental de fibrosis hepática tóxica inducida por CCl₄.

Para estudiar el desarrollo de la fibrosis hepática a lo largo del modelo, tras el sacrificio de los ratones por CO₂, se tomaron muestras de tejido hepático a 15, 28 y 42 días tras el comienzo del

modelo y de sangre a día 15 como queda reflejado en la **Figura 39**. Estas muestras fueron procesadas tal como se describió previamente en el apartado 3.1.2.

3.1.4 Estudio histológico.

Durante la realización de los modelos experimentales se obtuvieron lóbulos hepáticos que fueron fijados en formalina tamponada al 10 % (*Panreac AppliChem, 252931.1211*) a temperatura ambiente durante 48h (h) (con renovación de la formalina a las 24h) y deshidratadas en etanol 70%. Con la colaboración del Dr. Francisco O'Valle, Universidad de Granada, se procedió a la inclusión de las muestras en parafina para la generación de moldes solidificados de este hidrocarburo. Para ello los lóbulos hepáticos fueron divididos primero en dos longitudinalmente de manera que se expusiera la mayor área posible de tejido y ambas partes de cada muestra se colocaron con la orientación adecuada (manteniendo esa mayor exposición de área tisular) dentro de casetes. Mediante un procesador automático los casetes con las muestras de tejido fueron embebidos en una serie de etanoles en orden creciente en concentración para conseguir su deshidratación total (etanol 70% -1h, etanol 96% - 2h, etanol absoluto - 3h) seguido de xileno durante 3h y parafina durante 4h. Los bloques sólidos de tejido embebido en parafina que se generaron fueron cortados con microtomo (*Leica RM2125 RTS*) obteniéndose secciones secuenciales con un grosor de 4µm que fueron recogidas sobre portaobjetos y almacenadas hasta continuar con su procesamiento. Para tener una visión más representativa del tejido se realizaron varias rondas de cortes de los que se recogieron secciones a distinta profundidad.

El estudio histológico de los daños presentes en el tejido hepático se realizó a continuación mediante técnicas de tinción Hematoxilina-Eosina (H/E) y Rojo Sirio, y de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) con marcaje de α SMA para la identificación de miofibroblastos activados.

Durante el desarrollo del modelo de fibrosis hepática tóxica algunos ratones presentaron daños en los pulmones. Para analizar estos daños se realizó el mismo procedimiento de fijación y generación de bloques sólidos de parafina que se ha descrito previamente y tras obtener los cortes histológicos pertinentes se procedió con las tinciones H/E y Pentacrómico de Russel Movat.

3.1.4.1 Tinción Hematoxilina Eosina.

Las secciones de 4µm cortadas de las muestras de tejido hepático embebido en parafina fueron fijadas a los portaobjetos con un tratamiento térmico de 10 minutos (min) a 60°C. A continuación, las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas a través de la serie de soluciones recogida en la **Figura 40**.

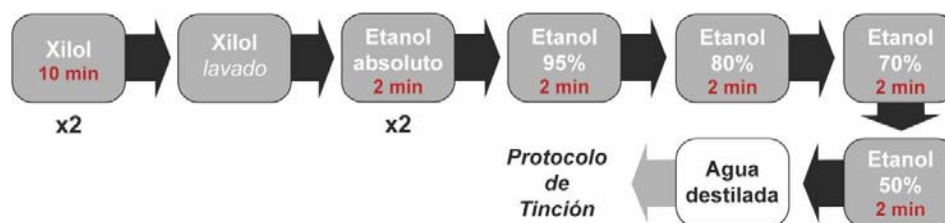


Figura 40. Secuencia de soluciones para desparafinar y rehidratar cortes de tejido embebido en parafina.

Tras este procedimiento, se realizó la tinción H/E. Esta tinción permite observar el grado de infiltración celular del tejido al marcar en tono violeta-azulado el material genético por la hematoxilina (debido a su afinidad por estructuras ácidas) y en rosa-anaranjado el material citoplasmático por la eosina (debido a su afinidad por las estructuras básicas que se encuentran en él). Para ello, los cortes fueron teñidos con Hematoxilina de Mayer (*Master Diagnostica, MAD-108.1000*) durante 8min, lavados con etanol 95% y agua destilada y finalmente teñidos también con Eosina alcohólica (*Master Diagnostica, MAD-109.1000*) durante 45 segundos (seg). Posteriormente, los cortes fueron de nuevo lavados en agua destilada, deshidratados con etanol 70%, etanol 95%, etanol absoluto y xilol (secuencialmente) y montados con Entellan (*Merk, 1.07961.0500*).

La extensión de la infiltración celular y el daño hepático fue evaluada utilizando imágenes adquiridas con el microscopio de campo claro (*Zeiss Axio Scope A1*) y los softwares *Zen 2011 Ligh Edition* y *FIJI (Image J)*. Los resultados cuantitativos fueron expresados como la media de los valores obtenidos al evaluar 10 áreas elegidas aleatoriamente en 4 secciones distintas por ratón.

3.1.4.2 Tinción Rojo Sirio.

Tras el mismo proceso de fijación por calor descrito en el apartado 3.1.4.1 se procedió a la desparafinación y rehidratación de los cortes histológicos obtenidos de tejido hepático. Para ello se siguió la secuencia de soluciones de la **Figura 40** hasta la solución de etanol 70% en la que las muestras fueron mantenidas durante un total de 48h. A continuación, los cortes histológicos fueron teñidos con una solución de Rojo Sirio (*Sigma Aldrich, 365548*) al 0.1% disuelto en una solución acuosa saturada de ácido pícrico (*Labortechnik, 251049.161*) durante 35min. Pasado este tiempo los cortes fueron nuevamente deshidratados y montados con Entellan.

La tinción Rojo Sirio permite estudiar el grado de daño asociado a la generación de ECM-colágeno durante el desarrollo de la fibrosis. Gracias a esta técnica los componentes colagenosos y no colagenosos se vieron teñidos de rojo y naranja respectivamente y la extensión del daño hepático pudo ser evaluada utilizando imágenes obtenidas con microscopio de campo claro (*Zeiss Axio Scope A1*) y el software *Zen 2011 Ligh Edition*. El porcentaje de área fibrótica determinado por el marcaje en rojo del colágeno generado fue calculado utilizando el software de análisis de imagen *FIJI (Image J)* aplicando el método de umbralización (*'thresholding'*) a las imágenes en el canal

verde como se puede observar en la **Figura 41**. Los resultados cuantitativos fueron expresados como la media de los valores obtenidos al evaluar 10 áreas elegidas aleatoriamente en 4 secciones distintas por ratón, evitando áreas que contuviesen la cápsula de Glisson.

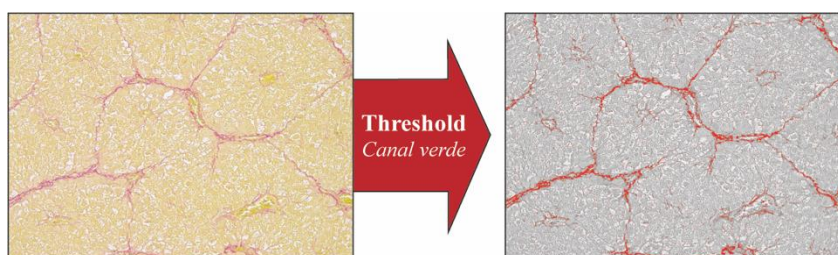


Figura 41. Análisis imagen % área fibrosis mediante FIJI (Image J).

Otra medición que se realizó para estudiar el daño tisular asociado a la generación de colágeno fue el análisis del entramado fibrótico generado que se asoció con distintos grados de fibrosis hepática según la escala Ishak. Aunque algunos autores asignan grados de 0 a 6^{195, 196} (siendo 0 un hígado sin fibrosis y 6 un hígado completamente cirrótico), en esta tesis se ha trabajado con una escala de Ishak reducida. Esta escala reducida sólo contempla grados del 0 al 4 (**Fig. 42**), excluyendo los niveles 5 y 6 al hacer estos referencia a un grado de daño tisular muy avanzado, asociado a cirrosis, que no fue alcanzado durante el desarrollo de nuestros modelos experimentales. Sin embargo, hay que tener presente que este tipo de observaciones, independientemente de la precisión con que sean definidas, contienen un elemento subjetivo relacionado con el observador y por tanto existe cierto grado de variabilidad. Por ello, y para evitar un aumento de dicha variabilidad, todas las imágenes fueron analizadas por el mismo observador.

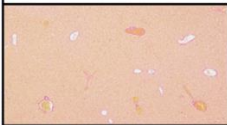
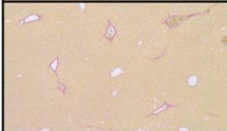
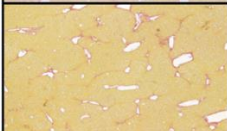
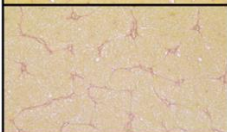
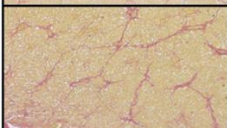
APARIENCIA	DESCRIPCIÓN CATEGÓRICA	GRADO
	<i>Sin fibrosis - Tejido normal</i>	0
	<i>Expansión fibrosa de algunas zonas portales +/- septos fibrosos cortos</i>	1
	<i>Expansión fibrosa de la mayoría de las zonas portales +/- septos fibrosos cortos</i>	2
	<i>Expansión fibrosa de la mayoría de zonas portales con uniones entre espacios portales (P-P) ocasionales</i>	3
	<i>Expansión fibrosa de zonas portales con marcadas uniones (P-P) al igual que entre espacios porta y centrales</i>	4

Figura 42. Escala Ishak reducida.

Dependiendo del entramado de tejido conectivo – fibroso (teñido de rojo mediante la tinción Rojo Sirio) se asignan grados asociados al desarrollo de la fibrosis hepática. Imágenes propias tomadas de muestras evaluadas durante esta tesis doctoral.

3.1.4.3 Inmunofluorescencia indirecta para detección de α SMA.

Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta evaluamos la expresión tisular de α SMA como marcador de diferenciación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica en miofibroblastos activados.

Los cortes histológicos de tejido hepático fueron desparafinados y rehidratados para a continuación realizar el desenmascaramiento antigénico (proceso que permite revelar epítomos que se han enmascarado tras la preservación en formalina), durante el cual los portaobjetos con los cortes adheridos fueron sumergidos durante 20min en una solución de citrato sódico a pH 6.0 y 95°C.

Tras este procedimiento, se lavaron las muestras en una solución PBS 1X – 0.025% Tritón X-100 (*Sigma Aldrich, T8787*), se realizó un círculo hidrófobo alrededor de los cortes en los portaobjetos utilizando para ello un rotulador ‘*Liquid Blocker*’ (*Sigma Aldrich, Z377821*), de forma que el volumen de administración del resto de reactivos se pudo reducir a 50 μ L/corte que se veían retenidos en el interior del círculo realizado. Las muestras fueron bloqueadas en una solución PBS 1X – 1% BSA (*Sigma Aldrich, A7030*) y 10% Suero de Cabra (*Sigma Aldrich, G9023*), durante 2h a temperatura ambiente (T^a amb) para evitar interacciones cruzadas indeseadas y, a continuación, se incubaron durante la noche (O/N) a 4°C con el anticuerpo primario monoclonal anti – α SMA de ratón (*Sigma Aldrich, A5228*) a una concentración 1:1000 en PBS 1X – 1% BSA. Pasado ese tiempo, las muestras fueron incubadas durante 1h a T^a amb con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 cabra anti – IgG (H+L) de ratón (*Life technologies, A11029*) a una concentración de 1:1000 en PBS1X – 1% BSA y, finalmente, los núcleos de las muestras fueron marcados con DAPI (*Sigma Aldrich, 32670*) a dilución de 1:1000 durante 5min a T^a amb antes de ser montados con Mowiol.

La adquisición de imágenes se realizó con el microscopio de fluorescencia *Olympus IX81* con un aumento de 20X y el software *CellSens Imaging*. Para el análisis de imagen el programa utilizado fue el software *FIJI (Image J)*. Los resultados cuantitativos fueron expresados como la media de los valores obtenidos al evaluar 10 áreas elegidas aleatoriamente en 2 secciones distintas por ratón.

3.1.4.4 Tinción Pentacrómico de Russell Movat.

Tras la finalización del modelo experimental de fibrosis hepática inducida por CCl₄ se recogieron también muestras de tejido pulmonar y se procesaron de la misma forma que el tejido hepático.

Los cortes realizados a estas muestras fueron desparafinados y rehidratados como se ha descrito previamente (**Fig. 40**). A continuación, fueron teñidos durante 15-30min con la solución Verhoeff compuesta por 2% Yodo (*Sigma Aldrich, 207772*) y 4% Yodato Potásico (*Sigma Aldrich, 438464*)

en agua destilada (dH₂O), y lavados en dH₂O antes de diferenciarse en una solución de Cloruro Férrico al 2% (*Sigma Aldrich, 157740*), 20seg. Durante 1min, las muestras fueron teñidas con una solución de Tiosulfato de Sodio al 5% (*Sigma Aldrich, 72049*), luego lavadas y tratadas durante 3min con 3% Ácido Acético Glacial (*Sigma Aldrich, 1.00063*). Tras este tratamiento, se tiñó con una solución de Azul de Alcian (*Sigma Aldrich, A5268*) al 1% y pH2.5 durante 15-30min, se lavaron los cortes y se volvieron a teñir durante 2min con una solución de 90% Escarlata de Biedrich (*BDH GURR, 340094X*) – 10% Fucsina Ácida (*Panreac, 251331-1605*). Finalmente, tras varios lavados, las muestras fueron tratadas durante 7min con 5% Ácido fosfotúngstico (*Panreac, 121032.1608*) y lavadas con una solución de Ácido Acético al 1% antes de ser deshidratadas, lavadas en xileno y montadas con Entellan (*Sigma Aldrich, 107961*).

Las imágenes de los cortes histológicos de tejido pulmonar teñido fueron tomadas con el microscopio de campo claro *Zeiss Axio Scope A1* y el software *Zen 2011 Ligh Edition*, y se realizó un estudio cualitativo comparativo entre ellas.

3.1.5 Estudio del contenido de colágeno.

Como medida del contenido de colágeno generado durante la respuesta fibrogénica se cuantificó la cantidad de hidroxiprolina presente en las muestras de tejido hepático. La hidroxiprolina se presenta casi exclusivamente como componente de colágeno y, por tanto, su cuantificación permite una medida indirecta del colágeno generado en el tejido durante el desarrollo de la fibrosis hepática. Esta cuantificación se basa en la detección colorimétrica de un cromóforo liberado tras la hidrólisis del tejido, oxidación de los aminoácidos liberados y reacción con el compuesto DMAB - Solución de Elrich (**Fig. 43**).

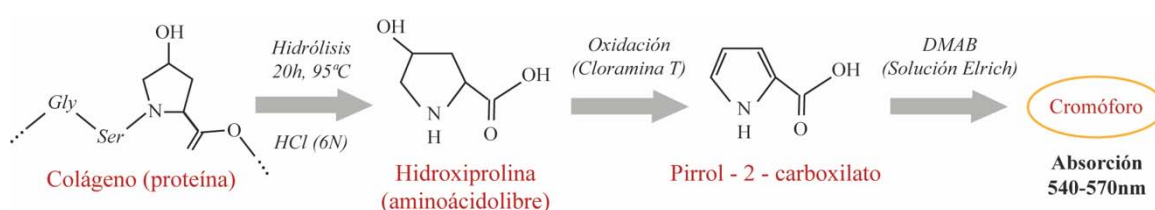


Figura 43. Reacciones químicas del proceso de detección de hidroxiprolina.

Las muestras de lóbulos hepáticos recogidos fueron pesadas y aproximadamente 100mg de tejido fueron hidrolizados en 1mL de 6N HCl durante 20h a 95°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas 15min a 13000g a T^a amb y los sobrenadantes fueron recogidos cuidadosamente. A continuación, estos sobrenadantes fueron diluidos con H₂O miliQ hasta una concentración final de HCl de 4N. Para establecer una posterior extrapolación se preparó una recta estándar de calibrado: 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2, 1.6, 0.8, 0 µg/mL de hidroxiprolina (*Sigma Aldrich, PHR1939*) en 4N HCl.

En una placa de 96 pocillos se añadieron 35µL de las muestras diluídas junto con 125µL de la solución de ensayo (1.27g Cloramina T (*Sigma Aldrich*, 402869), 20mL de 50% 1- Propanol (*Sigma Aldrich*, 279544), 80mL de solución Citrato Sódico a pH 6.5) a cada pocillo. De igual forma se añadieron 35µL de los estándares junto con 125µL de la solución ensayo por pocillo. Tras agitar la placa a 300rpm durante 25min en un agitador orbital, se añadieron a cada pocillo 125µL de la solución de Elrich (1.95g DMAB (*Sigma Aldrich*, D2004) en 13mL de la solución 1- Propanol: Ácido Perclórico 2:1 (*Sigma Aldrich*, 244252) y se realizó una incubación a 60°C durante 1h en oscuridad antes de medir las absorbancias a 550nm utilizando el lector de placas *VersaMax Microplate Reader* y el software *SoftMax Pro*.

Las medidas de absorbancias obtenidas para cada muestra fueron interpoladas en la recta estándar de calibrado y los valores de concentración de hidroxiprolina fueron convertidos en concentración de colágeno (µg/mg de tejido) teniendo presente el peso real de la muestra de tejido en cada caso y que la hidroxiprolina supone un 13.5% del colágeno total.

3.1.6 Estudio de expresión génica.

Para el estudio de la expresión génica se aisló el ARNm de las muestras de tejido hepático y se analizó la expresión de Cortistatina (*Cort*) y de marcadores de fibrosis como CTGF (*Ctgf*), αSMA (*αSma*), Colágeno (*Colla2*) y TGFβ1 (*Tgfβ1*). Durante todo el procedimiento el material utilizado fue libre de *DNasas* y *RNasas*.

3.1.6.1 Extracción de ARN.

Para llevar a cabo la extracción de ARNm de las muestras, a 100mg de tejido se les adicionaron 500µL de *TriPure Isolation Reagent* (*Roche*, 11667165001) para seguidamente disgregar las muestras mecánicamente utilizando el homogeneizador *T25 Ultra Turrax* a 13500 rpm durante 30seg. A continuación, una vez disgregadas, se añadieron otros 500µL de *TriPure Isolation Reagent* y se realizó una centrifugación de 10min a 12000g y a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se le añadieron 200µL de cloroformo (*Sigma Aldrich*, 40021) de forma que se mantuviera la relación de 200µL/mL de *TriPure Isolation Reagent*. Tras mezclar vigorosamente por inversión se dejó incubar la mezcla durante 10min a T^a amb antes de realizar una nueva centrifugación de 15min a 12000g y a 4°C. La fase acuosa generada conteniendo el ARN fue recogida e tratada durante 10min a T^a amb con una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (*Sigma Aldrich*, W205702) 24:1 (v/v), utilizando para ello el mismo volumen de esta solución que el volumen recogido de fase acuosa, de tal forma que se eliminen así las posibles contaminaciones debidas a fenoles. Después, las muestras se centrifugaron durante 15min a 12000 g y a 4°C, recogiéndose de nuevo la fase acuosa. Se añadieron 500µL de Isopropanol (*Sigma Aldrich*, I9516), manteniendo así la proporción 500µL/mL de *TriPure Isolation Reagent*, y se dejó incubar O/N a -20°C para precipitar el ARN obtenido.

Pasado ese tiempo, las muestras fueron centrifugadas durante 15min a 12000g y a 4°C. El sobrenadante fue descartado mediante decantación y el precipitado obtenido fue lavado 2 veces utilizando de Etanol 75% (se añadió 1mL de Etanol 75% a cada muestra y se centrifugaron durante 5min a 7600g y a 4°C). Se eliminó nuevamente el sobrenadante mediante decantación y el precipitado obtenido tras estos lavados se dejó secar hasta la eliminación completa de trazas del etanol utilizado. Una vez seco, el ARNm precipitado se resuspendió en H₂O libre de nucleasas y se calentó durante 15min a 65°C.

3.1.6.2 Retrotranscripción – Obtención del ADNc.

El ADN complementario (ADNc) se obtuvo a partir de 1µg del ARNm obtenido previamente de cada muestra utilizando para ello el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Thermo Scientific*, #K1622) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para ello primero se cuantificó la calidad y la cantidad de ARNm obtenido utilizando el espectrofotómetro *Nanodrop 1000*. Una vez determinada la concentración de ARNm, se trabajó con 1µg de este al que se le añadió H₂O libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 8µL. A continuación, se eliminó el posible ADN genómico utilizando para ello 1µL de *DNasa I* 1U/µL (*Sigma Aldrich*, *AMPD1*) y 1µL de *Reaction Buffer 10X* (*Sigma Aldrich*, *AMPD1*), de forma que se tuviera una concentración final de 1U/reacción para la DNasa I y 1X para la solución. La mezcla se dejó incubar 15min a T^a amb antes de añadir 1µL de *Stop Solution* 50mM (*Sigma Aldrich*, *AMPD1*) con el que se incubaron durante 5min a 65°C.

Una vez eliminado el ADN genómico se procedió a la retrotranscripción del ARNm. Manteniendo las muestras en hielo se añadieron 1µL de *RevertAid RT* (200U/µL), 1µL de *RiboLock RNase Inhibitor* (200U/µL), 1µL de *Random Hexamen Primer* 100 µM, 2µL de *dNTP mix* 10mM y 4µL de *Reaction Buffer 5X*, siendo todos reactivos del *ReverseAid First Strand cDNA Synthesis Kit*. El proceso de retrotranscripción se realizó en un termociclador con el siguiente programa de incubaciones: 5min-25°C, 60min-42°C, 5min-70°C. Las muestras finalmente fueron diluidas utilizando 46.6µL de H₂O libre de nucleasas y la concentración y calidad del ADNc fue medida utilizando el espectrofotómetro *Nanodrop*.

3.1.6.3 PCR cuantitativa.

Se realizaron PCR cuantitativas (qPCR, *quantitative Polymerase Chain Reaction*) para el análisis de la expresión génica de Cortistatina y de los marcadores de fibrosis CTGF, αSMA, colágeno y TGFβ1, utilizando para ello el kit *SensiFAST SYBR No-ROX Kit* (*Bioscience*, *Bio98050*) y la expresión de la proteína ribosómica ácida 60S P0 (RPLP0, del inglés *Ribosomal protein lateral stalk subunit P0*) como referencia para establecer comparativas.

Al ADNc correspondiente a 30ng de ARNm se le añadió *SensiFAST SYBR No-ROX Mix* a 1X, *primers forward* (Fw) y *reverse* (Rv) (**Tabla 3**) para cada gen a 125nM y H₂O libre de nucleasas hasta un volumen final de 20µL.

<i>Cort</i>	Fw: 5' - GCCTTCTGACTTTCCTTGCC - 3'	Rv: 5' - GAAAGCTCCCCGCTGATTGA - 3'
<i>Ctgf</i>	Fw: 5' - GCGAAGCTGACCTGGAGGAA - 3'	Rv: 5' - TTGGCGATTTAGGTGTC - 3'
<i>aSma</i>	Fw: 5' - CAGGGAGTAATGGTTGGAAT - 3'	Rv: 5' - TCTCAAACATAATCTGGGTCA - 3'
<i>Col1a2</i>	Fw: 5' - TCTCCTGGAAATGTTGGCCCATCT - 3'	Rv: 5' - AATCCGATGTTGCCAGCTTCACCT - 3'
<i>Tgfb1</i>	Fw: 5' - TGCGCTGCAGAGATTAATA - 3'	Rv: 5' - AGCCCTGTATCCGTCCTCCT - 3'
<i>Rplp0</i>	Fw: 5' - TGCACTCTCGCTTCTTGAG - 3'	Rv: 5' - CTGACTTGTTGCTTTGGCG - 3'

Tabla 3. Secuencias nucleotídicas de los primers Fw y Rv.

Para la realización de la qPCR se utilizó el termociclador *CFX 96* de BioRad con las siguientes condiciones: 5min-94°C (activación de la enzima polimerasa), 30 seg-94°C (desnaturalización), 30 seg-60°C (alineamiento de *primers* Fw y Rv con la hebra de ADN desnaturalizada), 3 seg-72°C (extensión de la secuencia nucleotídica por la enzima polimerasa). Para establecer la comparativa entre las distintas muestras y poder determinar las diferencias de expresión, se analizó el ciclo umbral (Ct, del inglés *Cycle threshold value*) en el que el termociclador detectaba la señal del *SYBR green* asociado a cada gen, teniendo como gen normalizador el *Rplp0*, de tal forma que a mayores Ct menor expresión génica.

3.1.7 Estudio de la función hepática.

Para estudiar los cambios en la función hepática asociados al daño en el tejido de los ratones *Cort+/+*, *Cort+/-* y *Cort-/-* sometidos a ambos modelos de fibrosis se analizaron los niveles de bilirrubina en plasma, y se realizó el ensayo enzimático de las actividades alanina-aminotransferasa (ALT) y aspartato-aminotransferasa (AST).

Para realizar estos procesos se aisló el plasma de las muestras de sangre recogidas. Dichas muestras se sometieron a una centrifugación de 425 g durante 10min a temperatura ambiente con la que se produjo la separación en fases de los glóbulos rojos (fase inferior) y el suero (fase superior). Se recogió el máximo volumen posible de suero de cada muestra cuidadosamente para no perturbar la interfase ni arrastrar contenido indeseado.

3.1.7.1 Análisis de bilirrubina.

Los niveles de bilirrubina sérica fueron determinados utilizando el kit '*Bilirrubin Assay Kit*' (*Sigma Aldrich, MAK126*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en el método colorimétrico Jendrassik-Grof que permite medir el producto coloreado que se genera de la reacción de la bilirrubina con el ácido sulfanílico diazotizado. La concentración de la bilirrubina sérica se

calculó con la siguiente fórmula matemática dependiendo de los valores de absorbancia a 530nm que se midan:

$$[\text{Bilirrubina}] = \frac{(A_{530})_{\text{muestra}} - (A_{530})_{\text{blanco}}}{(A_{530})_{\text{calibrador}} - (A_{530})_{\text{agua}}} \times 5(\text{mg/dL})$$

Siendo 5mg/dL equivalente a la concentración de bilirrubina del calibrador y $(A_{530})_{\text{muestra}}$ el valor medido para la bilirrubina, total o la directa, en la muestra.

Para la realización de estas medidas fue necesario trabajar con las muestras de suero frescas y preparar los reactivos de trabajo en el momento, manteniendo la proporción que aparece recogida en la **Tabla 4**. Para cada muestra se necesitaron preparar las siguientes mezclas de trabajo con los reactivos aportados por el propio kit:

	Reactivo A	Reactivo B	Reactivo C	Salino	Agua
Bilirrubina total	50µL	20µL	130µL	-	-
Blanco	50µL	-	-	130µL	20µL

Tabla 4. Volúmenes de los reactivos de trabajo necesarios del Kit ‘Bilirrubin Assay Kit’.

Por lo tanto, en una misma placa de 96 pocillos para X muestras fueron ocupados 2xX pocillos (1 para la medición de bilirrubina total y 1 para el blanco) junto con otros 2 pocillos (1 para el reactivo calibrador y 1 para el agua). En el pocillo ‘calibrador’ se añadieron 50µL del reactivo calibrador junto 200µL de agua y en el pocillo ‘agua’ se añadieron directamente 250µL de agua. En los pocillos asociados a cada muestra se añadieron 50µL de muestra junto con 200µL de mezcla de reactivos de trabajo atendiendo a lo que se fuera a medir (bilirrubina total o blanco).

Tras una incubación de 10min a temperatura ambiente se procedió a la medición de la absorbancia a 530nm y los niveles de bilirrubina fueron calculados según la fórmula antes expuesta.

3.1.7.2 Ensayo enzimático de la actividad ALT.

La actividad alanina-transferasa (ALT) fue determinada colorimétricamente mediante el uso del kit ‘Alanine Aminotransferase Activity Assay Kit’ (Sigma Aldrich, MAK052) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la actividad ALT se realizó mediante un ensayo enzimático que resulta en un producto colorimétrico que emite absorbancia a 570nm y que es proporcional a la cantidad de piruvato generado en el proceso. El resultado de la actividad ALT de cada muestra se determina atendiendo a la siguiente ecuación teniendo presente que 1 unidad ALT es definida como la cantidad de enzima que genera 1.0µmol de piruvato por minuto a 37°C:

$$\text{Actividad ALT} = \frac{B \times \text{Factor de dilución de la muestra}}{(T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}}) \times V}$$

Siendo B los nmoles de piruvato generados entre el tiempo final e inicial del ensayo, T final el tiempo de la penúltima media (minutos), T inicial el tiempo de inicio de ensayo y V el volumen de muestra añadiendo al pocillo (mililitros).

Para esta detección colorimétrica fueron necesarios por duplicado 1 control positivo (*'ALT positive control'*), una recta estándar de 6 puntos (**Tabla 5**) y las muestras de suero a analizar. Para la preparación de la recta estándar se diluyó el reactivo stock *'Piruvate Standard'* de 100nm/μL a 1nmol/μL final denominándose esta solución diluida *'Standard Solution'* y junto con el *'ALT assay Buffer'* se obtuvieron los siguientes puntos:

[Standard] (nmol)	V 'Standard solution' (μL)	V 'ALT assay Buffer' (μL)	V final (μL)
0	0	20	20
2	2	18	20
4	4	16	20
6	6	14	20
8	8	12	20
10	10	10	20

Tabla 5. Reactivos necesarios para la recta estándar del ensayo enzimático ALT.

Tras una prueba inicial de cara a la determinación del factor de dilución adecuado para la medición de las muestras de forma que los valores de absorbancia se encontraran dentro de los establecidos por la recta estándar, en una placa de 96 pocillos se añadieron 20μL de muestra de suero por pocillo. En el pocillo del control positivo se añadieron 5μL del reactivo *'ALT positive control'* junto con 15μL del *'ALT assay Buffer'*. A cada uno de los pocillos anteriores (muestra y control positivo) se añadieron 100μL de la mezcla compuesta por *'ALT assay Buffer'* (86μL), *'Fluorescent peroxidase substrate'* (2μL), *'ALT enzyme mix'* (2μL) y *'ALT substrate'* (10μL).

A continuación, la placa fue agitada en oscuridad durante 3min e incubada a 37°C anotando el tiempo al que comenzaba esta incubación como T inicial. Cada 5min se fueron tomando medidas de la absorbancia a 570nm hasta que la muestra con mayor actividad ALT tuviese un valor próximo o mayor al valor del punto más concentrado de la recta estándar. Con los valores de absorbancia obtenidos y su interpolación en la recta estándar se calcularon los valores B (nmoles de piruvato) generados por cada muestra entre los tiempos final y inicial, siendo el valor del tiempo final obtenido en la penúltima medición.

3.1.7.3 Ensayo enzimático de la actividad AST.

La actividad alanina-transferasa (AST) fue determinada colorimétricamente mediante el uso del kit *'Aspartate Aminotransferase Activity Assay Kit'* (Sigma Aldrich, MAK055) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la actividad AST se realizó mediante un ensayo enzimático que da lugar a un producto colorimétrico que emite absorbancia a 450nm y que es proporcional a la actividad enzimática de AST presente en la muestra. El resultado de la actividad AST de cada muestra se determina atendiendo a la siguiente ecuación teniendo presente que 1 unidad AST es definida como la cantidad de enzima que genera 1.0μmol de glutamato por minuto a pH8.0 a 37°C:

$$\text{Actividad AST} = \frac{B \times \text{Factor de dilución de la muestra}}{(T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}}) \times V}$$

Siendo B los nmoles de glutamato generados entre el tiempo final e inicial del ensayo, T final el tiempo de la penúltima media (minutos), T inicial el tiempo de inicio de ensayo y V el volumen de muestra añadiendo al pocillo (mililitros).

Para esta detección colorimétrica fueron necesarios por duplicado 1 control positivo ('*AST positive control*'), una recta estándar de 6 puntos (**Tabla 6**) y las muestras de suero a analizar. Para la preparación de la recta estándar se diluyó el reactivo stock '*Glutamate Standard Solution*' de 0.1M a 1mM final usando para ello el '*AST assay Buffer*' denominándose esta solución diluida '*Standard Solution*'.

Tras una prueba inicial de cara a la determinación del factor de dilución adecuado para la medición de las muestras de forma que los valores de absorbancia se encontraran dentro de los establecidos por la recta estándar, en una placa de 96 pocillos se añadieron 50µL de muestra de suero por pocillo. En el pocillo del control positivo se añadieron 5µL del reactivo '*AST positive control*' junto con 45µL del '*AST assay Buffer*'. A cada uno de los pocillos anteriores (muestra y control positivo) se añadieron 100µL de la mezcla máster compuesta por los siguientes reactivos: '*AST assay Buffer*' (80µL), '*AST enzyme mix*' (2µL), '*AST developer*' (8µL) y '*AST substrate*' (10µL).

[Standard] (nmol)	V ' <i>Standard solution</i> ' (µL)	V ' <i>AST assay Buffer</i> ' (µL)	V final (µL)
0	0	50	50
2	2	48	50
4	4	46	50
6	6	44	50
8	8	42	50
10	10	40	50

Tabla 6. Reactivos necesarios para la recta estándar del ensayo enzimático AST.

A continuación, la placa fue agitada en oscuridad durante 3min e incubada a 37°C, anotando el tiempo al que comenzaba esta incubación como T inicial. Cada 5min se fueron tomando medidas de la absorbancia a 450nm hasta que la muestra con mayor actividad AST tuviese un valor próximo o mayor al valor del punto más concentrado de la recta estándar. Con los valores de absorbancia obtenidos e interpolándolos en la recta estándar se obtuvieron los valores B (nmoles de glutamato) generados por cada muestra entre los tiempos final y inicial, siendo el valor del tiempo final obtenido en la penúltima medición.

3.2 OBJETIVO 2. Estudiar el efecto directo de Cortistatina sobre las células efectoras de la respuesta fibrogénica en el hígado.

Para llevar a cabo este objetivo se aislaron HSCs primarias de ratones deficientes en Cortistatina y de ratones con dotación génica normal, de tal forma que se pudiera caracterizar el estado de esta población celular en presencia y ausencia de Cortistatina endógena. Una vez realizada dicha caracterización, se estudió el efecto que pudiese ejercer Cortistatina sobre estas mismas células primarias al ser administrado de forma exógena como tratamiento anti-fibrótico.

Para poder trasladar el posible papel anti-fibrótico de este neuropéptido a un contexto humano, se realizaron experimentos con las líneas celulares de HSCs humanas LX2 (*Sigma Aldrich, SCC064*) y HHStcC (*ScienCell, 5300*) activadas con el estímulo pro-fibrogénico TGF β 1.

La realización de una estancia de 3 meses en el *Laboratory of Tissue Repair and Regeneration*, dirigido por el doctor Boris Hinz en la Universidad de Toronto, me permitió estudiar también el efecto de Cortistatina sobre muestras primarias humanas: fibroblastos primarios pulmonares y dérmicos aislados de humanos normales (NHFL/ NHDL, del inglés *Normal human lung/ dermal fibroblasts*). Aunque estas poblaciones celulares no son HSCs, sí son las principales células efectoras de la respuesta fibrogénica en otros tejidos como los pulmones, la piel, de tal forma que su comportamiento podría extrapolarse al de las HSCs en cuanto a su capacidad de activación y diferenciación a miofibroblastos.

3.2.1 Aislamiento de HSCs primarias murinas.

Siguiendo los pasos principales del protocolo 'Seven Steps to Stellate Cells' ¹⁹⁷ de Jove, el aislamiento de HSCs se realizó para un conjunto de 6 ratones de los genotipos *Cort+/+* y *Cort-/-* por muestra.

La realización de este protocolo conllevó el uso de las soluciones SC1, SC2, GBSSA y GBSSB, y de soluciones con las enzimas Pronasa E y Colagenasa P, que fueron preparadas, filtradas y ajustadas a pH 7.3 – 7.4 el mismo día de su utilización para mantener la correcta actividad enzimática (**Tablas 7- 9**).

Secuencialmente, cada ratón fue anestesiado mediante la inyección intraperitoneal de xilacina (10mg/kg)-ketamina (80mg/kg) y colocado sobre una manta eléctrica para mantener la temperatura óptima de actuación de las enzimas digestivas al infundir la solución que las contiene. Tras abrir el peritoneo y exponer la cavidad abdominal se insertó una aguja (30G) unida a una cánula conectada al equipo de infusión (bomba peristáltica, *VWR PP1080*) con el que se procedió a continuación a realizar una perfusión de las soluciones SC1, Pronasa E y Colagenasa P para disgregar enzimáticamente el hígado desde el interior. Para el correcto funcionamiento de estas 3 soluciones, éstas fueron mantenidas a 45°C en un baño termostaticado durante todo el proceso de perfusión, de

tal forma que al llegar al final de la cánula insertado en el ratón la temperatura se encontraba alrededor de los 37°C.

Solución SC1 (1L)		
EGTA	190mg	<i>CalbioChem – 324626</i>
Glucosa	900mg	<i>Sigma – 49139</i>
HEPES	2.38g	<i>AppliChem – A3724</i>
KCl	400mg	<i>Sigma – P3911</i>
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	151mg	<i>Sigma – 71643</i>
NaCl	8g	<i>Sigma – S9888</i>
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	78mg	<i>Sigma – 10049-21-5</i>
NaHCO ₃	350mg	<i>VWR – 27780.291</i>
Fenol Rojo	6mg	<i>Sigma – 114529</i>
H ₂ O destilada	Hasta V _{final} = 1L	
Solución SC2 (1L)		
CaCl ₂ x 2H ₂ O	560mg	<i>EMSURE – 1.02382</i>
HEPES	2.38g	<i>AppliChem – A3724</i>
KCl	400mg	<i>Sigma – P3911</i>
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	151mg	<i>Sigma – 71643</i>
NaCl	8g	<i>Sigma – S9888</i>
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	78mg	<i>Sigma – 10049-21-5</i>
NaHCO ₃	350mg	<i>VWR – 27780.291</i>
Fenol Rojo	6mg	<i>Sigma – 114529</i>
H ₂ O destilada	Hasta V _{final} = 1L	

Tabla 7. Reactivos necesarios para la preparación de las soluciones SC1 y 2.

Solución GBSS-A (1L)		
KCl	370mg	<i>Sigma – P3911</i>
CaCl ₂ x 2H ₂ O	225mg	<i>EMSURE – 1.02382</i>
Glucosa	991mg	<i>Sigma – 49139</i>
KH ₂ PO ₄	30mg	<i>Sigma – P0662</i>
MgCl ₂ x 6H ₂ O	210mg	<i>Sigma – M2670</i>
MgSO ₄ x 7H ₂ O	70mg	<i>Sigma – 230391</i>
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	75mg	<i>Sigma – 71643</i>
NaHCO ₃	227mg	<i>VWR – 27780.291</i>
Fenol Rojo	6mg	<i>Sigma – 114529</i>
H ₂ O destilada	Hasta V _{final} = 1L	
Solución GBSS-B (1L)		
KCl	370mg	<i>Sigma – P3911</i>
CaCl ₂ x 2H ₂ O	225mg	<i>EMSURE – 1.02382</i>
Glucosa	991mg	<i>Sigma – 49139</i>
KH ₂ PO ₄	30mg	<i>Sigma – P0662</i>
MgCl ₂ x 6H ₂ O	210mg	<i>Sigma – M2670</i>
MgSO ₄ x 7H ₂ O	70mg	<i>Sigma – 230391</i>
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	75mg	<i>Sigma – 71643</i>
NaCl	8g	<i>Sigma – S9888</i>
NaHCO ₃	227mg	<i>VWR – 27780.291</i>
Fenol Rojo	6mg	<i>Sigma – 114529</i>
H ₂ O destilada	Hasta V _{final} = 1L	

Tabla 8. Reactivos necesarios para la preparación de las soluciones GBSS-A y B.

Solución Pronasa E		
Pronasa E	100mg (4000 PU/mg min)	<i>Sigma – P8811</i>
Solución SC2	200mL	
Solución Colagenasa P		
Colagenasa P	85mg (1.78 U/mg)	<i>Sigma - 11213865001</i>
Solución SC2	200mL	
Solución Pronasa E – Colagenasa P		
Pronasa E	50 mg (4000 PU/mg min)	<i>Sigma – P8811</i>
Colagenasa P	85mg (1.78 U/mg)	<i>Sigma - 11213865001</i>
Solución SC2	50mL	

Tabla 9. Reactivos necesarios para la preparación de las soluciones Pronasa E, Colagenasa P y Pronasa E-Colagenasa P.

Tras ajustar bien la aguja en la vena porta se realizó un corte en la vena cava inferior e inmediatamente a continuación se inició el flujo (6.5mL/min) y se perfundió con la solución SC1 que preparó el hígado para el posterior tratamiento enzimático. Se mantuvo la perfusión con esta solución hasta que, tras limpiar sistema circulatorio, dejó de salir sangre por la vena cava inferior y sólo salió la solución limpia y los lóbulos hepáticos perdieron su característico tono rojizo (alrededor de 1-1.5min). A continuación (**Fig. 44**), se perfundieron secuencialmente las soluciones de Pronasa E y Colagenasa P durante 3min cada una. La digestión del tejido con estas soluciones se tradujo visualmente en un aumento del tamaño de los lóbulos al hincharse por el efecto de la Pronasa E y una gran pérdida de la arquitectura hepática que dio lugar a unos lóbulos amorfos y atónicos debido a la Colagenasa P.



Figura 44. Perfusión de soluciones para disgregación enzimática del hígado.

Perfusión en la vena porta de las soluciones SC1 (B.1), Pronasa E (B.2) y Colagenasa P (B.3) y corte de la vena cava inferior para su posterior salida. Figura adaptada de ref ¹⁹⁸.

Una vez perfundidos, los hígados fueron recogidos y mantenidos en 70mL de la solución SC2 sobre hielo hasta haber obtenido un total de 6 hígados por cada muestra. A continuación, en condiciones de esterilidad, los hígados recogidos se disgregaron mecánicamente con cuchilla para liberar las células (**Fig. 45A**).

A la suspensión de 70mL de solución SC2 con todo el tejido disgregado se le añadieron 50mL de la solución Pronasa E-Colagenasa P y 1mL de DNasa I (4000U, Roche - 11284932001) para continuar con la digestión en agitación a 37°C durante 20min (**Fig. 45B**). Pasado este tiempo, la suspensión fue filtrada y repartida en 6 tubos *Falcon-50* utilizando filtros con un tamaño de poro de 70µm llegando a un volumen final de 50mL en cada uno con solución SC2 fría (**Fig. 45C**).

Tras una centrifugación de 10min a 600g y 4°C, se aspiraron 40mL de sobrenadante y se añadieron 150µL de la solución de DNasa I a cada tubo antes de resuspender las células. Se combinó la suspensión celular y se repartió en otros 4 tubos *Falcon-50* (hasta un volumen final de 50mL con solución GBSSB fría). Tras otra centrifugación de 10min a 600g y 4°C, se aspiró todo el sobrenadante y se añadieron 150µL de la solución de DNasa I y 10mL de solución GBSSB fría a cada tubo.

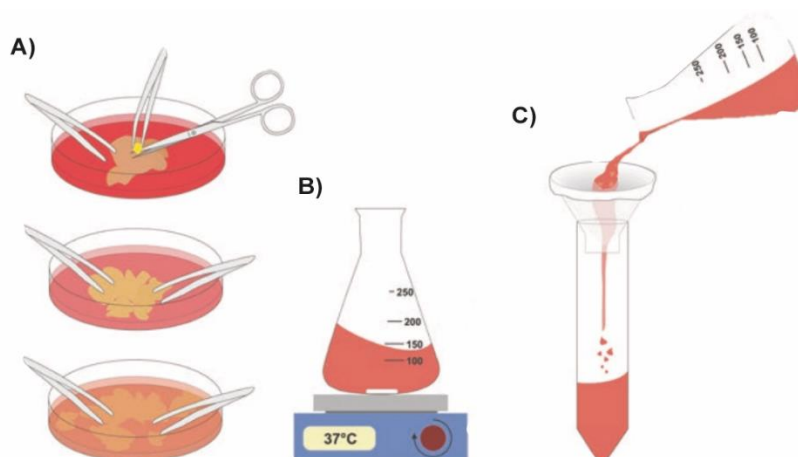


Figura 45. Disgregación mecánica y enzimática para liberación de células.

Figura adaptada de ref ¹⁹⁸.

Tras resuspender las células se juntaron las suspensiones en 2 tubos *Falcon-50* a los que se les añadieron 16mL/falcon de GBSS-B y 14mL/falcon del compuesto Nycodenz (*ProteoGenix, 1002424*) disuelto en la solución GBSS-A a una concentración final de Nycodenz 8% (w/v). Tras mezclar cuidadosamente por inversión la suspensión celular con la solución de Nycodenz, el volumen total fue transferido a 10 tubos *Falcon-15* para poder realizar una separación de los tipos celulares mediante una centrifugación isopícnica. A cada tubo se le añadieron cuidadosamente 1.5mL de solución GBSS-B sobre la suspensión celular y se centrifugaron durante 15min a 1500g y 4°C, sin freno. Cuidadosamente se recogió la interfase formada con las HSCs (**Fig. 46**) de cada uno de los tubos.

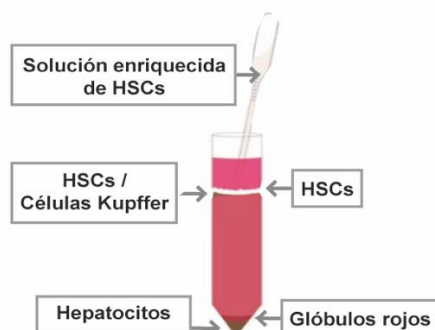


Figura 46. Fases generadas tras centrifugación con Nycodenz.

Las fracciones recogidas con HSCs se combinaron en un solo tubo *Falcon-50* y se añadió solución GBSSB hasta alcanzar el volumen final de 50mL. Se realizó una centrifugación de 10min a 600g y

4°C para lavar las células y, tras aspirar el sobrenadante, estas fueron resuspendidas en medio DMEM (*Gibco*, 11960044) suplementado con 10% FBS (*Gibco*, 26140079) inactivado por calor, 1% penicilina/ estreptomina (p/s, *Gibco*, 15140122), 2mM L – glutamina (*Gibco*, 25030-024), 1mM piruvato sódico (*Gibco*, 11360-039) y 10mM HEPES (*PanReac*, A3724), y transferidas a frascos de cultivo de 75cm² (*Thermo Fisher*, 159910), 10mL/frasco. Tras 2h de incubación a 37°C, 5% CO₂, se realizó un lavado para eliminar detritos celulares y células muertas (las HSCs a este tiempo se encontraban ya adheridas a la superficie de los frascos). Finalmente, las HSCs obtenidas fueron incubadas en el medio antes descrito a 37°C durante 6 días.

Para caracterizar las células aisladas de ratones *Cort*^{+/+} y *Cort*^{-/-} y poder analizar el efecto de la deficiencia endógena de Cortistatina, se estudió su transcriptoma mediante la técnica RNAseq, su estado de activación y diferenciación mediante IFI, y la expresión génica de los principales marcadores de fibrosis que se han estado analizando a lo largo de esta tesis (CTGF, colágeno, α SMA y TGF β 1).

3.2.2 Estudio transcriptómico mediante RNAseq.

El estudio transcriptómico de las HSCs primarias se realizó en 4 muestras independientes, 2 obtenidas de ratones *Cort*^{+/+} y 2 obtenidas de ratones *Cort*^{-/-}.

Pasados 6 días tras su aislamiento, las células fueron levantadas de los frascos de cultivo utilizando una solución de Tripsina/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1X y, tras lavarlas y resuspenderlas en 1mL de medio de cultivo, se contó el número de células obtenidas utilizando para ello una cámara de Neubauer. Tras lavar las células obtenidas con PBS 1X (*Gibco*, 11590476), se extrajo el ARNm utilizando para ello el kit comercial *E.Z.N.A. HP Total RNA Kit* (*Omega Bio-Tek*, R6812). Todo el material utilizado para los procedimientos llevados a cabo fue libre de nucleasas.

3.2.2.1 Extracción de ARN de HSCs primarias.

Las células aisladas fueron centrifugadas durante 1min, a 13000g y 4°C y el sobrenadante se aspiró cuidadosamente de forma que el precipitado celular quedara completamente seco. Siguiendo las instrucciones del fabricante del kit, y debido al bajo número de HSCs aisladas (<5.10⁶ células/muestra), se añadieron 350 μ L del ‘*GTC Lysis Buffer*’ para lisarlas. El lisado se hizo pasar a través de la columna homogeneizadora de ARNm hasta un tubo de colección mediante una centrifugación de 1min a 13000g y 4°C. El volumen recogido se lavó con etanol 70% en utilizando para ello una columna de alta unión a ARNm. Tras centrifugar durante 1min a 10000g y 4°C, el volumen filtrado se descartó y el ARNm unido a la columna se lavó con la solución de lavado I (2 veces) y con la solución de lavado II. Finalmente, el ARNm se eluyó de la columna con H₂O libre de nucleasas.

3.2.2.2 Análisis transcriptómico mediante RNAseq.

Tras la extracción del ARNm, se llevó a cabo el análisis de la expresión génica de las HSCs primarias *Cort+/+* y *Cort-/-* mediante la técnica de secuenciación de transcriptomas de próxima generación (RNAseq) con la colaboración con el Servicio de Genómica y la Unidad de Bioinformática del IPBLN – CSIC.

Las muestras fueron analizadas para determinar sus coeficientes ‘Número de Integridad de ARN’ (RIN, del inglés *RNA Integrity Number*) mediante el uso del chip *Bioanalyzer RNA 6000 Nano* utilizado por el *Bioanalyzer 2100 (Agilent technologies Inc. CA, EEUU)* y la concentración de ARN obtenido se midió mediante el fluorómetro *Qubit (Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU)*. A continuación, se prepararon las bibliotecas de ARNm utilizando para ello 1 µg de ARNm y el kit de preparación de bibliotecas de ARNm en hebra TruSeq (*Illumina, CA, EEUU*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad y la distribución del tamaño de las bibliotecas de ARNm indexadas fueron validados mediante el ensayo de ADN de alta sensibilidad en el *Bioanalyzer 2100* y la concentración se midió también en el fluorómetro *Qubit*. Las bibliotecas finales se combinaron de forma equimolar y luego se diluyeron y desnaturalizaron de la forma recomendada por la guía de preparación de bibliotecas *Illumina NextSeq 500* de alto rendimiento. La secuenciación del extremo emparejado 75x2nt se realizó en un secuenciador *NextSeq 500 (Illumina, CA, EEUU)* de tal forma que se produjeran 17x2 millones de lecturas emparejadas por muestra de promedio. Se siguieron las siguientes fases (**Fig. 47**)¹⁹⁹:

- Generación de la librería de ADN

A partir de una molécula de ADN se generaron de forma aleatoria fragmentos más pequeños a los que se les añadieron oligonucleótidos en sus extremos 5’ y 3’ para servir así como adaptadores de las siguientes etapas.

- Generación de *clusters* de ADN:

Se añadieron los fragmentos de ADN unidos a los adaptadores a una celda de flujo, la cual presentaba anclada a su superficie oligonucleótidos complementarios a esos adaptadores para así generar la hibridación de los adaptadores con los oligonucleótidos anclados. Empleando la secuencia del oligonucleótido fijado como *primer* la polimerasa se unió a la secuencia hibridada y sintetizó la cadena complementaria del ADN. Posteriormente, se desnaturalizó la doble cadena generada y liberó la cadena original. La nueva cadena generada se hibridó con otro oligonucleótido fijado a la celda por el adaptador de su extremo 3’ formando de tal forma un puente. De igual forma que previamente, la polimerasa se unió a la secuencia hibridada usando el segundo oligonucleótido fijado a la superficie como *primer* y sintetizó nuevamente la cadena complementaria, a través del proceso conocido como ampliación de puente. La doble cadena se desnaturalizó y se obtuvieron

dos cadenas simples complementarias, *forward* y *reverse*, ancladas a la superficie. Así, de forma secuencial se generaron los *clusters* de cada fragmento de ADN.

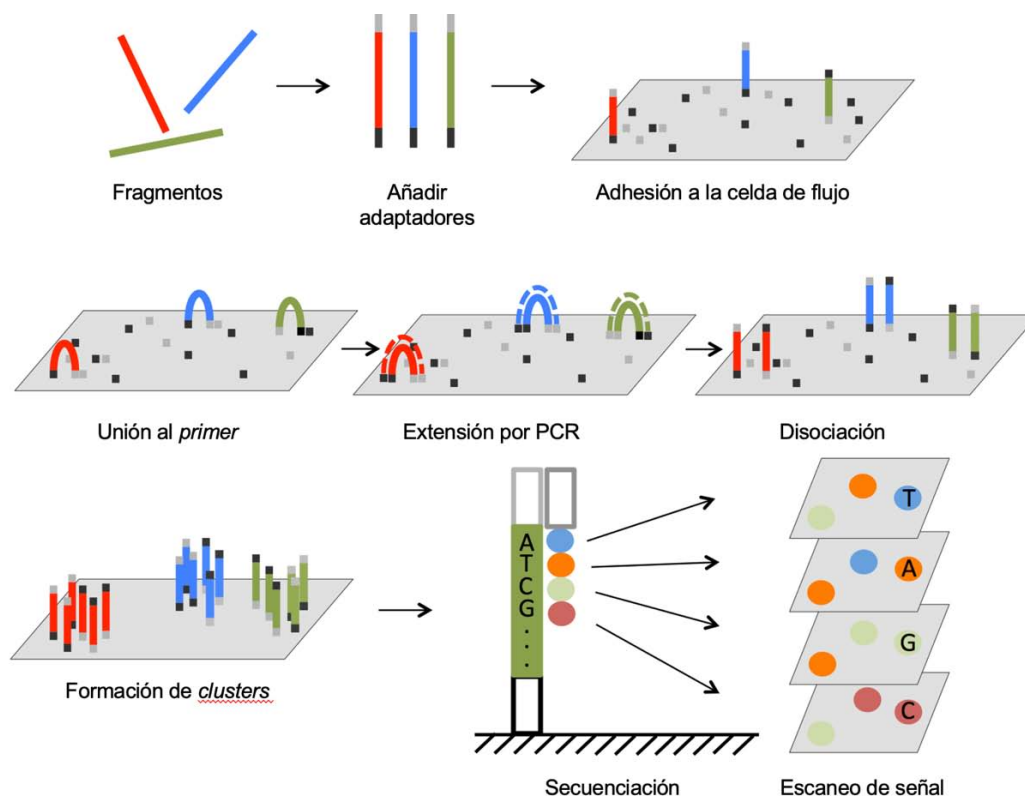


Figura 47. Esquema del proceso de secuenciación del analizador de genoma de *Illumina*.

- Secuenciación por síntesis

Durante esta fase, en cada ciclo la polimerasa unió un nucleótido marcado con un fluoróforo específico por complementariedad de bases. Tras realizar un lavado para eliminar los nucleótidos no unidos, con un láser se excitó el fluoróforo del nucleótido incorporado y con un sistema detector se registró el rango de emisión de dicho fluoróforo. Con otro lavado se eliminaron tanto el fluoróforo como los terminadores reversibles para, a continuación, añadir los nucleótidos y continuar con la síntesis de la misma forma repitiendo los ciclos de forma secuencial. A la emisión recogida por el sistema detector se le asignó un nucleótido específico para crear la secuencia nucleotídica adecuada en cada caso.

Una vez realizada la secuenciación de cada una de las muestras los datos fueron procesados a través de un análisis bioinformático.

3.2.2.3 Análisis bioinformático.

Para el análisis bioinformático del transcriptoma se utilizó el *pipeline mARma-Seq*²⁰⁰ para la realización de los siguientes pasos:

- Evaluación de la calidad y pre-procesamiento

Inicialmente todos los archivos *fastq* se analizaron para medir diferentes errores de secuenciación y obtener todos los valores de calidad utilizando el software *FastQC*. Esta herramienta generó un informe detallado de la calidad de las lecturas y resaltó posibles errores de secuenciación.

- Alineación

Tras el paso de filtrado de calidad, los millones de lecturas obtenidas del secuenciador fueron colocados en el genoma de referencia por homología de nucleótidos. De tal forma que para cada par de secuencias se obtuvo la ubicación genómica real del fragmento secuenciado. Para este proceso se hizo uso del alineador *HISAT2*²⁰¹, utilizando como genoma referencia los genes codificadores de proteínas de *Mus musculus Genocode version M20 genome build: mmGRCm38*.

- Cuantificación de entidades

Mediante la cuantificación de entidades se resumieron todas las lecturas co-localizadas en exones que codifican para proteínas y se asociaron a genes. Así, lo que se obtuvo fueron los valores de expresión en bruto y no normalizados (también denominados recuentos) para cada gen dentro de cada muestra. Estos valores, una vez procesados estadísticamente, se utilizaron para medir cambios en la expresión.

- Análisis de expresión diferencial

Se tomaron los datos de recuento y se normalizaron para realizar un análisis estadístico de forma que se descubrieran cambios cuantitativos en los niveles de expresión entre las muestras. Para este análisis se utilizó el paquete *edgeR*²⁰². Se eliminaron los genes de baja expresión y los restantes se normalizaron mediante el método de la media recortada de valores M (TMM, del inglés *Trimmed mean of M-values*). Además, se calcularon las lecturas por kilo base por millón de lecturas mapeadas (RPKM, del inglés *Reads per kilo base per million mapped reads*), los conteos por millón (CPM, del inglés *Counts per million*) y el logaritmo en base 2 de los conteos por millón (log-CPM) para cada gen en cada muestra²⁰². De esta forma, se pudo inferir la replicabilidad de las muestras obtenidas.

El análisis de componentes principales (PCA, del inglés *Principal component analysis*) y la agrupación jerárquica de muestras normalizadas se utilizaron para obtener una descripción general de la similitud existente entre las muestras de secuenciación de ARN²⁰³. Tras ello, se procedió al análisis de todas las muestras al no presentar ningún valor atípico claro. Los genes expresados diferencialmente (DEG, del inglés *Differentially expressed genes*) se obtuvieron comparando las 2 réplicas *Cort-/-* frente a las 2 *Cort+/+*. Todos los genes que tenían un valor de tasa de descubrimiento falso (FDR, del inglés *False discovery rate*) menor de 0.05 se marcaron como DEG, y utilizando el log2FC se evaluó la importancia del cambio en la expresión de cada gen entre ambos tipos de muestra.

- Análisis de enriquecimiento

Con el objetivo de identificar los efectos diferenciales de la expresión génica mediante un estudio de enriquecimiento funcional se hizo uso del paquete *clusterProfiler Bioconductor*²⁰⁴. Para ello, los DEG se compararon con todos los genes expresados en el ensayo de RNAseq, se obtuvieron los términos de ontología génica de la base de datos *Bioconductor Mus musculus*, y se asociaron a identificadores de genes de tal forma que el análisis de enriquecimiento de genes se evaluó en términos de proceso biológico, función molecular y ontología del complejo celular. El enriquecimiento según la Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas (KEGG, del inglés *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*) también se calculó a partir de los nombres de genes de ratón adquiridos previamente a partir de la notación *Gencode*.

3.2.2.4 Validación de genes mediante qPCR.

Para validar los resultados del RNAseq se seleccionaron 7 genes entre aquellos que obtuvieron un elevado valor DEG y se procedió a su análisis de expresión mediante qPCR mediante el protocolo descrito previamente en los apartados 3.1.6.2 y 3.1.6.3. y los *primers* recogidos en la **Tabla 10**. Los genes seleccionados fueron los que codificaban para la cadena ligera 1 de la miosina (*My11*), la subunidad γ del receptor de acetilcolina (*Chrng*), la actina α del músculo liso cardiaco 1 (*Actc1*), la trombospondina-4 (*Thbs4*), la proteína de gránulos neutrófilos (*Ngp*), la proteína A9 de unión a Calcio S100 (*S100a9*) y la estrógeno sulfotransferasa 1 (*Sult1e1*).

<i>My11</i>	Fw: 5' - CGCAGCCTAGAACTCCATCA - 3'	Rv: 5' - ACGCAGACCCTCAACGAAAT - 3'
<i>Chrng</i>	Fw: 5' - GAAACTACGACCCCCACCTG - 3'	Rv: 5' - GAGAGCCACCTCGAAGACAC - 3'
<i>Actc1</i>	Fw: 5' - CGCCTACAGAACCCACCAAA - 3'	Rv: 5' - GTCAGGATACCTCGCTTGCT - 3'
<i>Thbs4</i>	Fw: 5' - GGTTACACGGGAAACGGGAT - 3'	Rv: 5' - CGTCACATCTGAAACCCGGA - 3'
<i>Ngp</i>	Fw: 5' - AGTGTACTTCCACCCAGGAGA - 3'	Rv: 5' - AATGTTCTGATGTGAGGGGG - 3'
<i>S100a9</i>	Fw: 5' - CCTGACACCCTGAGCAAGAAG - 3'	Rv: 5' - GCTGATTGTCCTGGTTTGTGTC - 3'
<i>Sult1e1</i>	Fw: 5' - AAACCTCACCTGCCACCCAAG - 3'	Rv: 5' - TTGGCGTTCGGCAAAGATA - 3'

Tabla 10. Secuencias nucleotídicas de los *primers* para validación del RNAseq.

Finalmente, comparamos los niveles de expresión obtenidos mediante qPCR y RNAseq.

3.2.3 Inmunofluorescencia indirecta de NPCs primarias murinas.

Tras 6 días de incubación después de su aislamiento, las células primarias aisladas de ratones *Cort+/+* o *Cort-/-* fueron levantadas utilizando una solución de 0.5g/L Tripsina - 0.2g/L EDTA, (*Sigma Aldrich, T3924*) y plaqueadas sobre cristales de 12mm de diámetro alojados en pocillos de una placa de 24 pocillos (*Thermo Fisher, 167063*) con una densidad de 10^4 cel/poc. A continuación, las células fueron incubadas a 37°C durante 1 o 4 días (**Fig. 48**), y, pasado ese tiempo, fueron fijadas al cristal utilizando 4% paraformaldehído con glucosa al 2% durante 15min a temperatura ambiente (T^a amb) y se procedió con la IFI.

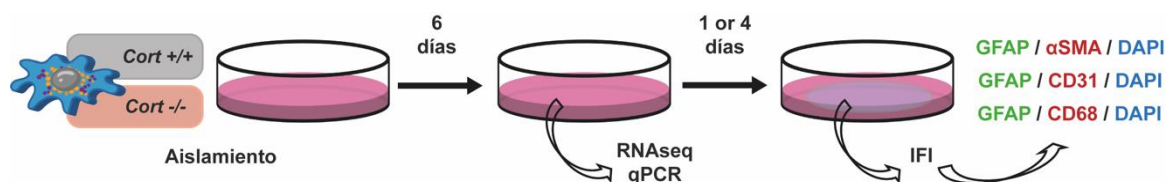


Figura 48. Diagrama experimental para la caracterización de HSCs primarias *Cort*^{+/+} y *Cort*^{-/-}.

Las células fijadas fueron lavadas con PBS 1X y tratadas con 30mM Glicina (*Sigma Aldrich*, G8898) durante 5min. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 5min con PBS 1X de nuevo antes de ser permeabilizadas con 0.1% Tritón X-100 durante 15min a T^a amb. Tras volver a realizar 3 lavados con PBS, las células fueron incubadas durante 1h con una solución de bloqueo (PBS 1X con 5% FBS, 0.3% Tritón X-100) a T^a amb. Posteriormente, las células fueron incubadas durante la noche (O/N) a 4°C con los anticuerpos primarios (**Fig. 48** y **Tabla 11**) en la solución PBS 1X con 1% BSA y 0.3% Tritón TX100 atendiendo a los siguientes marcadores: GFAP⁺ (HSCs), αSMA⁺ (miofibroblastos), CD31⁺ (LSECs) y CD68⁺ (KCs). Se realizaron 3 lavados con PBS 1X y seguidamente las células se incubaron durante 1h con los anticuerpos secundarios (**Tabla 11**), en la misma solución utilizada para la incubación con los anticuerpos primarios, a T^a amb y en oscuridad. A continuación, tras lavar las células 3 veces con PBS 1X, éstas fueron incubadas a T^a amb con DAPI en PBS 1X a la dilución anotada en la **Tabla 11**. Después, las células fueron lavadas nuevamente 3 veces y finalmente montadas sobre portaobjetos con Mowiol.

La adquisición de imágenes se realizó con el microscopio de fluorescencia *Olympus IX81* con una magnificación 400X y el software *CellSens Imaging* y para el análisis de imagen el programa utilizado fue el software *FIJI (Image J)*. Los resultados cuantitativos fueron expresados como la media de los valores obtenidos al evaluar 8 áreas elegidas aleatoriamente

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
Anticuerpo de conejo anti – GFAP de ratón	1:300	<i>Dako - Z0334</i>
Anticuerpo de ratón anti – αSMA de ratón	1:1000	<i>Sigma Aldrich - A5228</i>
Anticuerpo purificado de rata anti – CD31 de ratón	1:200	<i>BD Pharmigen - 550274</i>
Anticuerpo de rata anti – CD68 de ratón	1:500	<i>ABD Serotec - MCA1957XZ</i>
Alexa Flúor 488 Burro anti- IgG (H+L) de conejo	1:1000	<i>Invitrogen A21206</i>
Alexa Flúor 594 Cabra anti- IgG (H+L) de ratón	1:1000	<i>Invitrogen - A11032</i>
Alexa Flúor 594 Cabra anti- IgG (H+L) de rata	1:1000	<i>Sigma Aldrich - A11007</i>
DAPI	1:1000	<i>Sigma Aldrich - 32670</i>

Tabla 11. Anticuerpos primarios y secundarios para IFI.

3.2.3.1 Cuantificación del estado de activación de las HSCs.

En base a las imágenes obtenidas tras la IFI con marcaje GFAP, αSMA y DAPI, las células fueron clasificadas por un observador de forma ciega en HSCs quiescentes (GFAP⁺ αSMA⁻) y miofibroblastos activados (GFAP⁺ αSMA⁺), y dentro de esta segunda categoría se hizo diferenciación entre αSMA^{+alto} y αSMA^{+bajo} dependiendo del patrón de expresión de fibras de estrés αSMA⁺ (**Fig. 49**).

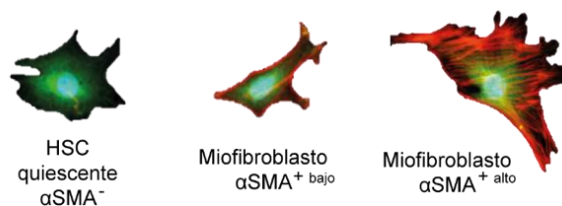


Figura 49. Clasificación celular según detección α SMA por IFI.

3.2.4 Tratamiento de HSCs primarias con Cortistatina.

Durante los 6 días de cultivo tras su aislamiento, las HSCs *Cort*^{+/+} y *Cort*^{-/-} fueron tratadas con Cortistatina-29 de rata (100nM, *Bachem, H-6444.1000*) cada 48h (Fig. 50). Pasado ese tiempo, se obtuvo el ARNm mediante la utilización del kit *E.Z.N.A. HP Total RNA* como se describió en el apartado 3.2.2.1 y se realizó el estudio de marcadores de fibrosis (CTGF, α SMA, colágeno y TGF β 1) en las muestras de HSCs *Cort*^{+/+} y *Cort*^{-/-} tratadas y no tratadas con Cortistatina utilizando para ello los *primers* de la **Tabla 3**. Las muestras de HSCs *Cort*^{-/-} tratadas y no tratadas también se utilizaron para analizar el efecto del tratamiento con Cortistatina sobre la expresión de aquellos genes que durante el RNAseq obtuvieron un mayor valor DEG (**Tabla 10**).

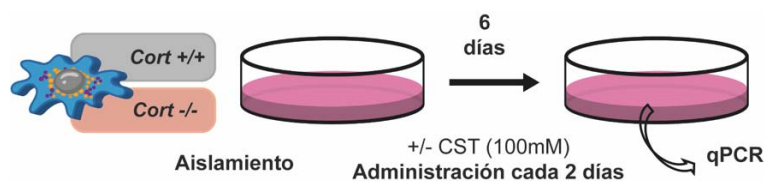


Figura 50. Diagrama experimental sobre el efecto de Cortistatina-29 sobre HSCs *Cort*^{+/+} y *Cort*^{-/-}. CST: Cortistatina exógena.

Para comprobar a través de qué receptores concretos podría estar Cortistatina ejerciendo sus efectos sobre las HSCs primarias, se administraron Cortistatina-29 (100nM) y los antagonistas de sus receptores (**Tabla 12**), con la misma pauta de administración descrita en el apartado anterior. Tras 6 días de tratamiento, las células fueron levantas y plaqueadas sobre cristales (10^3 células/cristal). A las 24h las células fueron fijadas al cristal y se continuó con la IFI para el análisis de los marcadores GFAP, α SMA y DAPI (**Fig. 51**) en las mismas condiciones que en el apartado 3.2.3.

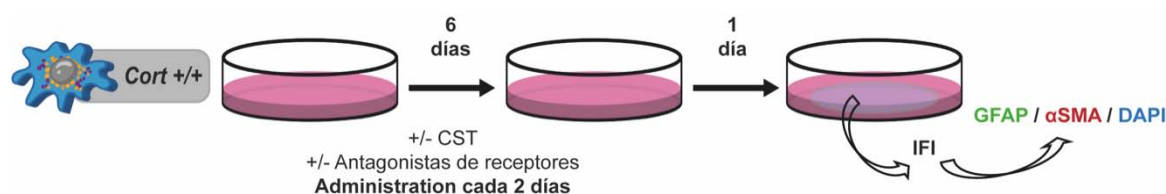


Figura 51. Diagrama experimental para el estudio de receptores de Cortistatina en HSCs primarias de ratón.

Antagonista	Receptor	Concentración	Casa comercial
(D-Lys ³) GHRP6	GHSR1	1000nM	<i>Sigma Aldrich, G4535</i>
Ciclo Somatostatina	SST1-5	1000nM	<i>Abcam, ab141211</i>

Tabla 12. Antagonistas de los receptores de Cortistatina.

3.2.5 Tratamiento de líneas celulares de HSCs humanas con Cortistatina.

Los posibles efectos anti-fibrogénicos de Cortistatina sobre HSCs humanas fueron primero evaluados en la línea celular LX2 (*Merk Millipore, SCC064*). El medio utilizado para el cultivo de esta línea celular fue DMEM suplementado con 10% FBS y 1% p/s. Los experimentos se realizaron atendiendo a las siguientes condiciones: control (sin estimulación ni tratamiento), +Cortistatina-17 humana (100nM, *Bachem, 1076399*) tratamiento en ausencia de estímulo pro-fibrogénico), +TGFβ1 (5ng/mL, (*Peprotech, 100-21*) estímulo pro-fibrogénico), +TGFβ1 +Cortistatina-17 (5ng/mL y 100nM respectivamente, tratamiento en presencia de estímulo pro-fibrogénico) (**Fig. 52**).

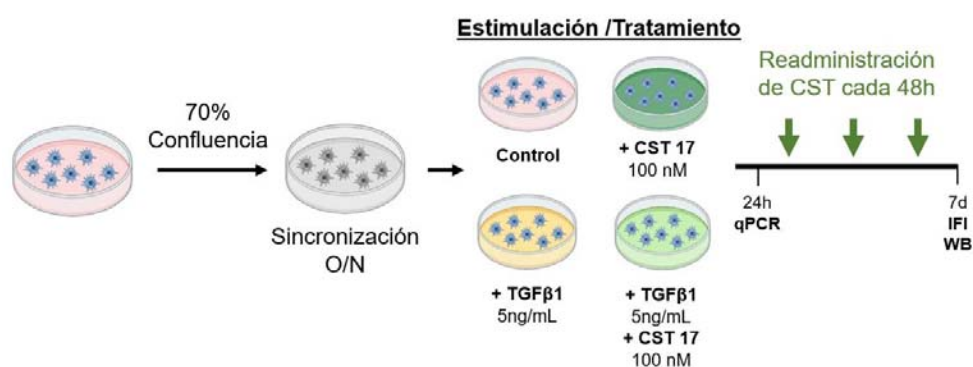


Figura 52. Diagrama experimental para el análisis del efecto anti-fibrogénico de Cortistatina-17 sobre LX2. Figura creada con Biorender.

El efecto de esta estimulación/tratamiento fue analizado mediante las siguientes técnicas:

3.2.5.1 Estudio de expresión génica de LX2.

Se realizó un subcultivo de LX2 en placa de 6 pocillos, 7×10^4 células/pocillo, hasta alcanzar una confluencia del 70%. Llegado ese punto, las células fueron sincronizadas mediante incubación O/N con medio de cultivo DMEM sin suero, para posteriormente ser estimuladas con TGFβ1 (5ng/mL) y tratadas con Cortistatina-17 (100nM) manteniendo una condición control (sin estimulación ni tratamiento) y otra con estimulación, pero sin tratamiento (**Fig. 52**). Mediante esta técnica se evaluaron los niveles de expresión de TGFβ1 en las 4 condiciones tras 24h desde el inicio de la estimulación. Para ello, se recogieron las células de cada pocillo en 1mL de *TriPure Isolation Reagent* y se siguieron los pasos descritos en el apartado 3.1.6 utilizando los *primers* que se recogen en la **Tabla 13**. De igual forma se analizaron los niveles de expresión génica del propio neuropéptido Cortistatina, a nivel basal sin estimulación y tras 24h de estimulación con TGFβ1.

<i>Cort-h</i>	Fw: 5' - CTCCAGTCAGCCCAAGAT - 3'	Rv: 5' - CAAGCGAGGAAAGTCAGGAG - 3'
<i>Tgfb1-h</i>	Fw: 5' - TACCTGAACCCGTGTTGCTC - 3'	Rv: 5' - CCGGTAGTGAACCCGTTGAT - 3'
<i>Rplp0-h</i>	Fw: 5' - CCTGTCTCTCCTCAGTGACATC - 3'	Rv: 5' - GCTTGGAGCCCACATTGTCT - 3'

Tabla 13. Secuencia nucleotídica de los *primers* para los genes *Cort*, *Tgfb1* y *Rplp0*.

3.2.5.2 Inmunofluorescencia indirecta de LX2.

Para el estudio del efecto de Cortistatina sobre el estado de activación de las LX2 mediante esta técnica se realizó el subcultivo de estas células sobre cristales en placa de 24 pocillos, 5×10^4 células/cristal. Una vez alcanzada una confluencia del 70%, las células fueron sincronizadas O/N y, a continuación, fueron estimuladas tal como se describió previamente (**Fig. 48**) e incubadas durante 7 días a 37°C. Durante este periodo se realizó una re-administración de Cortistatina-17 100nM cada 48h. Pasados los 7 días, las células fueron fijadas a los cristales siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.3 y la IFI para el análisis de la expresión de α SMA y DAPI se realizó siguiendo los pasos también descritos en ese mismo apartado. Para establecer la comparativa entre las 4 condiciones de estudio se adquirieron imágenes de 8 áreas aleatorias por condición con el microscopio de fluorescencia *Olympus IX81* con una magnificación 400X y el software *CellSens Imaging*. Con el software *FIJI (Image J)* se analizaron el área positiva para el marcaje α SMA y la intensidad de fluorescencia de dicho marcaje y los resultados cuantitativos fueron expresados como la media de los valores obtenidos.

3.2.5.3 Western Blot de LX2.

Para analizar los niveles de expresión proteica de α SMA se realizó el subcultivo de LX2 en frascos de cultivo de 25cm² (*ThermoFisher, 156367*) en medio DMEM 10%FBS 1% p/s, 7×10^4 células/pocillo. Pasadas 24h, las células fueron sincronizadas O/N y estimuladas a continuación durante 7 días atendiendo a las 4 condiciones experimentales previamente descritas (**Fig. 52**). Pasados los 7 días, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X y lisadas sobre hielo con la solución RIPA (del inglés *Radioimmunoprecipitation assay buffer*) constituido por Tris HCl 50mM pH 7.8, NaCl 150mM, 1mM EDTA, 1% Tritón X-100, 1% ácido desoxicólico de sodio, 0.1% dodecilsulfato sódico (SDS), junto con inhibidores de proteasas *Protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, P8340)* a una dilución de 1:500. Las muestras fueron incubadas en esta solución durante 2h en agitación (levantando las células del pocillo tras la primera hora utilizando un *scraper* para ello). A continuación, las células en la solución fueron recogidas y tras una centrifugación de 15min a 20814g y 4°C, se aisló el sobrenadante generado.

Para la cuantificación de las proteínas totales presentes en el sobrenadante recogido se utilizó el kit *DC Protein Assay (BioRad, 5000116)*. Siguiendo las instrucciones del fabricante, en una placa de 96 pocillos se añadieron 5 μ L de muestra o de estándar (contemplando concentraciones desde 0.2 mg/mL a 1.5mg/mL de proteína para la recta estándar de calibrado) y 25 μ L de la mezcla de reactivos A y S (2 μ L de S por cada 1mL de A) por pocillo. A continuación, se añadieron 200 μ L del reactivo B a cada pocillo y, tras 15min de incubación a T^a amb, se realizó una lectura de absorbancia a 750nm utilizando para ello el lector *VersaMax Microplate Reader* y el programa *SoftMax Pro 651*. Tras la cuantificación, a las muestras se les añadió la solución de carga constituido por

Laemmly Sample Buffer 4X (BioRad, 1610747) y β -mercaptoetanol 1/10 (*Sigma Aldrich*, M6250) a una concentración final de 1X.

Para cada muestra, 20ng de proteína total fueron cargados en geles de poliacrilamida, con una región concentradora al 6% y una separadora al 12%, cuya receta se describe en la **Tabla 14**. De tal forma que el tamaño de poro generado en el interior del gel permitiera separar proteínas con un rango de tamaño de entre 10 y 70 kDa, como nuestra proteína de interés α SMA (42 kDa).

	Región Concentradora 6%	Región Separadora 12%	Receta <i>Buffer</i> 100X para cada región	Casa Comercial
H ₂ O milliQ	1.8 mL	2.7mL		
Acrilamida/bisacrilamida 30%	0.7 mL	3.2 mL		<i>BioRad</i> , 1610156
<i>Buffer</i> 100X (Región Concentradora)	0.8 mL (25X)		Tris-HCl 0.5M pH6.8	<i>Promega</i> , H5121
			SDS 0.4%	<i>BioRad</i> , 1610302
<i>Buffer</i> 100X (Región Separadora)		2 mL (25X)	Tris-HCL 1.5M pH8.8	
			SDS 0.4%	
TEMED	3.3 μ L (0.1X)	8 μ L (0.1X)		<i>BioRad</i> , 1610801
Persulfato de amonio (APS) 10%	33 μ L (1X)	80 μ L (1X)		<i>BioRad</i> , 1610700

Tabla 14. Composición del gel poliacrilamida para Western Blot.

Los geles se dispusieron en una cubeta de electroforesis *Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (*BioRad*) llena de solución de electroforesis (5nM Tris-HCl, 192mM glicina, 0.1% SDS) y se cargaron las muestras con la cantidad de proteína antes especificada. Además, se cargaron 5 μ L del marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards All Blue* (*BioRad*, 1610373). Para la electroforesis se seleccionó un voltaje de 60 voltios (V) durante los primeros 20min y de 140V hasta el fin del proceso (salida del frente de carga por el extremo del gel).

Posteriormente, las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida fueron transferidas a membranas *Immobilon-FL Transfer Membranes* (*Merk Milipore*, IPFL00010). Para ello, las membranas fueron activadas en metanol (*VWR*, MFCD00004595) durante 1min y lavadas en *Tris buffered saline* 1X (TBS 1X, obtenido de la dilución de TBS 10X: Tris HCl 100mM, NaCl 1.5M, pH 7.5) durante 2min. A continuación, tanto los geles como las membranas fueron lavados en solución de transferencia (Tris HCl 25mM ph 8.3, glicina 192mM, metanol 20%) durante 10min. La transferencia se realizó mediante el sistema semi-seco *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* durante 1h a 24V, colocando los siguientes componentes en su interior en el orden que se describe a continuación de polo positivo a polo negativo y evitando cualquier tipo de burbuja: papel de filtro *Extra Thick Blot Paper* (*BioRad*, 1703966) humedecido en solución de transferencia, membrana, gel y papel de filtro humedecido. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se lavaron en H₂O miliQ y se tiñeron con Ponceau 1X (*Sigma Aldrich*, P3504) de tal forma que se pudiera comprobar si la transferencia se había realizado correctamente al poderse apreciar las bandas con proteína en color rojo en la membrana. Antes de proceder con la detección de la proteína de interés, las membranas fueron lavadas en H₂O miliQ hasta la desaparición del colorante.

Para realizar la detección de las proteínas de interés, α SMA y CTGF, y de la proteína normalizadora, α Tubulina, mediante marcaje con anticuerpos, las membranas fueron primero bloqueadas durante 1h a T^a amb en TBS-T (TBS 1x, 0.1% Tween 20) con BSA al 5% para evitar uniones inespecíficas. Tras 3 lavados de 10min en TBS-T, las membranas fueron incubadas O/N a 4°C en agitación con los anticuerpos primarios (**Tabla 15**) en TBS-T con 2% BSA. Después, las membranas fueron incubadas durante 1h a T^a amb en oscuridad con los anticuerpos secundarios (**Tabla 15**) en TBS-T con 2% BSA y 0.02% SDS, y lavadas 3 veces con TBS-T y 1 vez con TBS 1X (lavados de 10min en oscuridad).

Anticuerpos	Dilución	Casa Comercial
Anticuerpo de conejo anti – α SMA de humano	1/1000	<i>Cell Signaling, #19245</i>
Anticuerpo de conejo anti-CTGF de humano	1/1000	<i>Abcam, Ab6992</i>
Anticuerpo de ratón anti – α Tubulina de humano	1/8000	<i>Sigma Aldrich, T5168</i>
Anticuerpo anti –conejo IRDye 800CW hecho en Cabra	1/20000	<i>LICOR - 92632211</i>
Anticuerpo anti – ratón IRDye 680RD hecho en Cabra	1/20000	<i>LICOR - 92668070</i>

Tabla 15. Anticuerpos para detección proteica mediante Western Blot.

Se tomaron imágenes de las membranas marcadas utilizando para ello el sistema *Odyssey CLx* (*LICOR Biosciences*) con el software *Image Studio* (*LICOR Biosciences*) y éstas fueron analizadas y cuantificadas con el software *FIJI* (*Image J*) midiendo la intensidad de la señal de las bandas correspondientes a α SMA normalizando frente a la α Tubulina para cada una de las condiciones.

3.2.5.4 Estudio de receptores de Cortistatina en LX2.

Para el estudio de los receptores a través de los que Cortistatina podría ejercer su efecto sobre las HSCs humanas se realizó un subcultivo de LX2 sobre cristales siguiendo los pasos especificados en el apartado anterior para el análisis de la expresión de α SMA mediante IFI. Durante los 7 días del subcultivo las LX2 fueron estimuladas con TGF β 1 (5ng/mL) y tratadas con Cortistatina-17 (100nM) en presencia o ausencia de los antagonistas recogidos en la **Tabla 12** con la misma pauta de administración que el propio neuropéptido. La obtención y análisis de imágenes se realizó tal como se describió en el apartado 3.2.5.2.

3.2.5.5 Estudio de la capacidad de contracción en HHStEC.

Para el estudio del efecto de Cortistatina sobre la capacidad de contracción de las HSCs se utilizó la línea celular HHStEC. Estas células se cultivaron en medio DMEM con 10% FBS y 1% p/s y se llevaron a cabo 2 tipos de experimentos:

- Ensayo de generación arrugas

Para este ensayo se generó un sustrato polimérico en placas de 35mm² (*TPP, 93040*) (**Fig. 53**) mediante la mezcla de los reactivos *Alpha-Gel K A y B* (40-2407A, de composición desconocida) con una proporción 2:1 para obtener una rigidez de 5 kPa. A esta mezcla se le añadió el retardante *Alpha- Retard A* (*CHT Bezema*) al 0.1%, de tal forma que la polimerización del sustrato no se

produjera desde el comienzo. Se añadieron 200 μL de la mezcla a cada placa de 35mm² que se hicieron difundir mediante la fuerza centrífuga generada por un *Spin Caster* girando a 1500rpm, 1500rpm/s² durante 3.2seg. A continuación, las placas fueron calentadas a 60° durante un mínimo de 4h para polimerizar el sustrato. Una vez polimerizado, el sustrato se expuso a un tratamiento con plasma durante 25seg para aumentar su hidrofiliia. Para favorecer la adherencia de las células al sustrato, éste fue tratado a continuación con 1% APTES ((3-aminopropil) trietoxilano, *Sigma Aldrich*, A3648) durante 90min a 60°C, con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EDAC (Clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodimida, *Sigma Aldrich*, E7750) durante 15min a T^a amb y finalmente 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ gelatina durante 2h mínimo.

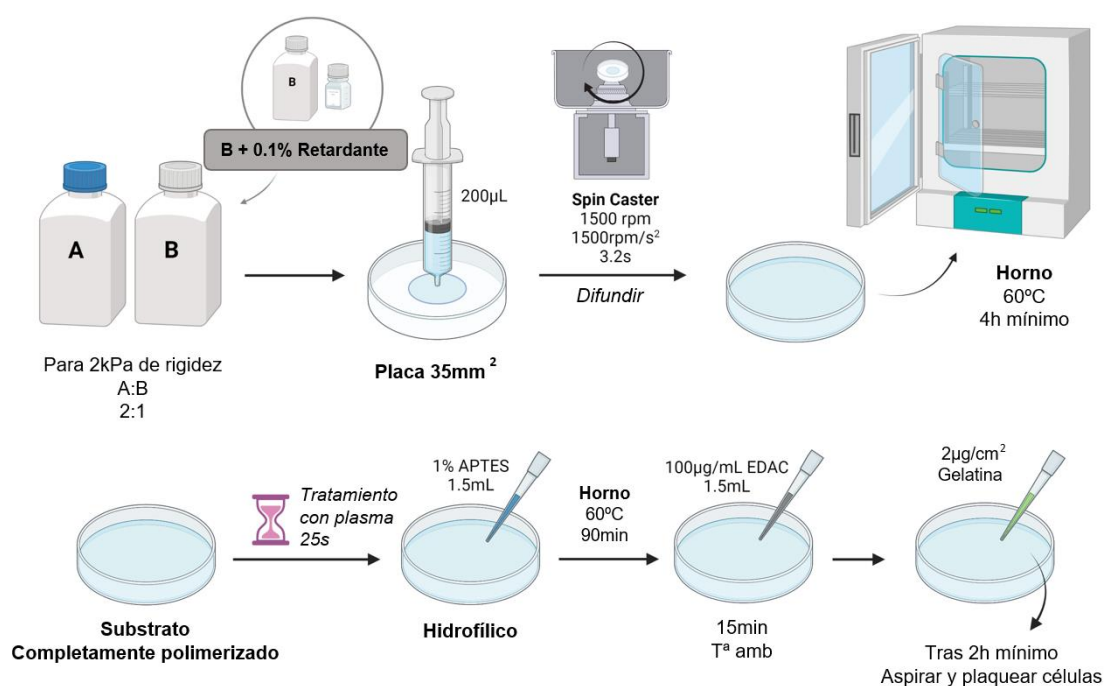


Figura 53. Diagrama de generación y tratamiento de sustrato polimérico.

Figura creada con Biorender.

Se cultivaron 3.000 células en cada placa sobre el sustrato polimerizado y tratado (**Fig. 53**). Pasadas 3h se procedió a la estimulación e incubación de las células atendiendo a las siguientes 4 condiciones: control (células sin estimulación), + Cortistatina-17 (100nM), + TGF β 1 (2ng/mL) y + TGF β 1 (2ng/mL) + Cortistatina-17 (100nM). A las 3h tras la estimulación se tomaron 10 imágenes por condición con el microscopio de campo claro *Primo Vert Zeiss* con objetivo 40X. Una vez tomadas las imágenes se volvieron a incubar las placas a 37°C hasta un total de 4 días desde la estimulación (repetiendo la administración de Cortistatina-17 a las 48h), momento en el que se repitió la toma de imágenes.

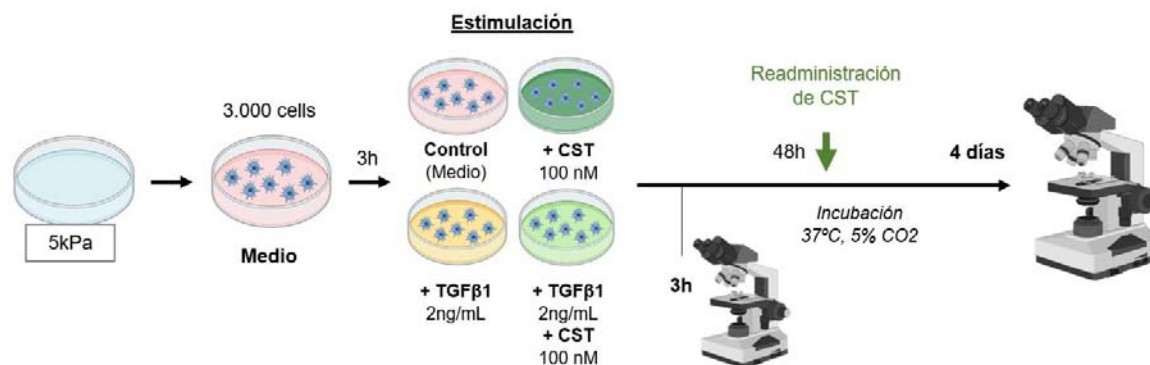


Figura 54. Diagrama experimental del ensayo de generación de arrugas.

Figura creada con Biorender.

Las imágenes obtenidas en ambos momentos se analizaron mediante el software *FIJI (Image J)* aplicando el método de umbralización (*'thresholding'*) y se cuantificó el área ocupada por las arrugas generadas en el sustrato por la contracción de las células (**Fig. 55**).

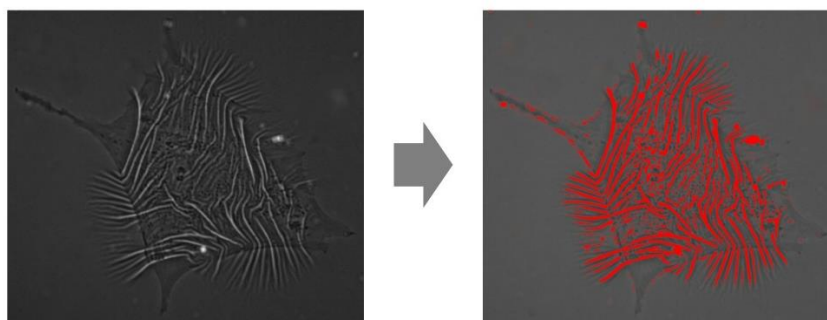


Figura 55. Análisis y cuantificación de arrugas mediante thresholding.

- Ensayo de contracción de geles de colágeno:

Para la realización de este ensayo se generaron geles de colágeno con HHStC embebidas en su interior (**Fig. 56**). Mientras las placas de 35mm² sobre las que se generaron los geles de colágeno se mantenían calientes a 37°C, se preparó una mezcla en frío de 100μL de *Nutrogen Type I Bovine Collagen Solution* a 6 mg/mL (*Advanced BioMatrix, 5010*), 100μL de medio DMEM 1X, 11μL de MEM 10X (*Gibco, 15188319*), 10μL NaOH 0.01N y 79μL de DMEM con 50.000 células. Rápidamente se dispusieron 190μL de la mezcla fría sobre cada una de las placas calientes de tal forma que la diferencia de temperatura hiciera polimerizar el gel generado, y se incubaron a 37°C durante 30min. Pasado el tiempo de incubación se añadieron 2.5mL de medio de cultivo atendiendo a las mismas 4 condiciones descritas para el ensayo de arrugas.

Los geles se dejaron incubar durante 4 días a 37°C y se tomó una imagen del gel adherido a la placa considerándose ese momento como tiempo 0 (t₀) con el microscopio *Nikon SMZ800* y el software *μScope Professional Version 22.5*. A continuación, se desacopló el gel de la placa cuidadosamente

con ayuda de una aguja de 23G y se tomaron imágenes pasados 1min y 15min (t1 y t15 respectivamente).

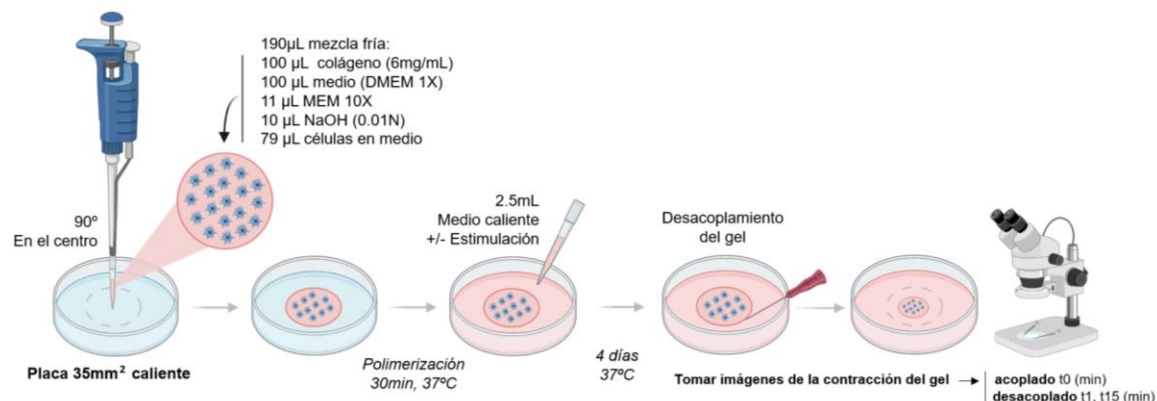


Figura 56. Diagrama experimental del ensayo de contracción de geles de colágeno.

Figura creada con Biorender.

Las imágenes fueron analizadas con el software *FIJI (Image J)*. Se cuantificó el área ocupada por el gel en cada punto temporal dándole un valor de 100% al área cubierta a t0. La delimitación del área se realizó bordeando el perímetro del gel en cada imagen tal como se observa en la **Figura 57**.

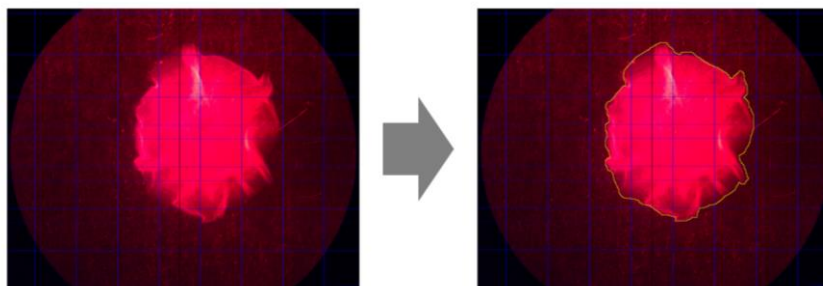


Figura 57. Análisis y cuantificación del área del gel de colágeno.

3.2.6 Tratamiento de fibroblastos primarios humanos con Cortistatina.

Gracias a la estancia internacional se pudo realizar el estudio del posible efecto de Cortistatina sobre fibroblastos humanos primarios, NHLF y NHDF, a través de experimentos de análisis de expresión génica, IFI y ensayos de contracción.

Para estudiar el nivel de expresión génica de Cortistatina en estas células, se realizaron cultivos de 10⁶ NHLFs (*Lonza, CC-2512*) y NHDFs (*Lonza, CC-2511*) en medio DMEM con 10% FBS y 1% P/S en placa de 10cm². Se analizó la expresión génica de *Cort* en ambos tipos de fibroblastos primarios en condiciones normales (cultivadas en medio sin estimulación) y tras ser activadas durante 24h por estimulación con TGFβ1 (2ng/mL) como en el apartado 3.2.5.1. y la secuencia nucleotídica de los *primers* de la **Tabla 13**.

Para el análisis de la expresión de α SMA mediante IFI, 5×10^4 NHLF fueron cultivados en placas de 35mm^2 durante 24h. Pasado ese tiempo, los NHLF fueron estimulados atendiendo a las siguientes 4 condiciones: control (medio sin estimulación), +TGF β 1 (2ng/mL), + Cortistatina -17 (100nM), +TGF β 1 + Cortistatina-17. Tras 4 días, con re-administración de Cortistatina-17 a las 48h, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1x y fijadas con PFA al 3% durante 20min a T^a amb. A continuación, las células fueron lavadas de nuevo 3 veces con PBS 1X y permeabilizadas con 0.2% Tritón X-100 (*BioShop, TRX777.500*) en PBS 1X durante 5min a T^a amb. Tras otros 3 lavados con PBS 1X se llevó a cabo el proceso de bloqueo durante 1h con PBS 1X + 0.3% BSA (*BioShop, ALB003.100*) a T^a amb antes de realizar la incubación con los anticuerpos primarios (**Tabla 16**), en solución de PBS 1X + 0.3% BSA + 0.02% Tritón X-100, O/N a 4°C. Tras lavar las células 3 veces con PBS 1X + 0.02% Tritón X-100, éstas se incubaron con los anticuerpos secundarios (**Tabla 16**), en solución PBS1X + 0.02% Tritón X-100, durante 1h a T^a amb en oscuridad. Se realizaron 3 nuevos lavados con PBS 1X + 0.02% Tritón X-100 y los NHLF fueron incubados con DAPI en PBS 1X + 0.02% Tritón X-100, durante 10min a T^a amb en oscuridad, antes de ser montados con el medio de montaje PVA (*Southern Biotech Fluormount-G, 0100-01*) y cubreobjetos redondos de 50mm (*VWR, 48393-081*).

Anticuerpos	Dilución	Casa Comercial
Anticuerpo de ratón anti – α SMA de humano	1:100	<i>Sigma Aldrich - A5228</i>
Anticuerpo de conejo anti – Colágeno de humano	1:200	<i>OriGene, R1038</i>
FITC Cabra anti – IgG2a de ratón	1:100	<i>SouthernBiotech, 1080-02</i>
Alexa Flúor 647 Cabra anti – IgG de conejo	1:200	<i>Invitrogen, A21246</i>
Alexa Flúor 568 anti – Faloidina de humano	1:200	<i>Invitrogen, A12380</i>
DAPI	1:1000	<i>Sigma Aldrich - 32670</i>

Tabla 16. Anticuerpos utilizados durante la IFI de NHLF.

La adquisición de imágenes se realizó con el microscopio confocal *SP8 Lightning (Leica)* con una magnificación 400X y el análisis de la intensidad de la fluorescencia se llevó a cabo con el software *FIJI (Image J)*. Los resultados cuantitativos fueron expresados como la media de los valores obtenidos al evaluar aleatoriamente 10 células/condición.

Y finalmente, los ensayos de generación de arrugas y de contracción de geles de colágeno se realizaron en las mismas condiciones que en el apartado 3.2.5.5.

3.3 OBJETIVO 3. Estudiar el efecto terapéutico de la administración de Cortistatina en modelos experimentales de fibrosis hepática.

Para estudiar los efectos que podría ejercer el neuropéptido Cortistatina como tratamiento para la fibrosis hepática, se realizaron modelos experimentales de fibrosis hepática tóxica y de fibrosis hepática colestática tanto en ratones *Cort+/-* y *Cort-/-* como *Cort+/+*. En estos últimos se estudió además el efecto del tratamiento con Cortistatina con diversas pautas de administración.

Durante la realización de ambos modelos, las muestras recogidas se procesaron siguiendo los protocolos descritos para la realización del *Objetivo 1* de esta tesis. Las muestras de tejido hepático recogidas en los momentos que se reflejan en las **Figuras 58** y **59** se analizaron histológicamente mediante las tinciones Rojo Sirio, H/E y la IFI con marcaje para α SMA. Asimismo, se cuantificó el contenido de colágeno en los hígados mediante el análisis de hidroxiprolina, la expresión génica de CTGF, colágeno, α SMA y TGF β 1 a través de PCRs cuantitativas y los niveles de bilirrubina y de las aminotransferasas ALT y AST en sangre.

3.3.1 Modelo de fibrosis hepática colestática con administración de Cortistatina.

El modelo de fibrosis hepática colestática fue generado en ratones *Cort+/-* y *Cort+/+* mediante la ligación del ducto biliar tal como se describió para el *Objetivo 1*.

Mientras que en los ratones *Cort+/-* la administración de 1nmol de Cortistatina-29 o PBS fue cada 2 días por vía intraperitoneal desde el inicio del modelo (**Fig. 58A**), en los ratones *Cort+/+* la se contemplaron 3 pautas de administración distintas: desde día 1, desde día 5 y desde día 14 tras el comienzo del modelo (**Fig. 58B**).

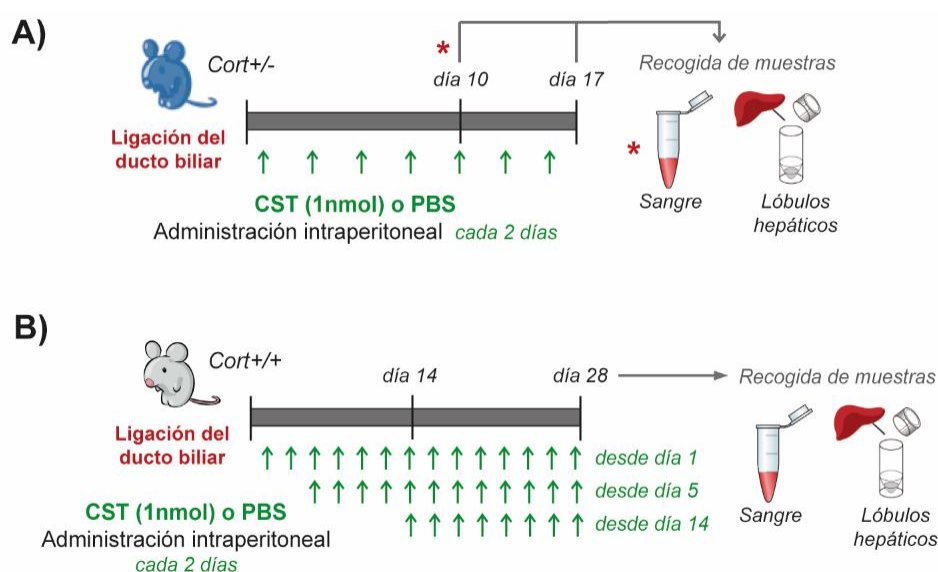


Figura 58. Modelos experimentales de fibrosis hepática colestática con tratamiento con Cortistatina.

A) Pauta de administración de Cortistatina y de recogida de muestras en ratones *Cort+/-*. B) Pauta de administración de Cortistatina y de recogida de muestras en ratones *Cort+/+*.

3.3.2 Modelo de fibrosis hepática tóxica con administración de Cortistatina.

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1.3 se generó el modelo experimental de fibrosis hepática en ratones *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-}. Para el estudio del tratamiento de en ratones *Cort*^{+/+} con fibrosis hepática tóxica, el modelo se generó con una concentración mayor de CCl₄ en aceite de oliva (1:3) que fue inyectado intraperitonealmente 2 veces por semana durante 6 semanas (Fig. 59).

Para el tratamiento de los ratones *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} se administró 1nmol de Cortistatina-29 o PBS a los ratones vía intraperitoneal desde el inicio del modelo (Fig. 59A). Mientras que para el tratamiento de los ratones *Cort*^{+/+} se llevaron a cabo 2 pautas de administración: la primera comenzó su administración al día 5 tras el inicio del modelo y la segunda dio comienzo el día 14 (Fig. 59B). En todos los casos, el neuropéptido Cortistatina-29 se inyectó intraperitonealmente cada 2 días hasta fin del modelo.

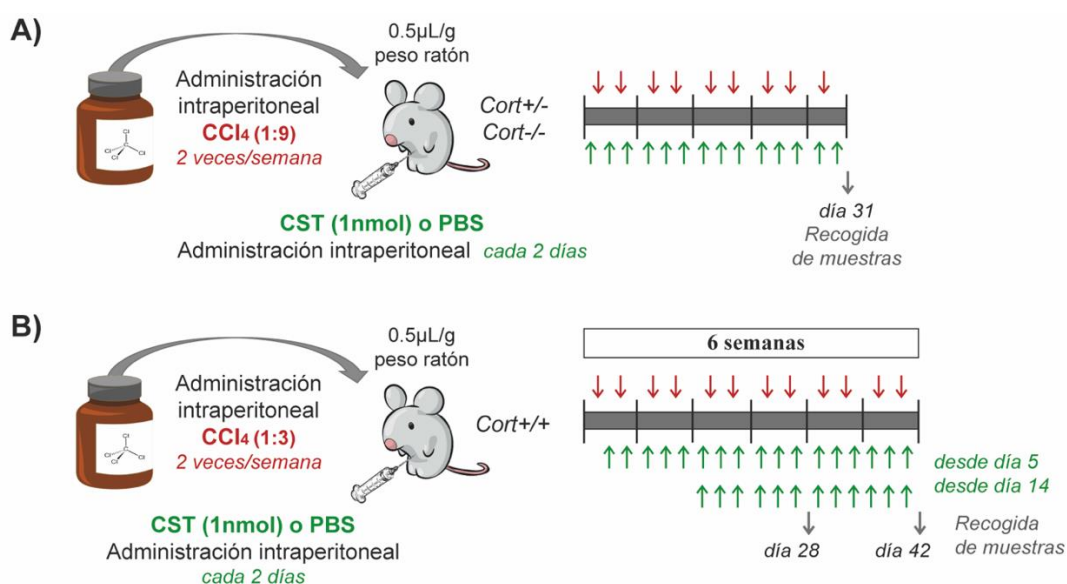
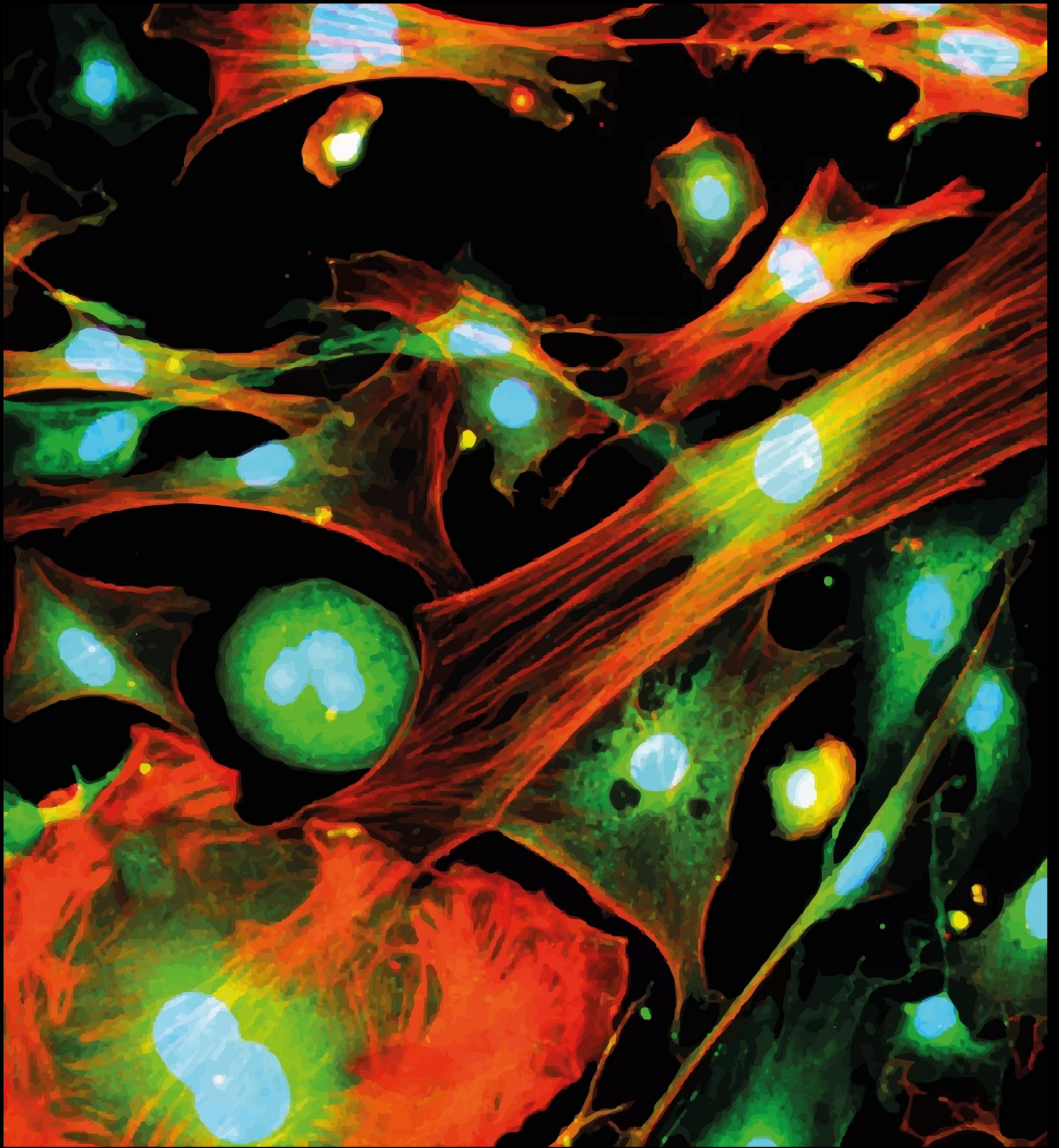


Figura 59. Modelos experimentales de fibrosis hepática tóxica con tratamiento con Cortistatina.

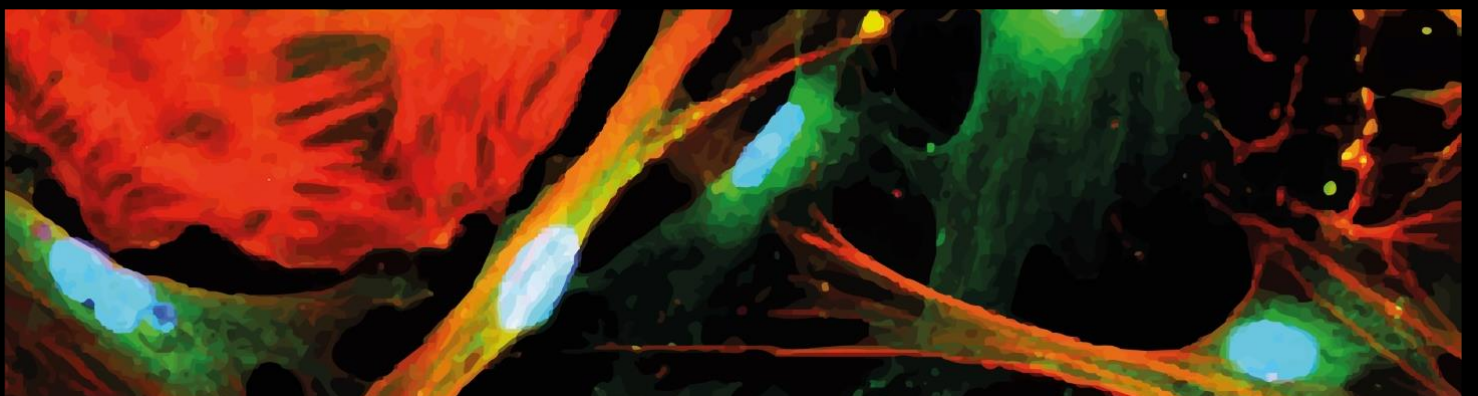
A) Pauta de administración de Cortistatina y de recogida de muestras en ratones *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-}. B) Pauta de administración de Cortistatina y de recogida de muestras en ratones *Cort*^{+/+}.

3.4 ESTADÍSTICA.

Todos los datos fueron expresados como la media \pm SEM (error estándar, del inglés *Standard error of the mean*) y analizados utilizando el software *GraphPad Prism v5.0* (La Joya, CA, USA) en búsqueda de diferencias estadísticas entre los grupos experimentales utilizando para ello el test *Student's t-test* y el test no paramétrico *Mann-Whitney U-test*. Para el análisis de las curvas de supervivencia se utilizó el test *Kaplan-Meier log-rank test*.



4. RESULTADOS



4.1 OBJETIVO 1. Estudiar el papel endógeno de Cortistatina en el desarrollo de la fibrosis hepática experimental.

La complejidad de la respuesta fibrogénica conlleva la intervención de elementos endógenos que regulan su desarrollo, de tal forma que su ausencia puede conllevar un empeoramiento del daño generado por dicha respuesta. Teniendo esto presente y que Cortistatina podría ser uno de esos elementos reguladores, durante este primer objetivo se llevó a cabo el estudio de los efectos que pudiera desencadenar la ausencia de expresión endógena de este neuropéptido en el desarrollo de la fibrosis hepática.

4.1.1 Análisis de la expresión de Cortistatina durante la respuesta fibrogénica.

Primero confirmamos la expresión de Cortistatina en el hígado de ratón (**Fig. 60**). A continuación, comprobamos que tanto las células hepáticas parenquimatosas (que incluyen principalmente hepatocitos) como las no parenquimatosas, NPCs (que incluyen fibroblastos portales y HSCs principalmente), expresaban el gen del neuropéptido, y que esta expresión era del orden de 10-50 veces menor que la mostrada por el córtex cerebral, usada como control positivo de referencia (**Fig. 60**). Asimismo, confirmamos la expresión de Cortistatina en las HSCs en la línea celular humana LX2 (**Fig. 60**).

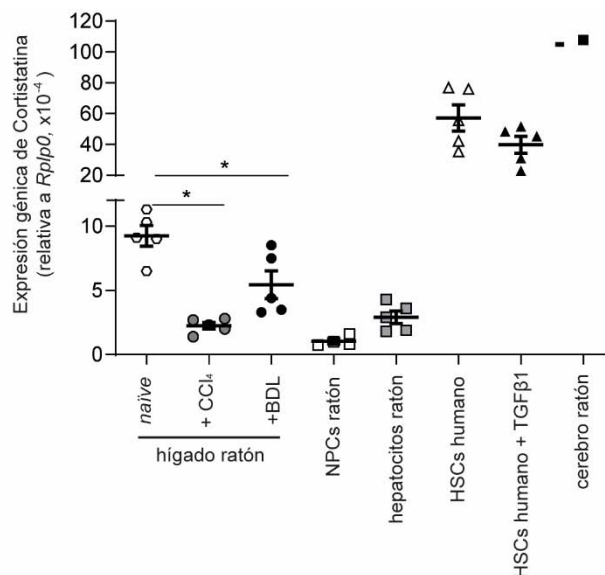


Figura 60. El desarrollo de la respuesta fibrogénica reduce la expresión génica de Cortistatina.

Expresión de ARNm de Cortistatina analizada en tejido hepático de ratones sin tratamiento previo (*naive*), ratones con fibrosis tóxica inducida por CCl₄ y ratones sometidos a fibrosis colestática inducida por BDL tras 15 días desde el inicio de los modelos, en células no parenquimatosas del hígado de ratón (NPCs), en hepatocitos de ratón, en HSCs humanas (LX2), en LX2 activadas con TGFβ1 y en cerebro de ratón. La expresión génica se determinó mediante qPCR en tiempo real y se normalizó frente a los niveles del gen interno *Rplp0*. Los datos son la media ± SEM con puntos que representan valores individuales de animales biológicamente independientes. *p<0,05.

De forma similar a lo observado en las muestras de pacientes con patologías hepáticas fibróticas (**Fig. 33**), la inducción de la respuesta fibrogénica en los modelos de fibrosis hepática por inyección

de un agente tóxico como CCl_4 o por daño colestático (BDL) disminuyó de forma significativa la expresión de Cortistatina en el tejido hepático (Fig. 60). Además, también observamos esta relación inversa entre la expresión de Cortistatina y la respuesta fibrogénica en las células LX2 activadas con $\text{TGF}\beta 1$ (Fig. 60).

4.1.2 Análisis del estado fisiológico de hígados de ratones *Cort*^{+/+}, *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-}.

Para poder analizar correctamente los posibles efectos de la deficiencia endógena de Cortistatina sobre el desarrollo de la fibrosis hepática, primero evaluamos el estado fisiológico hepático de los ratones *naïve* *Cort*^{+/+}, *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} en dos momentos diferentes de su vida (juventud y envejecimiento).

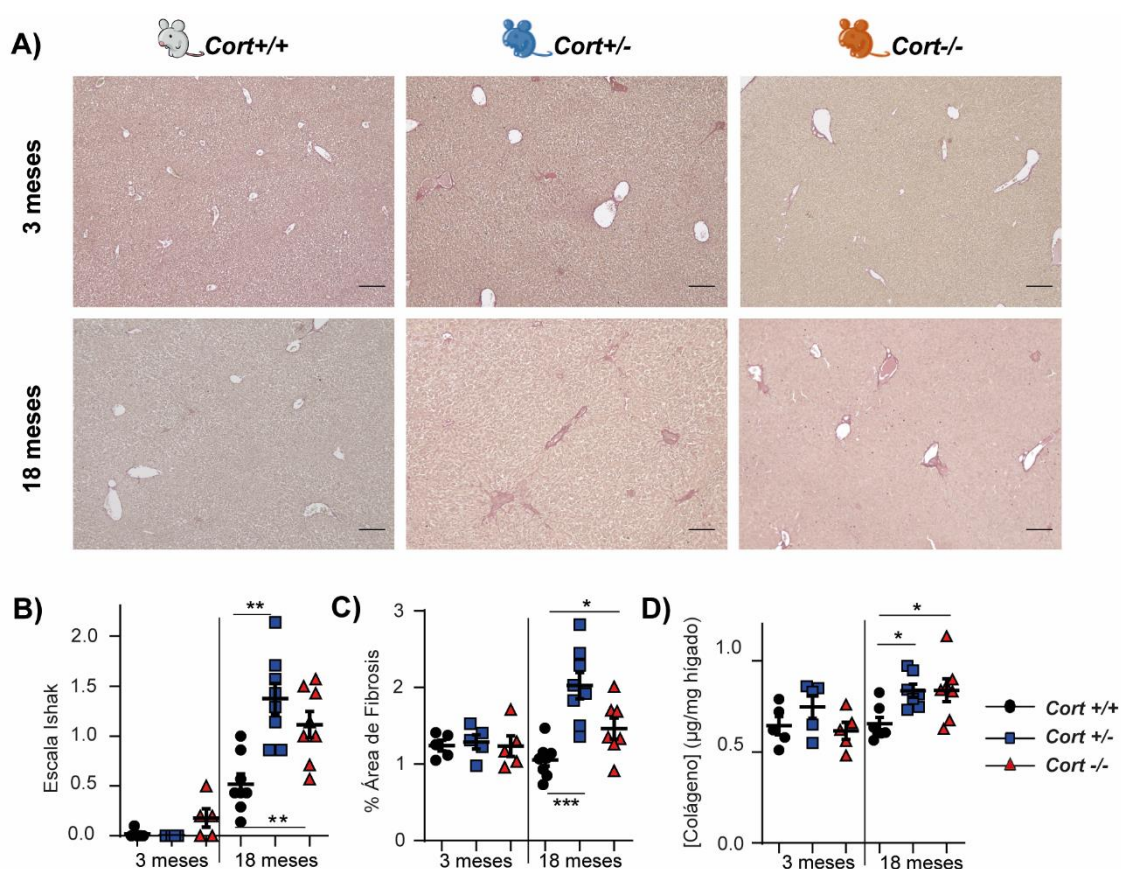


Figura 61. Efecto de la deficiencia endógena en Cortistatina sobre la fibrosis en ratones *naïve* jóvenes y envejecidos. Análisis de los lóbulos hepáticos recogidos de ratones *Cort*^{+/+}, *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} de 3 y 18 meses. A) Análisis histológico mediante tinción Rojo Sirio. Barra de escala: 100 μm . B) Cuantificación del grado de fibrosis presente en los cortes histológicos de los hígados mediante la Escala Ishak. C) Cuantificación del área hepática teñida de rojo con la tinción Rojo Sirio. D) Cuantificación de la generación de colágeno en el hígado mediante análisis de hidroxiprolina. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

No observamos ninguna evidencia de daño de carácter fibrótico en los hígados de ratones jóvenes (3 meses de edad) de los tres genotipos (Fig. 61 A-D). Sin embargo, los hígados de ratones envejecidos (18 meses de edad) deficientes en Cortistatina revelaron la presencia significativa de signos de fibrosis en comparación con los hígados de los ratones *Cort*^{+/+} de la misma edad,

caracterizada por una incipiente desestructuración del parénquima hepático (**Fig. 60A y B**), un mayor porcentaje de área fibrótica Rojo Sirio⁺ (**Fig. 60A y C**), y un aumento en la concentración de colágeno (**Fig. 60D**). En los ratones deficientes en Cortistatina detectamos la presencia de un mayor número de células efectoras de la respuesta fibrogénica diferenciadas en miofibroblastos, caracterizados por la expresión de α SMA, alrededor de las zonas portales (**Fig. 62A y B**), que no estaba presente ni en el tejido hepático de los ratones jóvenes de los tres genotipos ni en el de los ratones *Cort*^{+/+} de 18 meses.

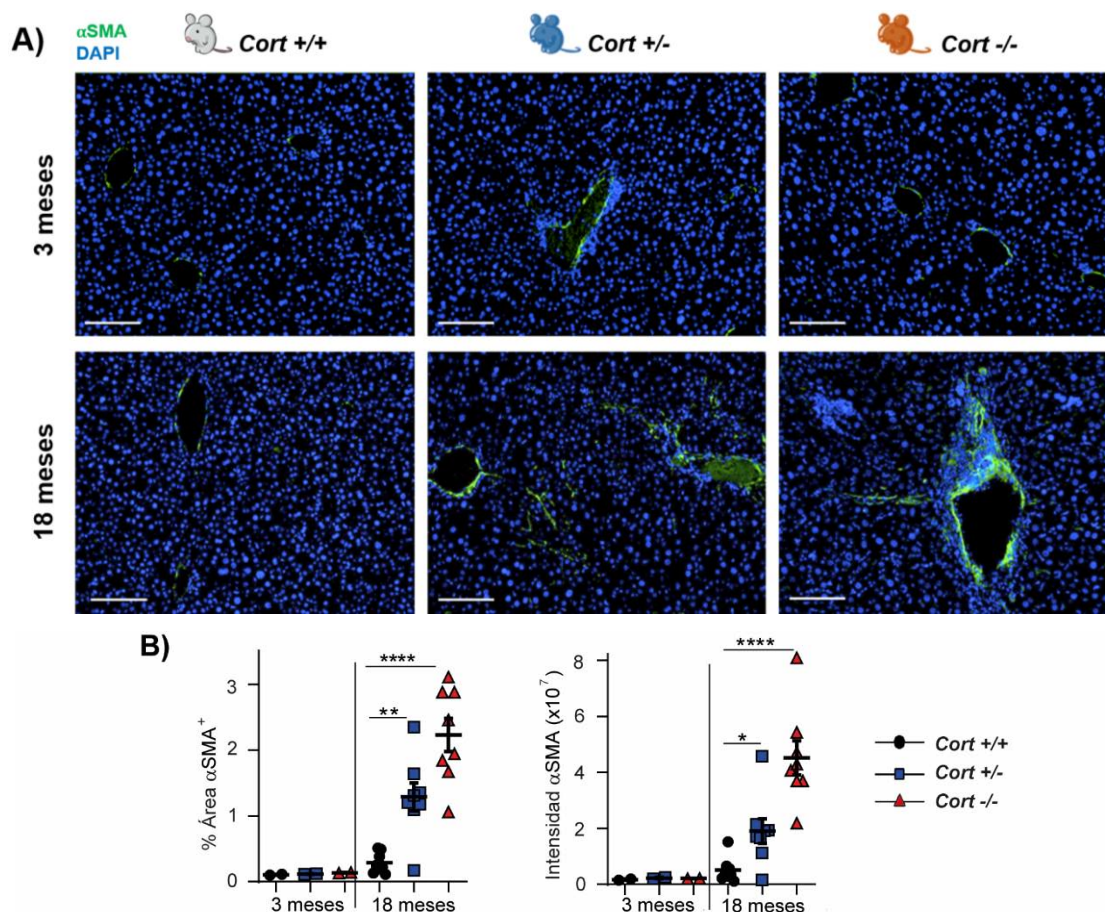


Figura 62. Efecto de la deficiencia en Cortistatina sobre la presencia de miofibroblastos en hígados *naïve* jóvenes y envejecidos.

Análisis de los lóbulos hepáticos recogidos de ratones *Cort*^{+/+}, *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} de 3 y 18 meses. A) Análisis histológico mediante IFI con marcaje para α SMA (verde) y DAPI (azul). Barra de escala: 100 μ m. B) Cuantificación del área α SMA⁺ y de su intensidad de fluorescencia. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Puesto que el componente inflamatorio juega un papel importante en el desencadenamiento y perpetuación de la respuesta fibrogénica, estudiamos este aspecto también en las muestras de tejido hepático de los ratones *naïve* de ambas edades. Mientras que en los ratones jóvenes no observamos elementos asociados a respuestas inflamatorias en ninguno de los tres genotipos (**Fig. 63**), en los ratones envejecidos deficientes en Cortistatina sí encontramos una ligera presencia del componente inflamatorio en pequeños focos dispersos de mayor celularidad que, de forma llamativa, era mayor en alrededor de un 40% de los ratones *Cort*^{+/-} envejecidos (**Fig. 63**) en los que llegamos a encontrar

acúmulos inflamatorios asociados a estructuras vasculares, venas centrilobulillares y entre los espacios sinusoidales (**Fig. 63**, flechas rojas y verdes). Curiosamente, en estos ratones con mayor daño tisular observamos también un engrosamiento irregular y acelular de los vasos hepáticos (**Fig. 63**, flechas naranjas) Además, esta mayor celularidad se correspondía con la expresión de los marcadores inflamatorios TNF α (citoquina pro-inflamatoria) y F4/80 (marcador de KCs activadas) (**Fig. 64**). Sin embargo, en ningún caso observamos el desarrollo de patología, y las diferencias en cuanto a la respuesta inflamatoria entre los ratones envejecidos *Cort*^{+/+}, *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} no fueron significativas (**Fig. 63** y **64**).

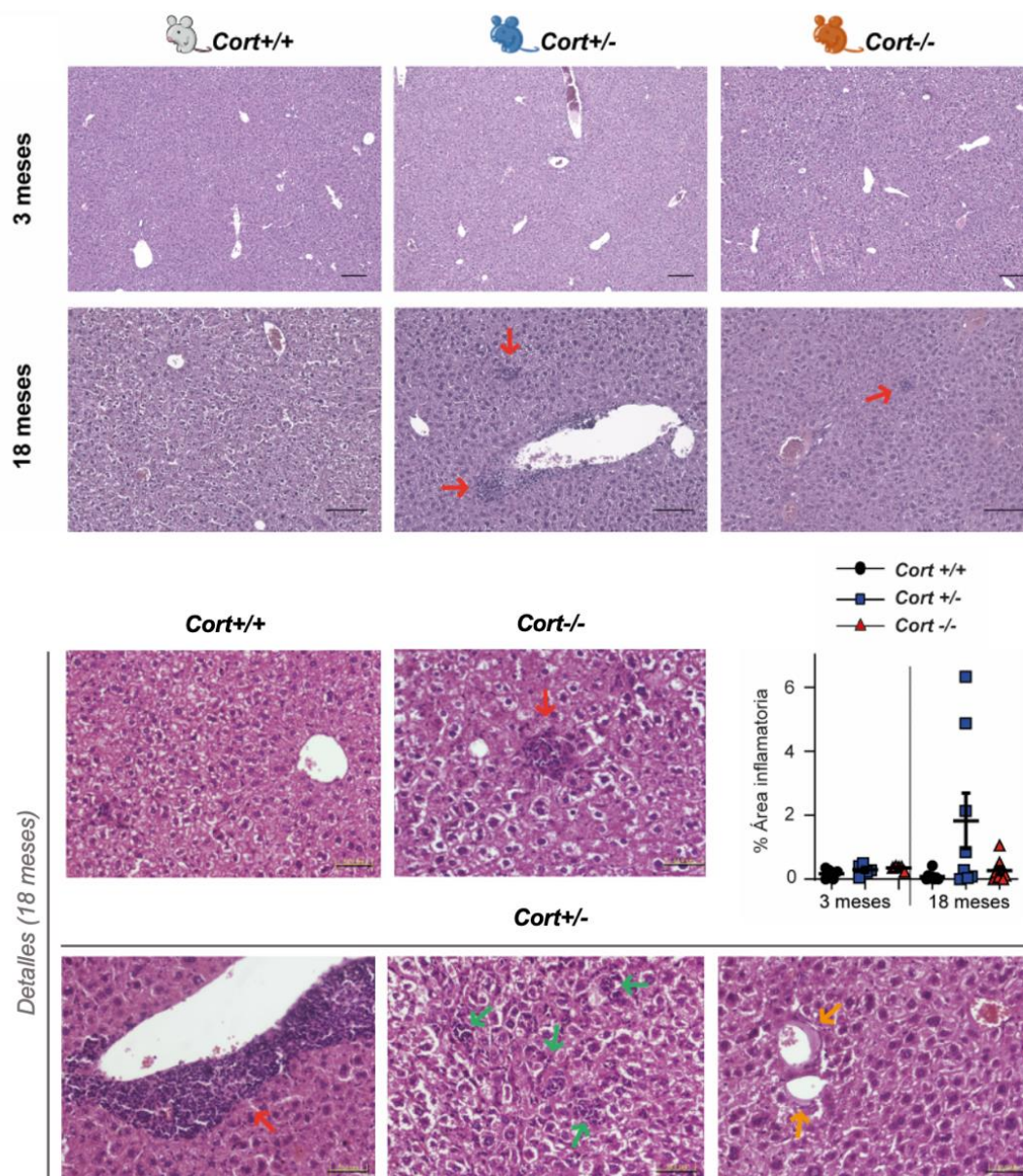


Figura 63. Efecto de la deficiencia endógena en Cortistatina en el tejido hepático de ratones *naïve* jóvenes y envejecidos.

Análisis de los lóbulos hepáticos recogidos de ratones *Cort*^{+/+}, *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} de 3 y 18 meses teñidos con Hematoxilina/ Eosina (H/E). Barra de escala: 100 μ m Cuantificación del área ocupada por focos de alta celularidad. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. Abajo: Detalles de la tinción H/E, ratones 18 meses. Barra de escala: 50 μ m. Flechas rojas: focos alta celularidad. Flechas verdes: Infiltrado celular en espacios sinusoidales. Flechas naranjas: engrosamiento de paredes arteriolas.

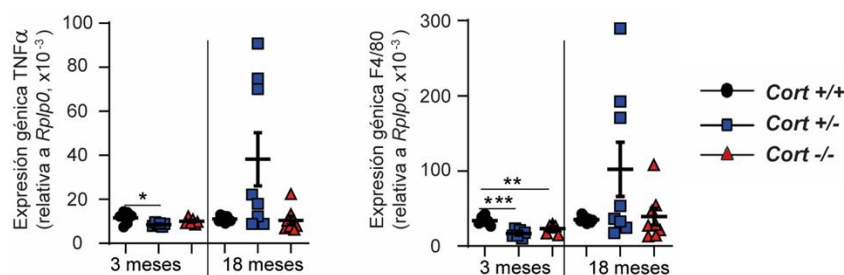


Figura 64. Efecto de la deficiencia endógena en Cortistatina sobre la expresión de marcadores de inflamación en ratones naïve jóvenes y envejecidos.

Análisis de la expresión génica de marcadores de inflamación TNF α y F4/80 en tejido hepático de ratones *Cort*^{+/+}, *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} de 3 y 18 meses determinada por qPCR a tiempo real y comparada frente a los niveles del gen interno *Rplp0*. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001

4.1.3 Estudio del efecto de Cortistatina durante la fibrosis hepática colestática.

Para estudiar el efecto endógeno de Cortistatina en el desarrollo de la respuesta fibrogénica en enfermedades como la cirrosis primaria biliar o la colangitis esclerosante, generamos el modelo de fibrosis hepática colestática mediante BDL en ratones *Cort*^{+/+}, *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-}. Durante la realización del modelo experimental de fibrosis colestática encontramos que la deficiencia en Cortistatina se correlacionaba con un aumento de la tasa de mortalidad. Mientras que el 100% de los ratones *Cort*^{+/+} sobrevivían a lo largo del modelo, un 40% de los ratones deficientes en Cortistatina no llegaban a fin de experimento (Fig. 65). Encontramos que esta elevada tasa de mortalidad de los ratones *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} se correlacionaba con un daño hepático de carácter fibrótico mucho más temprano y exacerbado que el desarrollado por los ratones *Cort*^{+/+} (Fig. 66 A-C).

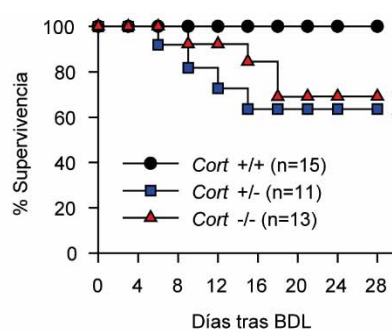


Figura 65. Los ratones deficientes en Cortistatina presentan mayor tasa de mortalidad por fibrosis colestática.

Durante el modelo de fibrosis colestática inducida por BDL la supervivencia de los ratones *Cort*^{+/+}, *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} fue monitorizada hasta fin de experimento. **p*<0.05 frente a ratón *Cort*^{+/+}.

Mientras que a nivel fisiológico el colágeno se encontraba alrededor de los vasos hepáticos (Fig. 61) al igual que en los ratones *sham* de los tres genotipos (Fig. 66), la inducción de la respuesta fibrogénica en ratones *Cort*^{+/+} generó el engrosamiento de dichos vasos junto con la aparición de nuevos pseudo-ductulillos alrededor de las venas y espacios porta para intentar así reabastecer el flujo de bilis restringido por la BDL (Fig. 66A). Los ratones *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} mostraron mayor generación de ECM y de pseudo-ductulillos comparado con los ratones *Cort*^{+/+} (Fig. 66A y B), lo

que se correspondía con un elevado contenido en colágeno detectado en el tejido hepático de los ratones deficientes en Cortistatina (**Fig. 66C**). Observamos que la deficiencia en Cortistatina favoreció la activación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica de forma más temprana y potente que en los ratones *Cort+/+* (**Fig. 67B**). Hecho que además se correlacionaba con la expresión génica de los principales marcadores de fibrosis (**Fig. 68**). La deficiencia en Cortistatina en los ratones con fibrosis hepática generada por BDL favoreció a una mayor expresión de los genes *Ctgf*, *Colla2* y α *Sma* con respecto a la detectada en los hígados de los ratones *Cort+/+* (**Fig. 68**). Sin embargo, en relación al nivel de expresión génica de *Tgfb1* encontramos marcadas diferencias entre los ratones deficientes en Cortistatina con respecto a los *Cort+/+* dependiendo de si la deficiencia en Cortistatina era parcial o total. Mientras que los ratones *Cort-/-* mostraron una mayor expresión de *Tgfb1*, los niveles de expresión de este factor fueron significativamente menores en los ratones *Cort+/-* (**Fig. 68**).

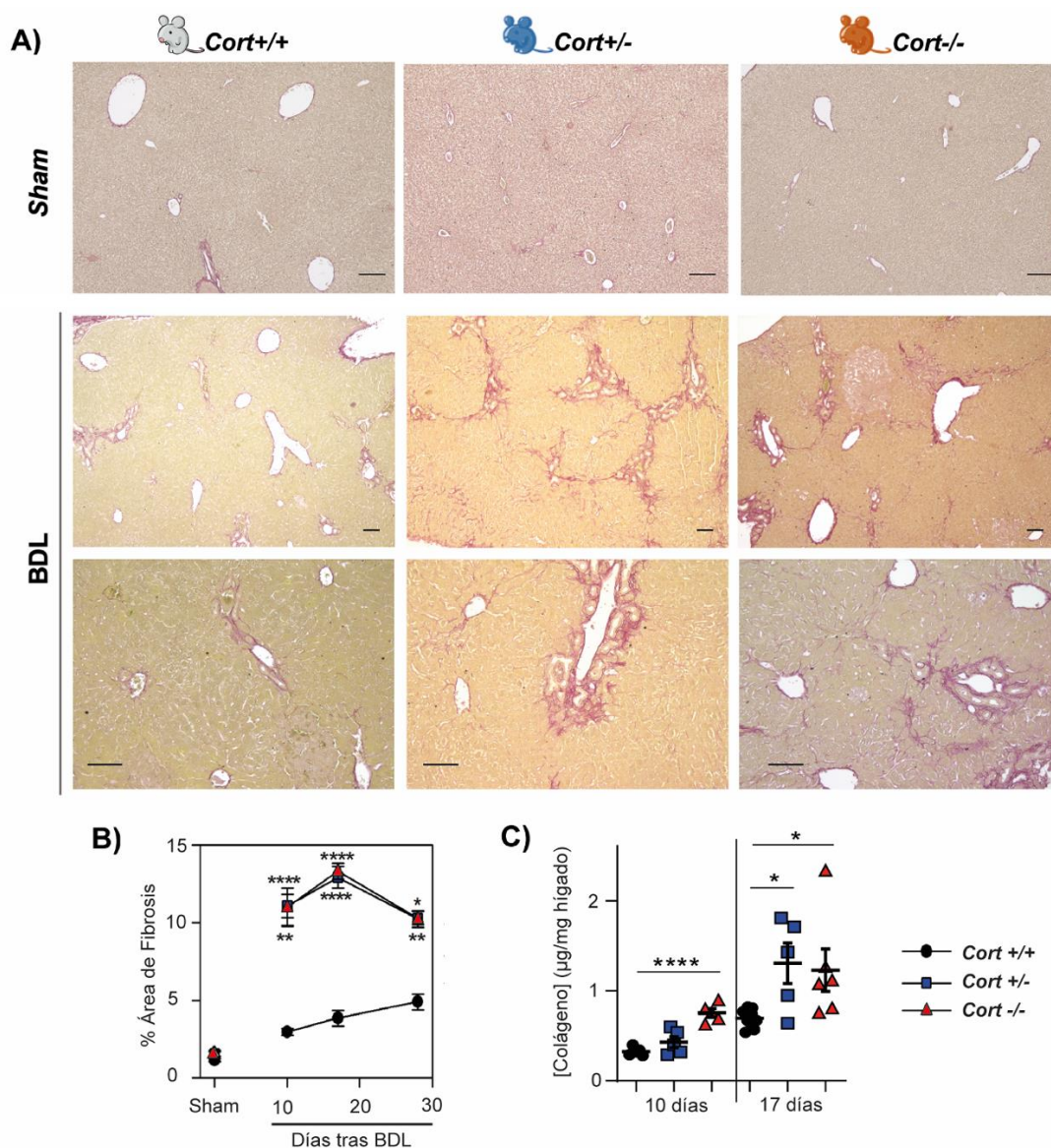


Figura 66. La deficiencia en Cortistatina exacerba la fibrosis hepática colestática.

La fibrosis hepática colestática fue inducida en los ratones *Cort+/+*, *Cort+/-* y *Cort-/-* mediante BDL y los ratones *sham* de cada genotipo se tomaron como control. La extensión de la fibrosis se analizó mediante la tinción Rojo Sirio. A)

Imágenes representativas de tejido hepático a 17 días tras inicio del modelo de fibrosis hepática colestática. Barra de escala: 100µm. B) Cuantificación del área ocupada por tejido hepático teñido de rojo en la tinción Rojo Sirio a 10, 17 y 28 días tras BDL. (5-15 ratones/condición) C) Cuantificación del contenido de colágeno mediante análisis de hidroxiprolina en los hígados recogidos a los tiempos indicados. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 frente a un ratón Cort+/+.

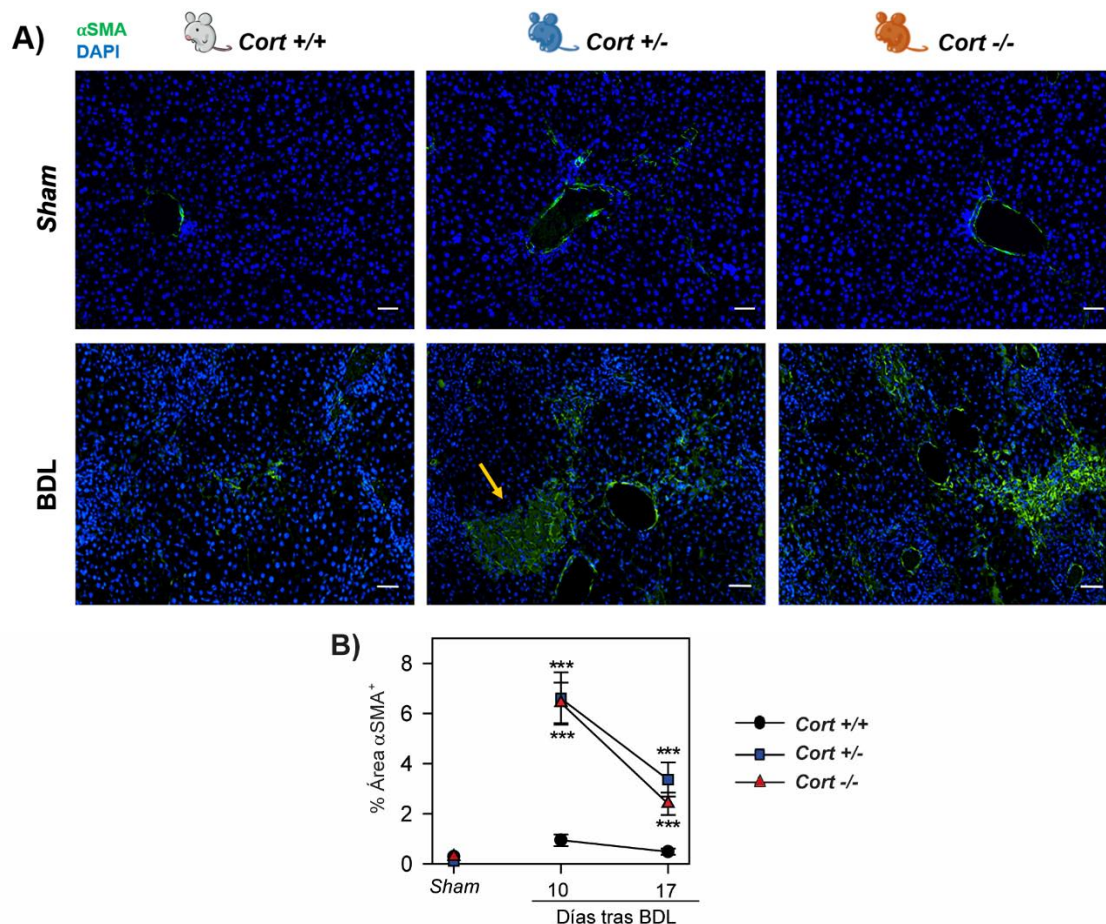


Figura 67. Mayor presencia de miofibroblastos en el tejido hepático de ratones deficientes en Cortistatina.

La fibrosis hepática colestática fue inducida en los ratones Cort+/+, Cort+/- y Cort-/- mediante BDL y los ratones sham de cada genotipo se tomaron como control. A) Imágenes representativas de la presencia positiva de miofibroblastos activados en el tejido hepático a 17 días tras inicio del modelo de fibrosis hepática colestática mediante IFI con marcaje verde para α SMA y azul para DAPI. Barra de escala: 100µm. B) Cuantificación del área ocupada por marcaje α SMA+ en los hígados recogidos a los tiempos indicados. (5-7 ratones/condición). Datos = media + SEM. ***p<0.001 frente a un ratón Cort+/+.

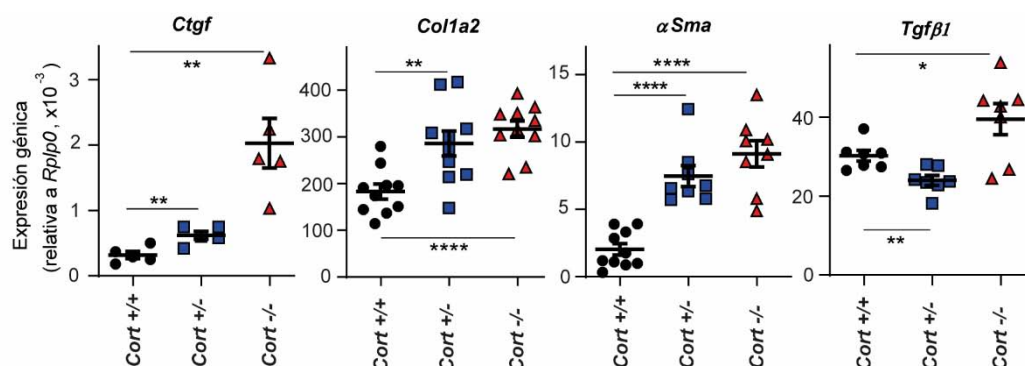


Figura 68. La deficiencia en Cortistatina aumentó la expresión génica de marcadores de fibrosis tras BDL.

Análisis de la expresión de los genes *Ctgf*, *Colla2* (matriz extracelular), *α Sma* (miofibroblasto) y *Tgf β 1* (regulador respuesta fibrogénica) en muestras de tejido hepático obtenido de ratones Cort+/+, Cort+/- y Cort-/- a 10 días tras BDL. La expresión génica se determinó mediante qPCR en tiempo real y se normalizó frente a los niveles del gen interno *Rplp0*. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001.

El estudio histopatológico reveló también mayor daño hepático asociado a la muerte hepatocitaria según la evaluación de la presencia de grandes zonas necróticas parenquimatosas, colangitis e inflamación periportal (Fig. 69A y B).

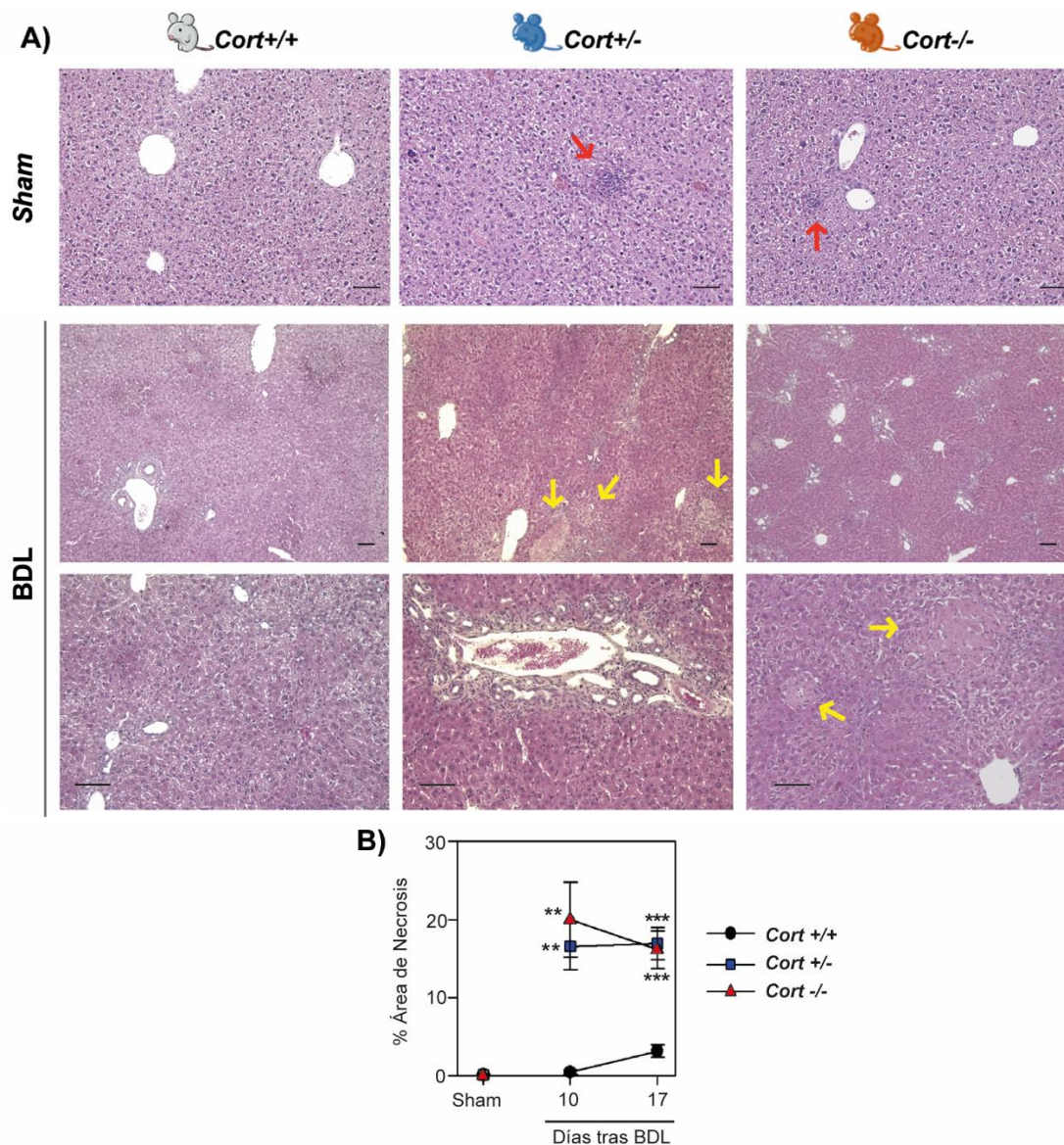


Figura 69. La deficiencia en Cortistatina incrementa la muerte hepatocitaria por BDL.

La fibrosis hepática colestática fue inducida en los ratones *Cort*^{+/+}, *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} mediante BDL tomando a los ratones *sham* de cada genotipo como control. A) Imágenes representativas de tejido hepático a 17 días tras inicio del modelo de fibrosis hepática colestática. Barra de escala: 100µm. Flechas amarillas: balsas de necrosis. Barra de escala: 100µm. B) Cuantificación de la extensión de las áreas de necrosis en los cortes histológicos de tejido hepático recogido en los tiempos indicados y teñido con H/E. (5-13 ratones/condición). Datos = media + SEM. **p<0.01, ***p<0.001 frente a ratón *Cort*^{+/+}.

El daño tisular presente en los hígados de los ratones deficientes en Cortistatina se tradujo en el aumento de los niveles séricos de bilirrubina, ALT y AST en comparación con los detectados en los ratones *Cort*^{+/+} (Fig.70), lo que refleja una peor función hepática ante la deficiencia en Cortistatina.

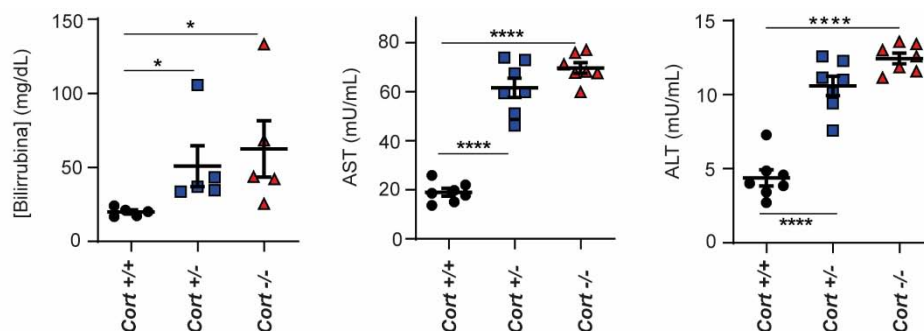


Figura 70. Mayores niveles séricos de bilirrubina, AST y ALT en los ratones deficientes en Cortistatina con fibrosis colestática.

Análisis de los niveles de bilirrubina directa, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en muestras de plasma de ratones *Cort+/+*, *Cort+/-* y *Cort-/-* a los 10 días tras BDL. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

4.1.4 Estudio del efecto de Cortistatina en el desarrollo de la fibrosis hepática tóxica.

Mediante la generación del modelo de fibrosis hepática tóxica por administración del compuesto tóxico CCl_4 quisimos recrear un daño similar al que se produciría en pacientes con enfermedades como la hepatitis crónica viral, la esteatohepatitis no alcohólica u otras con un componente asociado a hepatotoxicidad.

Inicialmente llevamos a cabo la inducción del modelo de la administración de CCl_4 diluido en el vehículo con una proporción 1:3, sin embargo, con estas condiciones obtuvimos una tasa de mortalidad del 80% de los ratones deficientes en Cortistatina frente a un 100% de supervivencia de los *Cort+/+*, por lo que decidimos reducir la concentración del agente tóxico y llevar a cabo su administración en una proporción tres veces menor, 1:9. A pesar de ello, un 25% de los ratones deficientes en Cortistatina fallecieron antes del fin del modelo, mientras que todos los ratones *Cort+/+* sobrevivieron (**Fig. 71**).

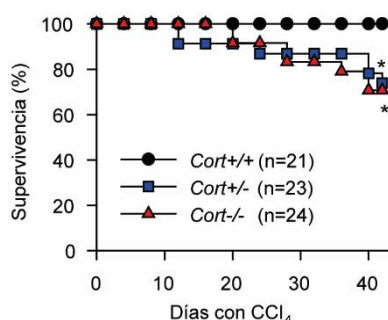


Figura 71. La deficiencia en Cortistatina predispone a una mayor tasa de mortalidad por fibrosis hepática tóxica. Durante el modelo de fibrosis hepática tóxica inducida por CCl_4 (1:9 en aceite de oliva) la supervivencia de los ratones *Cort+/+*, *Cort+/-* y *Cort-/-* fue monitorizada hasta fin de experimento. * $p < 0.05$ frente a ratón *Cort+/+*.

La necropsia realizada a los ratones con fibrosis hepática tóxica reveló el desarrollo de grandes daños en el tejido hepático de los ratones deficientes en Cortistatina, daños que podían apreciarse incluso macroscópicamente (**Fig. 72**). La deficiencia en Cortistatina favoreció el desarrollo de focos

fibróticos de gran tamaño (**Fig. 72**, flechas blancas) en los lóbulos hepáticos que además estaban más adheridos entre sí y con el resto de tejidos circundantes al mismo tiempo que presentaban mayoritariamente un aspecto más graso con pérdida del tono rojizo claro característico del tejido hepático sano. Este modelo no cursó con cambios aparentes en la vesícula biliar (**Fig. 72**, flechas azules). Sin embargo, los daños en los ratones *Cort+/-* y *Cort-/-* no se limitaban sólo al tejido hepático, sino que también observamos que los pulmones estaban afectados (**Fig. 72**, flechas naranjas).

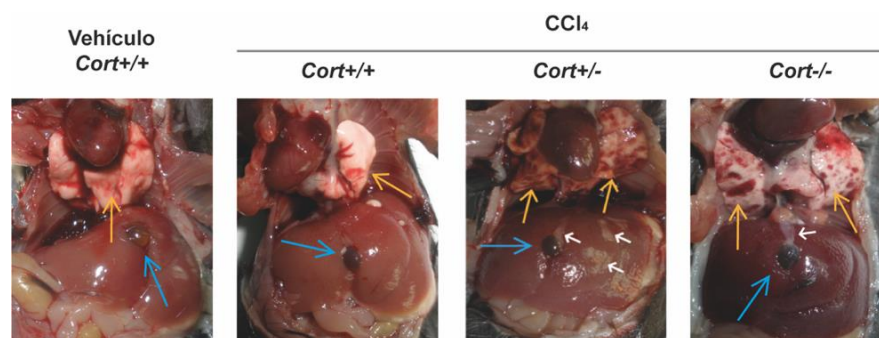


Figura 72. La deficiencia en Cortistatina genera daños macroscópicos en ratones con fibrosis hepática tóxica. Imágenes representativas de la necropsia realizada a ratones *Cort+/+*, *Cort+/-* y *Cort-/-* a los 42 días tras el comienzo del modelo. Flecha azul: vesícula biliar. Flecha naranja: daño pulmonar. Flecha blanca: daño hepático.

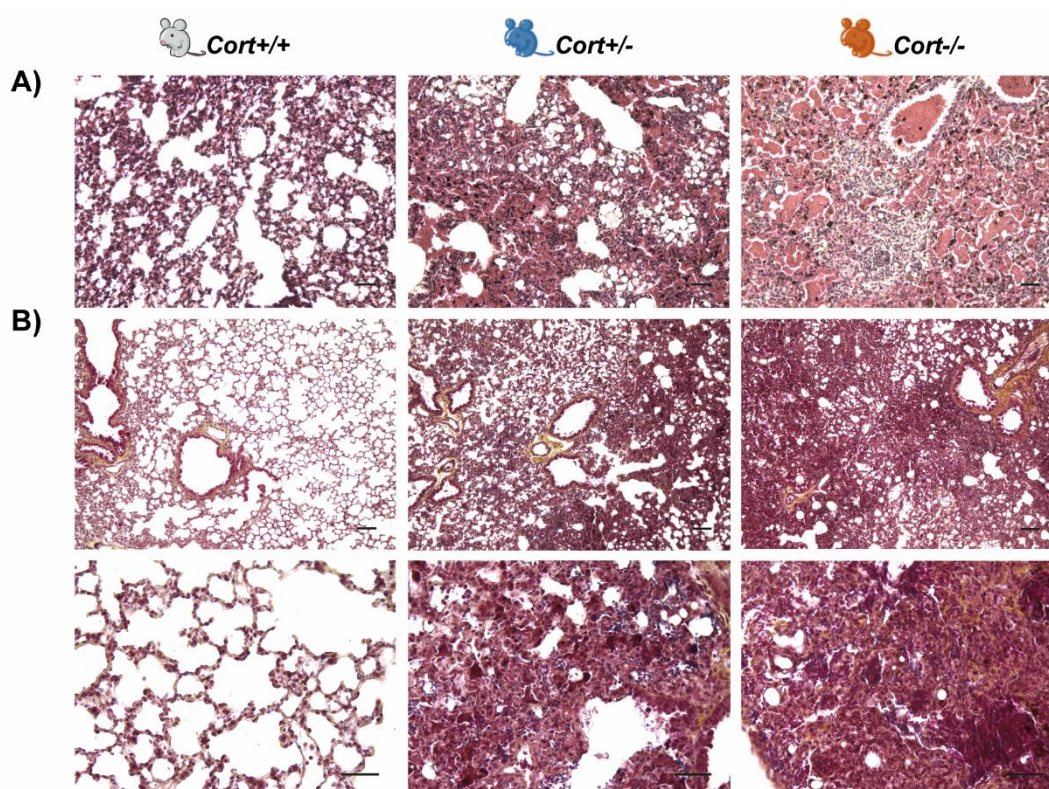


Figura 73. Gran daño tisular en los pulmones de ratones deficientes en Cortistatina con fibrosis hepática tóxica. Imágenes representativas del tejido pulmonar de ratones *Cort+/+*, *Cort+/-* y *Cort-/-* a los 42 días tras el comienzo del modelo de fibrosis hepática tóxica. A) Tinción H/E. B) Tinción Pentacrómico de Russel Movat. Barra de escala: 100µm.

El estudio histopatológico del tejido pulmonar reveló la ausencia de lesión en los ratones *Cort+/+* (**Fig. 73 A y B**) mientras que en los pulmones de los ratones deficientes en Cortistatina mostraban importante distorsión de la estructura pulmonar a causa del extenso edema que presentaban con la

presencia de un elevado componente inflamatorio mixto (presencia de células polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos) y de zonas colapsadas con inicio de fibrosis de carácter celular.

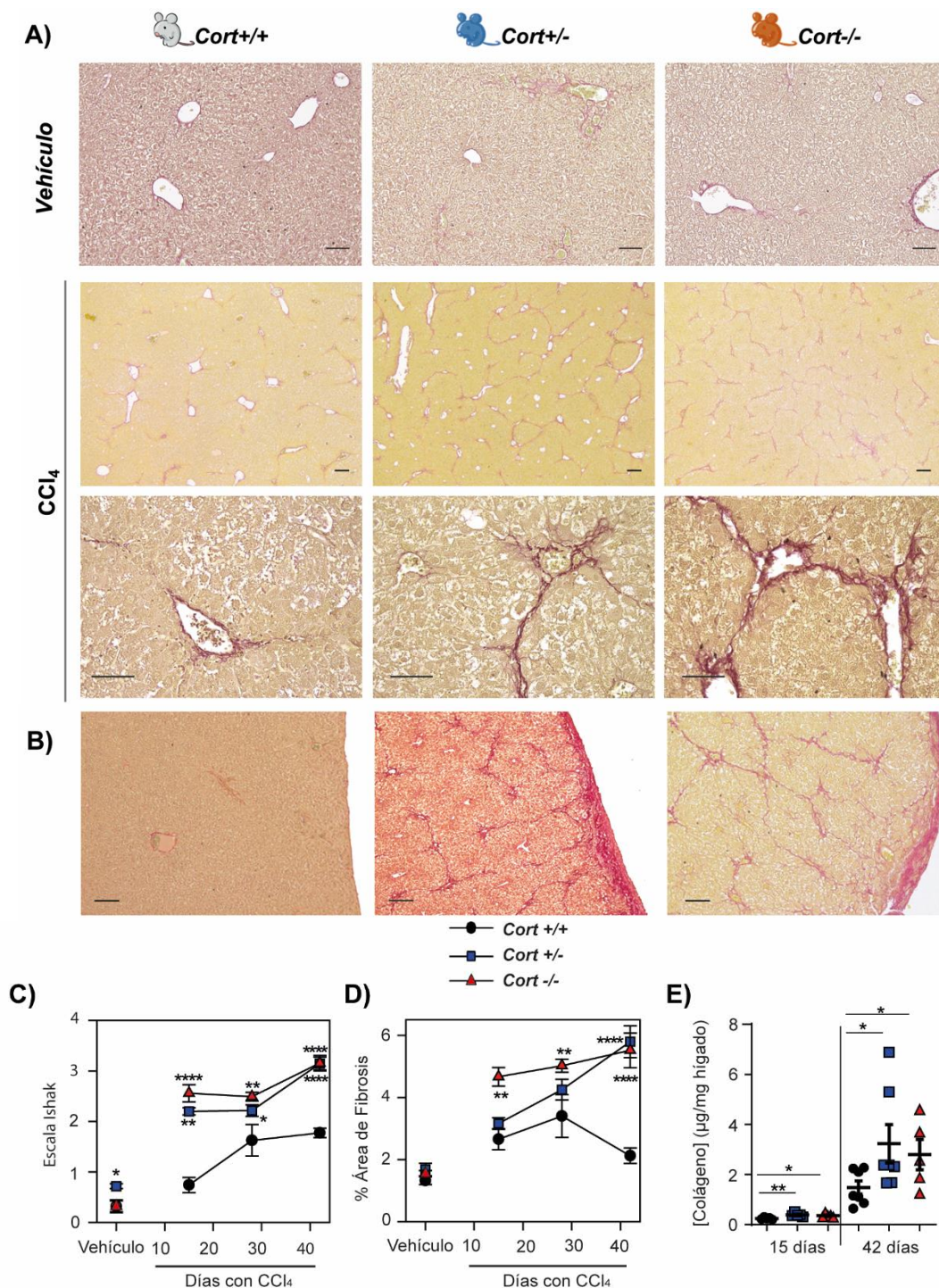


Figura 74. La deficiencia en Cortistatina exacerba la fibrosis hepática tóxica.

La fibrosis hepática tóxica fue inducida en los ratones *Cort*^{+/+}, *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} mediante administración de CCl₄ (1:9 en aceite de oliva) y los ratones de cada genotipo a los que se les administró el vehículo aceite de oliva se tomaron como control. La extensión de la fibrosis se analizó mediante la tinción Rojo Sirio. A) Imágenes representativas a día 42 (abajo imágenes con mayor detalle). Barra de escala: 100µm. B) Detalles de la tinción Rojo Sirio de la cápsula de Glisson. Imágenes representativas a día 42. Barra de escala: 100µm. C) Evaluación del grado de daño por fibrosis según la escala Ishak. (5-15 ratones/condición). D) Cuantificación del área ocupada por tejido hepático teñido de rojo en la tinción Rojo Sirio. (5-15 ratones/condición) E) Cuantificación de la generación de colágeno en el hígado mediante análisis de hidroxiprolina. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 frente a ratón *Cort*^{+/+}.

En el tejido hepático de los ratones deficientes en Cortistatina encontramos una progresión más temprana y exacerbada de la respuesta fibrogénica (**Fig. 74A-D**). La administración de CCl₄ generó en los ratones *Cort+/+* un leve engrosamiento de los vasos hepáticos, con la expansión fibrosa de algunas zonas portales y la aparición de septos fibrosos cortos (**Fig. 74A**). La deficiencia en Cortistatina hizo que los ratones a los que se les inyectó CCl₄ desarrollaran un extenso entramado fibrótico que provocó la desestructuración del parénquima hepático con la expansión fibrosa de la mayoría de las zonas portales y con uniones entre espacios porta (**Fig. 74A**). Además, los ratones deficientes en Cortistatina presentaban un claro engrosamiento de la cápsula de Glisson (**Fig. 74B**), que podría justificar las áreas fibróticas que observamos macroscópicamente (**Fig. 72**, flechas blancas). Los hígados de los ratones *Cort+/-* y *Cort-/-* presentaron desde etapas tempranas un daño por fibrosis de casi el grado 3 en la escala Ishak con un área cubierta por tejido fibrótico de aproximadamente el doble que los *Cort+/+* (**Fig. 74 A-C**), y que se correspondía con el gran aumento del contenido en colágeno (**Fig. 74D**). Curiosamente, los ratones *Cort+/-* a los que sólo se les administró el vehículo en el que se disolvía el agente tóxico presentaban una pequeña respuesta fibrogénica derivada tan solo de la propia manipulación durante la inyección del vehículo (**Fig. 74A y C**) que no se detectó en los otros genotipos. Durante el desarrollo del daño hepatotóxico causado por el CCl₄ observamos también que, debido a la deficiencia en Cortistatina, un mayor porcentaje de células efectoras de la respuesta fibrogénica se encontraban diferenciadas a miofibroblastos α SMA⁺ de forma más temprana que en ratones *Cort+/+* (**Fig. 75**). La presencia de estas células activadas se correspondía con el entramado fibrótico presente en el tejido hepático (**Fig. 74A**) y la expresión génica de los marcadores CTGF, colágeno y TGF β 1 (**Fig. 76**), que era mayor en los ratones con deficiencia en Cortistatina en comparación con los ratones *Cort+/+*.

Asimismo, encontramos una mayor celularidad alrededor de los espacios porta y en pequeños focos dispersos por el tejido hepático de ratones *Cort+/-* y *Cort-/-* en comparación con el de los ratones *Cort+/+* (**Fig. 77**). El daño generado en los hepatocitos en este modelo experimental fue diferente al observado tras la BDL (**Fig. 69**). La fibrosis hepática tóxica generó en los ratones deficientes en Cortistatina la macrovacuolización de los hepatocitos (desarrollo de una única vacuola de gran tamaño, flechas verdes) y la presencia de infiltrado crónico perivascular (**Fig. 77**).

Todos estos daños causados al tejido hepático debido al desarrollo de la respuesta fibrogénica, que fue más marcada ante la deficiencia en Cortistatina, se tradujeron en el aumento de los niveles séricos de bilirrubina, ALT y AST en los ratones deficientes en este neuropéptido (**Fig. 78**).

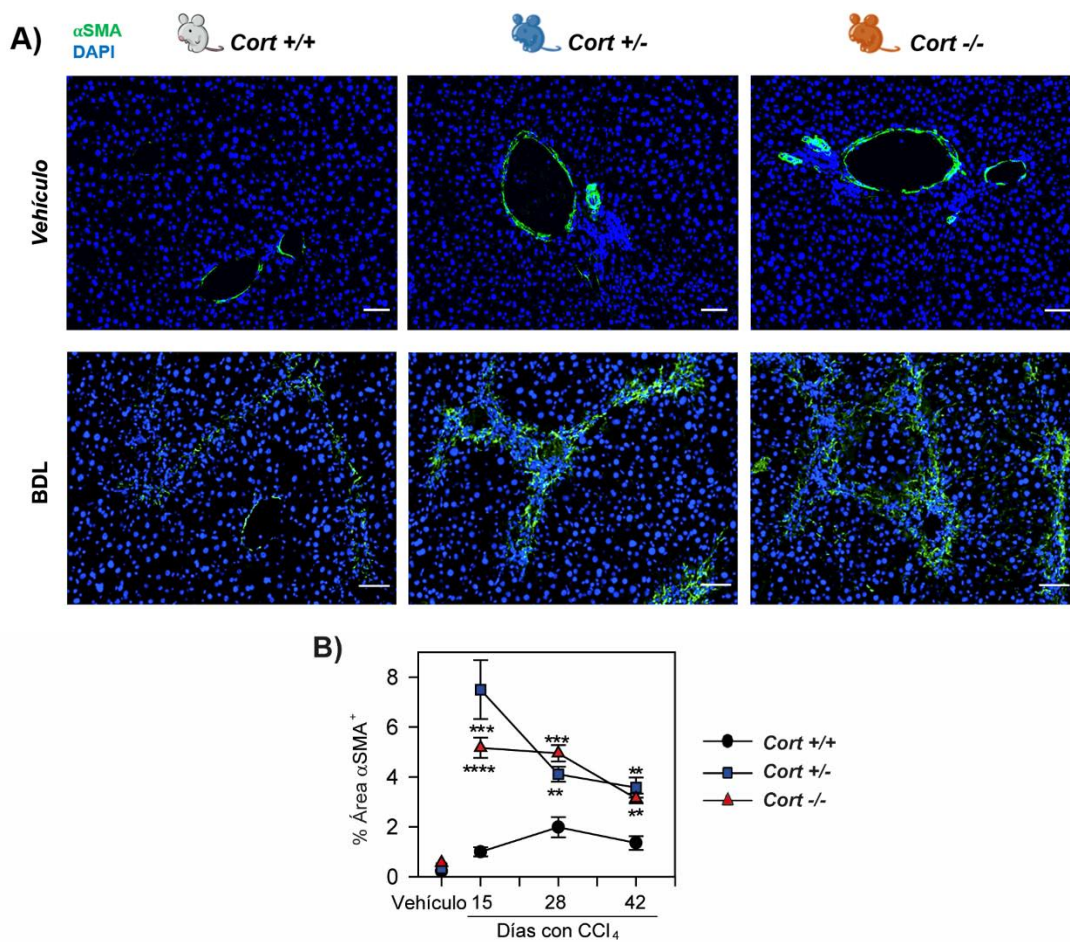
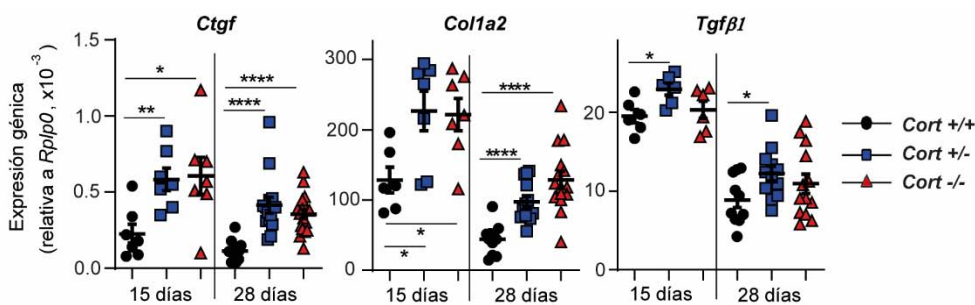


Figura 75. Efecto de la deficiencia en Cortistatina sobre la presencia de miofibroblastos α SMA⁺ en tejido hepático con fibrosis tóxica.

La fibrosis hepática tóxica fue inducida en los ratones *Cort+/+*, *Cort+/-* y *Cort-/-* mediante administración intraperitoneal de CCl₄ (1:9 en aceite de oliva) y los ratones de cada genotipo a los que se administró únicamente el vehículo aceite de oliva se tomaron como control. A) Imágenes representativas de la presencia positiva de miofibroblastos en el tejido hepático marcado en verde para α SMA y azul para DAPI mediante IFI. Imágenes representativas a 42 días tras el comienzo del modelo. Barra de escala: 100 μ m. B) Cuantificación del área ocupada por marcaje α SMA⁺ (5-15 ratones/condición). Datos = media + SEM. ***p*<0.01 ****p*<0.001 frente a ratón *Cort+/+*.



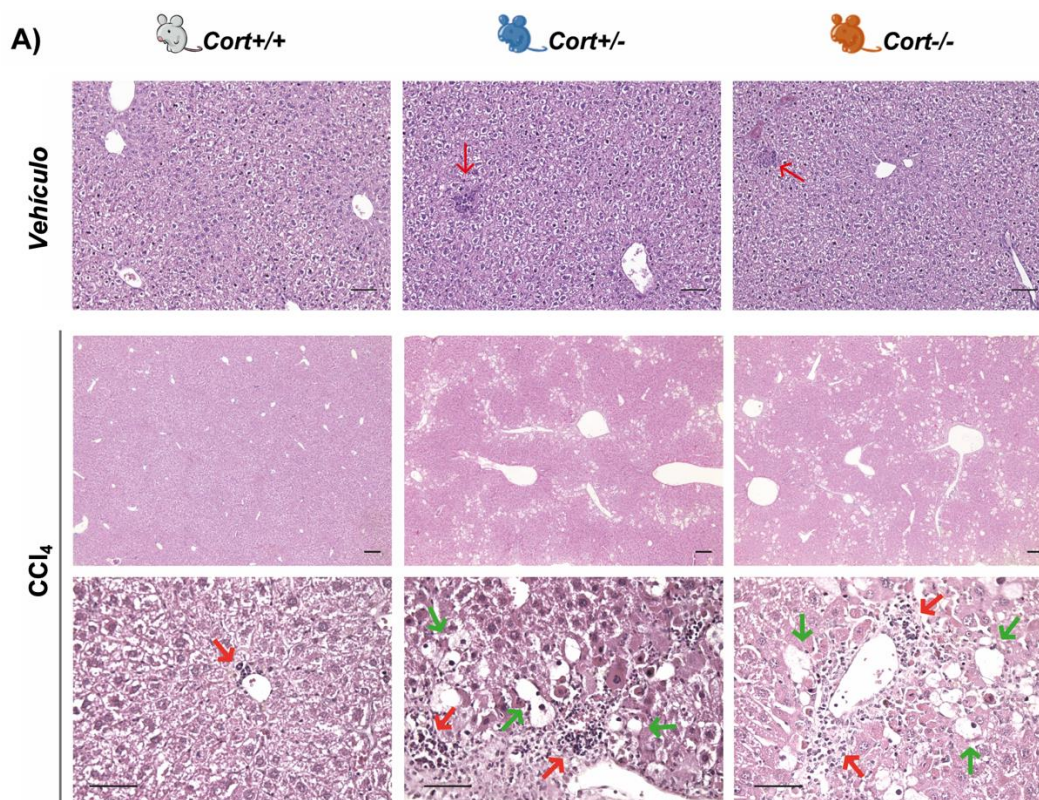


Figura 77. Tinción H/E de tejido hepático con fibrosis tóxica.

Imágenes representativas del tejido hepático de ratones *Cort+/+*, *Cort+/-* y *Cort-/-* a día 42 tras el comienzo del modelo de fibrosis hepática tóxica inducida por CCl₄ (1:9 en aceite de oliva). Flechas rojas: infiltrado celular. Flechas verdes: macrovacuolización hepatocitaria.

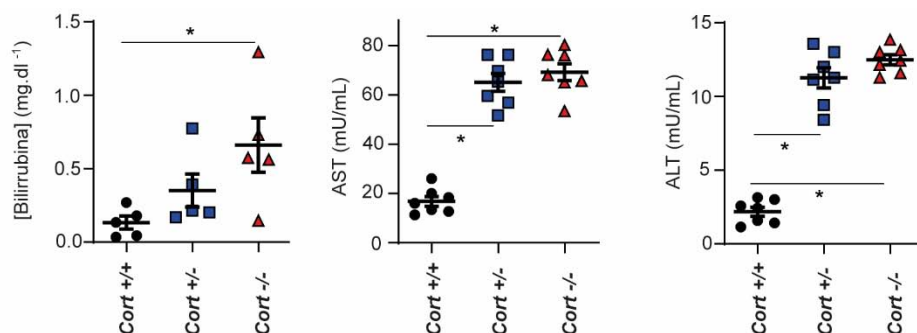


Figura 78. Los ratones deficientes en Cortistatina con fibrosis hepática tóxica presentan peor función hepática.

Análisis de los niveles de bilirrubina directa, AST y ALT realizado en muestras de sangre de ratones *Cort+/+*, *Cort+/-* y *Cort-/-* obtenidas a los 15 días tras inducir el modelo de fibrosis hepática tóxica. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. *p<0.05.

4.1.5 Estudio del efecto endógeno de Cortistatina sobre la respuesta inflamatoria en modelos de fibrosis hepática.

Debido a que un paso crítico en el inicio de la fibrosis hepática es la fuerte respuesta inflamatoria y a que Cortistatina posee efectos anti-inflamatorios, evaluamos la expresión de TNF α , una de las principales citoquinas inflamatorias, y de F4/80, marcador de KC activadas.

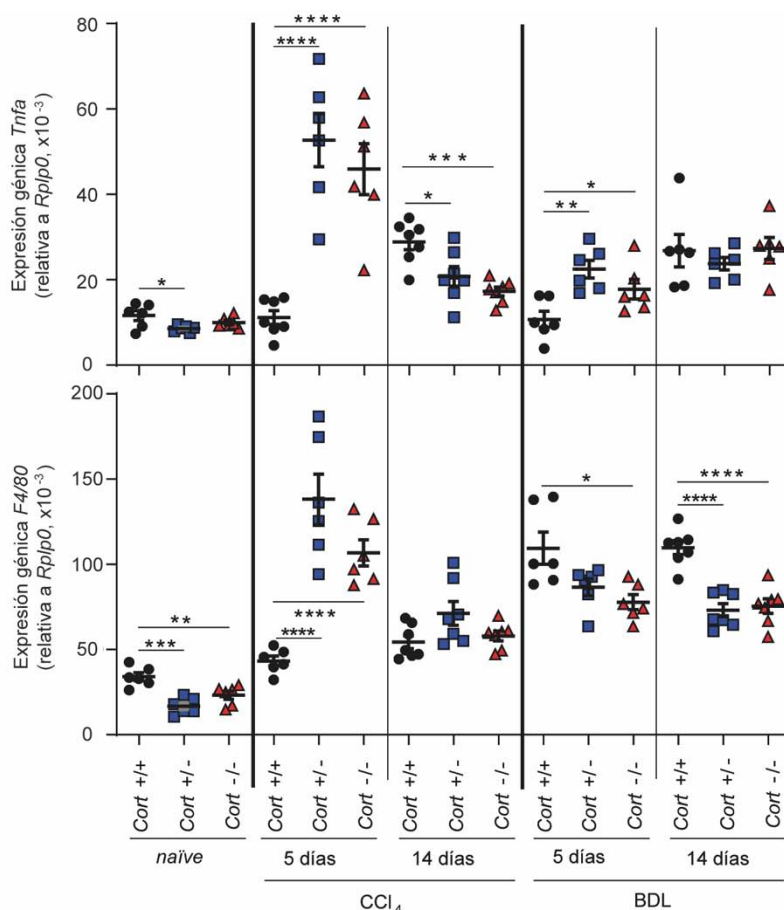


Figura 79. La deficiencia en Cortistatina genera mayor respuesta inflamatoria durante la fibrosis hepática.

El análisis de la expresión de los genes *Tnfa* y *F4/80* se realizó en muestras de tejido hepático obtenidas tanto de ratones *naíve* *Cort*^{+/+}, *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} como de ratones con fibrosis hepática tóxica inducida por CCl_4 (1:9 en aceite de oliva) y con fibrosis hepática colestática por BDL, a 5 y 14 días tras la inducción de cada uno de los modelos experimentales. La expresión génica de ambos tipos de marcadores inflamatorios fue determinada por qPCR en tiempo real y se normalizó frente a los niveles del gen interno *Rplp0*. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Como era de esperar, la inducción de fibrosis hepática tanto colestática como tóxica dio como resultado un aumento progresivo de la expresión de los genes *Tnfa* y *F4/80* en el tejido hepático de los tres genotipos (**Fig. 79**). Sorprendentemente, encontramos que los ratones *naíve* con deficiencia de cortistatina mostraron niveles hepáticos más bajos de ambos marcadores inflamatorios que los ratones *Cort*^{+/+} (**Fig. 79**). Sin embargo, los hígados de ratones *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} que fueron sometidos a exposición crónica a CCl_4 mostraron picos más tempranos y exacerbados de expresión de TNF α y F4/80 que luego fueron mitigados (**Fig. 79**). Además, mientras que los niveles de expresión génica de TNF α también aumentaron inicialmente en ratones deficientes en Cortistatina con fibrosis hepática inducida por BDL, el marcador de KC F4/80 siempre se mantuvo menos expresado en estos animales en comparación con el mostrado por ratones *Cort*^{+/+} (**Fig. 79**).

Tomados en conjunto, nuestros hallazgos durante la realización del *Objetivo 1* de esta tesis doctoral indican que el neuropéptido Cortistatina es un regulador clave de la fibrosis patológica inducida por lesión hepática crónica, actuando como un factor protector antifibrótico que podría limitar la activación/diferenciación de los miofibroblastos.

4.2 OBJETIVO 2. Estudiar el efecto directo de Cortistatina sobre las células efectoras de la respuesta fibrogénica en el hígado.

4.2.1 Estudio del efecto de Cortistatina sobre HSCs primarias de ratón.

Numerosas evidencias demuestran que la fibrosis patológica es llevada a cabo por los miofibroblastos activados, cuya principal fuente en el tejido hepático son las HSCs³². Para poder estudiar el efecto directo de Cortistatina sobre las células efectoras de la respuesta fibrogénica en el hígado, aislamos NPCs primarias de ratones *naïve Cort+/+* y *Cort-/-*. Obtuvimos un cultivo enriquecido en HSCs que con el contacto con el plástico se activaban perdiendo sus características gotas lipídicas y adquirirían una morfología más ramificada (**Fig. 80A**). Para comprobar la pureza de nuestro cultivo, analizamos la posible presencia de otras poblaciones celulares mediante inmunofluorescencia y detectamos una participación marginal de NPCs CD31⁺ (LSECs) y CD68⁺ (KCs) (**Fig. 80B**).

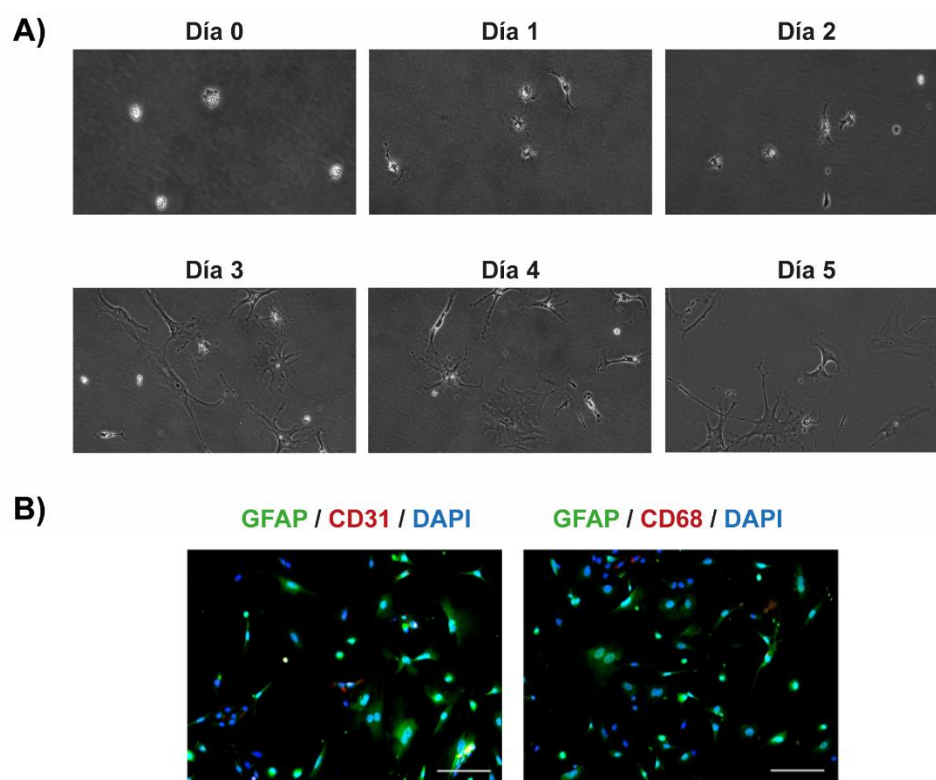


Figura 80. Caracterización de las poblaciones celulares en los cultivos de NPCs primarias de ratón.

A) Imágenes de microscopía con contraste de fase de NPCs *Cort+/+* durante los 5 primeros días tras su aislamiento. Se observa el fenotipo HSC, con gotas lipídicas de Vitamina A que se fueron perdiendo progresivamente al activarse las HSCs por el contacto con el plástico de los frascos de cultivo. La mayoría de las NPCs mostraron este fenotipo HSC a lo largo del cultivo. B) Imágenes representativas del análisis de NPCs *Cort+/+* por IFI con marcaje verde para GFAP, rojo para CD31 y azul para DAPI (izquierda) y con marcaje verde para GFAP, rojo para CD68 y azul para DAPI (derecha) tras 7 días de cultivo primario (sobre plástico) y 1 día de cultivo secundario (sobre cristal).

Para comparar las HSCs presentes en los cultivos de NPCs aisladas de los ratones de ambos genotipos, evaluamos su estado de diferenciación a miofibroblastos α SMA⁺ siguiendo el esquema de trabajo presentado en la **Figura 48**.

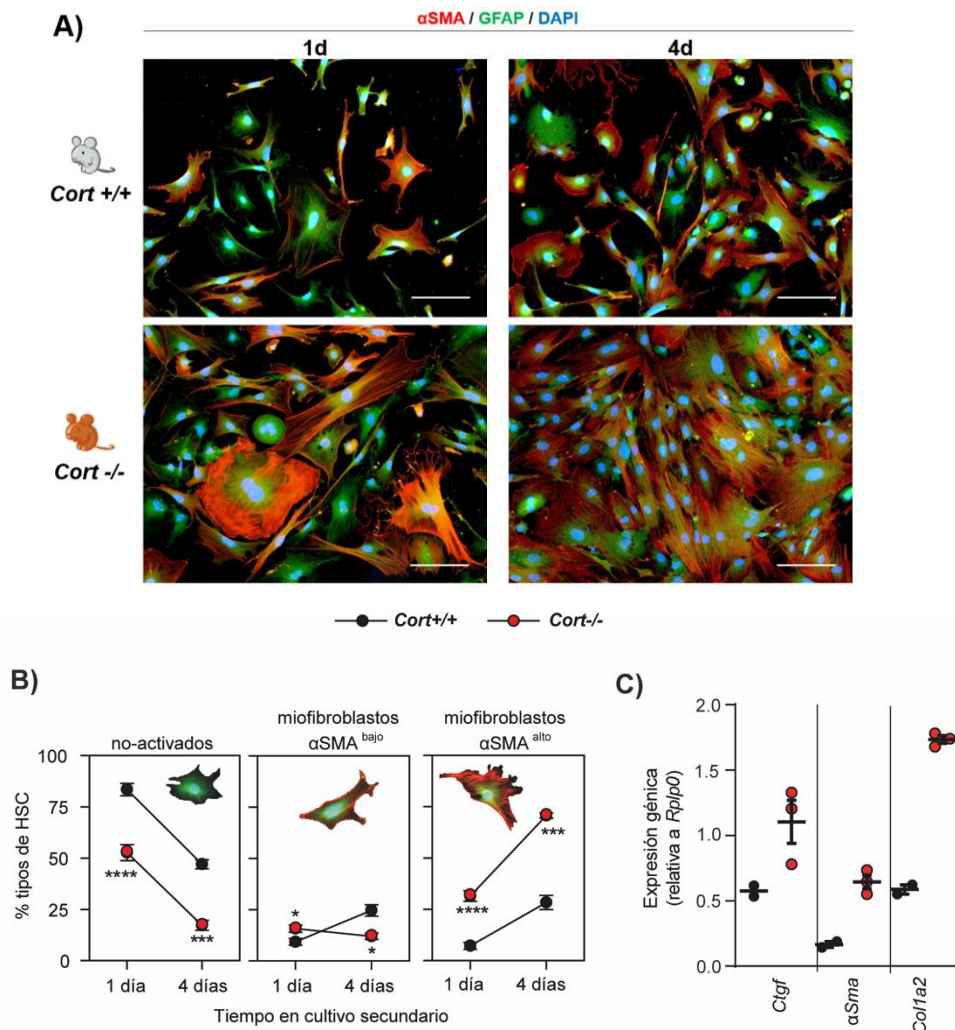


Figura 81. Las NPCs *Cort*^{-/-} muestran un aumento de la diferenciación a miofibroblastos y una respuesta fibrogénica más exacerbada.

Tras su aislamiento, las NPCs *Cort*^{+/+} y *Cort*^{-/-} se mantuvieron durante 6 días en un cultivo primario en frascos de cultivo de plástico y 1 o 4 días sobre cristal en un cultivo secundario. A) Imágenes representativas de HSCs por IFI con marcaje verde para GFAP, rojo para αSMA y azul para DAPI tras 1 o 4 días de cultivo secundario. B) Cuantificación del % de HSCs no activadas, miofibroblastos αSMA^{bajo} y miofibroblastos αSMA^{alto}. (n= 18 para 1 día de cultivo secundario, n=5 para 4 días de cultivo secundario). C) Expresión de marcadores fibrogénicos en NPCs primarias de ratón tras el cultivo primario. *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001 frente a NPCs *Cort*^{+/+}.

Después de una semana en cultivo, la mayoría de las NPCs *Cort*^{+/+} (>80%) mostraron un fenotipo de HSC quiescente/no activado (GFAP⁺/αSMA⁻), y tan solo el 10% de ellas correspondieron a miofibroblastos activados que expresan αSMA fibras de estrés (Fig. 81A y B). Sin embargo, los cultivos de NPCs deficientes en Cortistatina mostraron desde el inicio un significativo porcentaje (>30%) de miofibroblastos αSMA^{alto} activados que progresaron rápidamente a más del 70% del total de células al final del cultivo, un porcentaje que fue mucho más alto que el observado (<30%) en los cultivos de NPCs *Cort*^{+/+} (Fig. 81A y B). Además, los cultivos de NPCs *Cort*^{-/-} mostraron un número de células 1.8 veces mayor que los cultivos de NPCs *Cort*^{+/+}. El exacerbado fenotipo fibrogénico/miofibroblástico observado en las NPCs *Cort*^{-/-} se correlacionó con una expresión aumentada inicial de marcadores/mediadores profibróticos en comparación con las NPCs *Cort*^{+/+}.

(Fig. 81C), lo que sugiere que las NPCs deficientes en cortistatina estaban más comprometidas que las NPCs *Cort+/+* a diferenciarse en miofibroblastos activados.

Para estudiar más en detalle el perfil genético de las NPCs aisladas, analizamos su expresión transcriptómica mediante la técnica RNAseq de nueva generación. Comparando el perfil obtenido observamos 2289 genes que estaban diferencialmente expresados de forma significativa (FDR con valor $p < 0.05$) en las NPCs de ratones *Cort-/-*, de entre los cuales 1284 estaban regulados al alza, de forma positiva, y 1005 estaban regulados a la baja, de forma negativa, con respecto a las NPCs de ratones *Cort+/+* (Fig. 82A, Anexo 1).

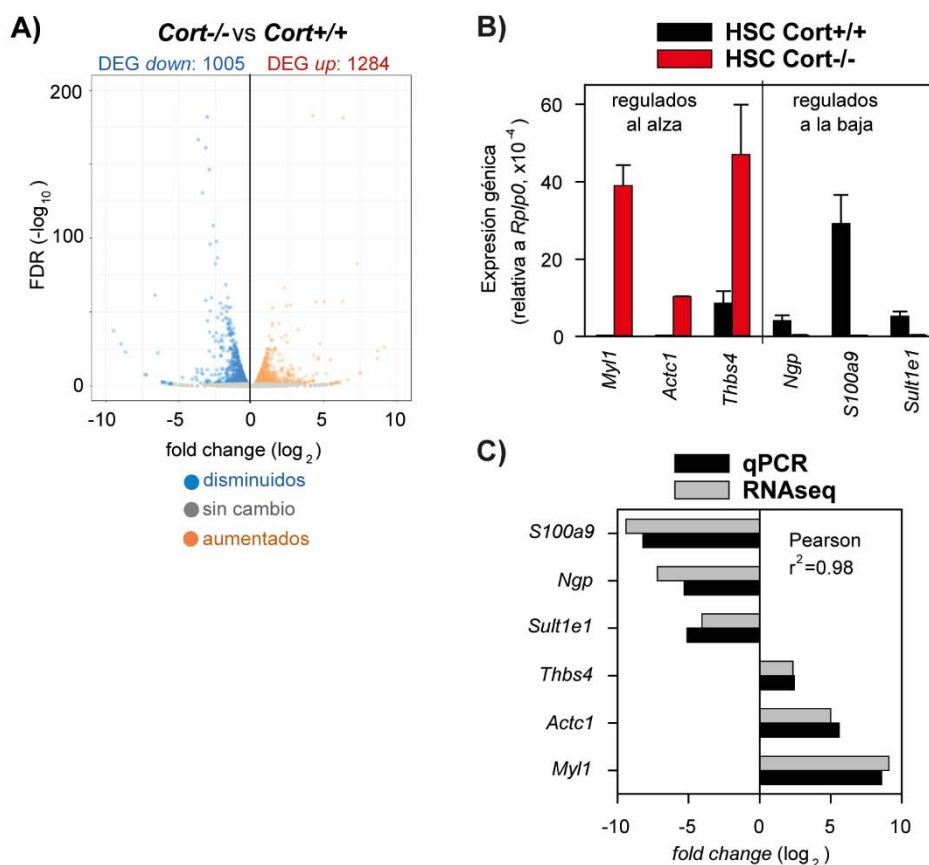


Figura 82. Perfil de expresión genética analizado mediante RNAseq y su validación por qPCR.

Las NPCs fueron aisladas de ratones *Cort+/+* y *Cort-/-* como se describe en el apartado 3.2.1 de esta tesis doctoral. Tras un cultivo primario de 6 días se realizó su análisis comparativo por RNAseq. A) Volcano plot con genes expresados diferencialmente (DEGs) con un valor p de *false discovery rate* (FDR) < 0.05 entre NPCs *Cort+/+* y *Cort-/-*. Descripción de todos los DEGs obtenidos en el Anexo 1 de esta tesis. B) Expresión génica de *Myh1*, *Actc1*, *Thbs4*, *Ngp*, *s100A9*, *Sult1e1* cuantificada por qPCR en tiempo real y normalizada frente a los niveles del gen interno *Rplp0*. C) Validación de los resultados mediante comparación de los niveles de expresión medidos por RNAseq y por qPCR. Datos = media de 2 cultivos independientes de NPCs (6 ratones/cultivo).

De entre los genes expresados diferencialmente, seleccionamos 3 regulados al alza (*Myh1*, *Actc1*, *Thbs4*) y 3 regulados a la baja (*Ngp*, *S100a9*, *Sult1e1*) para analizar su expresión también vía qPCR a tiempo real (Fig. 82B). De esta forma validamos los resultados del RNAseq al obtener un alto grado de correlación entre ambos tipos de análisis, con un coeficiente de Pearson de 0.98 (Fig. 82C).

Con los 640 genes con mayor cambio de expresión estadísticamente significativo ($FDR < 0.05$ y $|\log_2 FC| > 1$) realizamos un agrupamiento jerárquico no supervisado para poder clasificar los genes según su nivel de expresión y obtuvimos una separación de las muestras (2 por genotipo) en 2 grupos principales con mínima superposición entre ellos como se puede apreciar en el dendrograma (Fig. 83A). Curiosamente, observamos que dentro del top-25 de los DEGs regulados al alza 22 estaban específicamente relacionados con la diferenciación, generación, función de células musculares o eran marcadores de éstas (Fig. 83B, Anexo 2 - Tabla 1). De hecho, encontramos que la expresión de 53 genes relacionados con músculo estaba aumentada al menos 4 veces en las células deficientes en Cortistatina (Fig. 83C, Anexo 2 - Tabla 1).

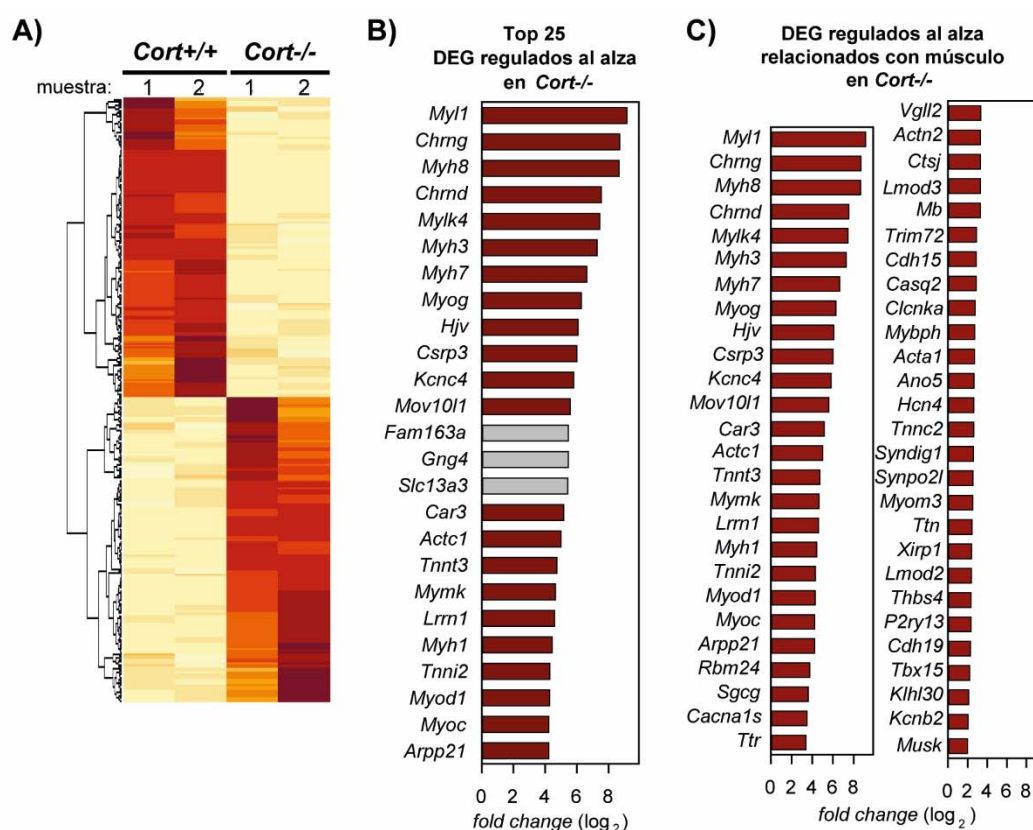


Figura 83. Análisis de la expresión de genes con mayor cambio de expresión estadísticamente significativo.

Las NPCs fueron aisladas de ratones *Cort+/+* y *Cort-/* como se describe en el apartado 3.2.1 de esta tesis doctoral. Tras un cultivo primario de 6 días se realizó su análisis comparativo por RNAseq. A) Dendrograma comparativo entre 2 muestras *Cort+/+* y 2 muestras *Cort-/* tras agrupamiento jerárquico no supervisado del top 640 de los DEGs con \log_2 fold change > 1 o < -1 . Descripción de todos los DEGs obtenidos en el Anexo 1 de esta tesis. B) Top 25 de los DEGs regulados al alza en las NPCs *Cort-/*. Barras rojas: genes relacionados con músculo. Descripción de los DEGs en la Tabla 1 del Anexo 2 de esta tesis. C) Genes relacionados con músculo en el top 110 de los DEGs regulados al alza en NPCs *Cort-/*. Descripción de los DEGs en la Tabla 1 del Anexo 2 de esta tesis. Datos = media de 2 cultivos independientes de NPCs (6 ratones/cultivo).

A través del análisis de ontología genética (GO) descubrimos que los DEGs (mayormente regulados al alza) estaban asociados principalmente con componentes relacionados con la función muscular, la activación/diferenciación de miofibroblastos y la generación de matriz extracelular (Fig. 84, Anexo 2 - Tabla 2). Realizando un análisis más detallado observamos también que un número

significativo de DEGs regulados a la baja en las células *Cort*^{-/-} estaban relacionados con la respuesta defensiva a infecciones virales y con la respuesta a IFN (Fig. 84B y Anexo 2 – Tabla 3).

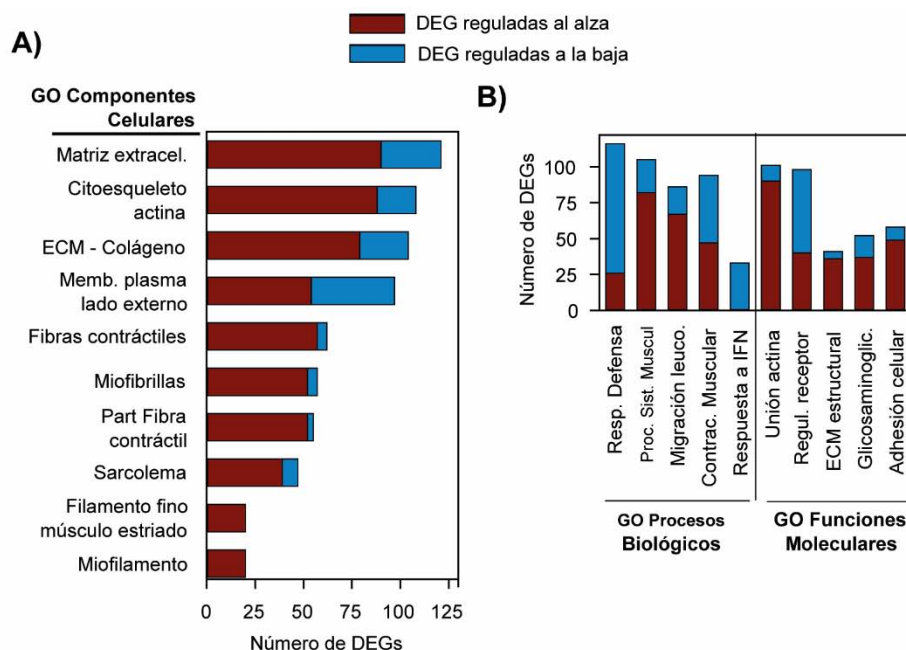


Figura 84. Análisis de ontología genética de los DEGs en las NPCs *Cort*^{-/-}.

A) Top 10 de los términos de ontología genética (GO) asociados a componentes celulares en el estudio transcriptómico por RNAseq de NPCs aisladas de ratones *Cort*^{-/-}. El listado de DEGs regulados al alza o a la baja englobados en el GO de componentes celulares se encuentra en la Tabla 2 del Anexo 2. B) Top 5 de los términos GO asociados a procesos biológicos (izquierda) y a funciones moleculares (derecha) en el estudio transcriptómico por RNAseq de NPCs aisladas de ratones *Cort*^{-/-}. El listado de DEGs regulados al alza o a la baja englobados en el GO de procesos biológicos se encuentra en la Tabla 3 del Anexo 2, y en el GO de funciones moleculares en la Tabla 4 del Anexo 2. Barras rojas: regulados al alza en NPCs *Cort*^{-/-}. Barras azules: regulados a la baja en NPCs *Cort*^{-/-}. Datos = media de 2 cultivos independientes de NPCs (6 ratones/cultivo).

El estudio transcriptómico de ambas poblaciones celulares reveló una mayor presencia de células efectoras de la respuesta fibrogénica activadas en las NPCs aisladas de ratones *Cort*^{-/-} (Fig. 85). Observamos que las células deficientes en Cortistatina presentaba tanto una expresión regulada al alza de marcadores de HSCs activadas (*Cilp*, *Dpt*, *Acta2*, *Lox*, *Acta1*) como una expresión regulada a la baja de marcadores de HSCs en estado quiescente (*S100a8*, *s100a9*, *Hhip*) (Fig. 85A) lo que corroboraba la diferencia en el grado de activación observado mediante el marcaje celular (Fig. 81) entre las HSCs *Cort*^{-/-} y las *Cort*^{+/+}. Además, estas células no sólo presentaban un mayor estado de activación ante la deficiencia de expresión de Cortistatina, sino que además su capacidad para ser eliminadas del microambiente celular una vez ejercida su función se encontraba afectada, como indica la menor expresión de *Xaf1* (factor pro-apoptótico) o la expresión al alza de los inhibidores de senescencia *Igfbp6*, *Igfb5*, *Igfbp2*, *Igf2* e *Igf1*, con respecto a la población *Cort*^{+/+} (Fig. 85B).

A pesar de haber observado tan solo una presencia marginal de otras poblaciones celulares en nuestros cultivos de NPCs, el análisis de RNAseq reveló una mayor expresión de genes asociados a PFs y KCs. Es interesante el haber detectado una regulación al alza de *Muc16*, *Fbln2*, *Thy1*, *Msln*, *Eln*, genes marcadores de PFs activados, ya que, al ser estas células también fuente de

miofibroblastos en el tejido hepático, podría representar un microambiente celular más comprometido con el desarrollo de la respuesta fibrogénica en los ratones deficientes en Cortistatina.

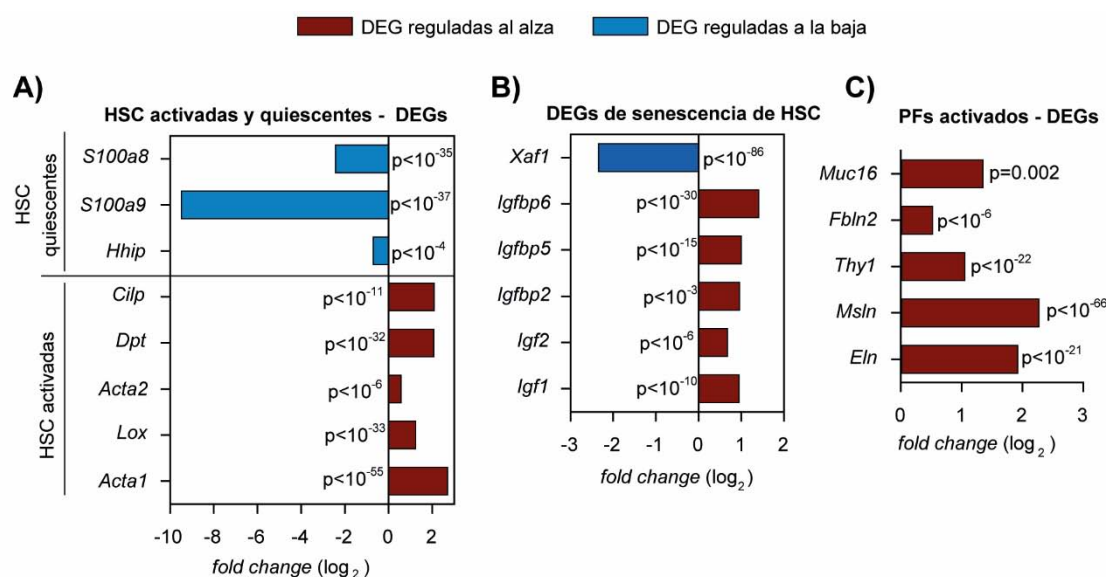


Figura 85. Análisis de la expresión de genes asociados a células efectoras fibrogénicas mediante RNAseq.

Análisis transcriptómico de NPCs primarias de ratones *Cort*^{+/+} y *Cort*^{-/-} tras un cultivo primario de 6 días en contacto con plástico. A) DEGs asociados a HSCs quiescentes (*S100a8*, *S100 calcium binding protein A8 or calgranulin A*; *S100a9*, *S100 calcium binding protein A9 or calgranulin B*; *Hhip*, *hedgehog-interacting protein*) arriba, HSCs activadas (*Acta1*, *α1-skeletal muscle actin*; *Acta2*, *α2-smooth muscle actin*; *Dpt*, *dermatopontin*; *Lox*, *lysyl oxidase*; *Cilp*, *cartilage intermediate layer protein*) abajo. B) DEGs asociados a la ruta de senescencia de HSCs (*Igf1/2*, *insulin growth factors 1/2*; *Igfbp2/5/6*, *IGF-binding proteins 2/5/6*) y a apoptosis (*Xaf1*, *XIAP-associated factor 1*). C) DEGs asociados a PFs activados (*Eln*, *elastin*; *Msln*, *mesothelin*; *Thy1*, *thymus antigen 1*; *Fbln2*, *fibulin 2*; *Muc16*, *mucin-16*). Para cada gen se muestran los valores de *fold change* y FDR. Datos = media de 2 cultivos independientes de NPCs (6 ratones/cultivo).

De igual forma, el análisis del RNAseq reveló la expresión regulada al alza de marcadores de KCs (*Cd51*, *Timd4*, *Clec4f*, *Cd163*, *Marco*, *F4/80*, *Cd68*) en la población *Cort*^{-/-} (Fig. 86A, Anexo 1), lo que podría indicar una mayor presencia de este tipo celular en el tejido hepático de los ratones deficientes en Cortistatina. Sin embargo, esto no parecía correlacionarse con una mayor participación de carácter pro-inflamatorio ya que no encontramos grandes diferencias en cuanto a la expresión de los principales marcadores pro-inflamatorios, pero sí una regulación a la baja de numerosas quimioquinas (Fig. 86B).

Por tanto, los resultados obtenidos indican que el efecto modulador del neuropéptido Cortistatina endógeno sobre las principales poblaciones implicadas en el desarrollo de la respuesta fibrogénica, y, teniendo esto en mente, nos preguntamos si la administración exógena de este neuropéptido a las células aisladas de ratones *Cort*^{-/-} podría conseguir la reversión del fenotipo tan activado que presentaban.

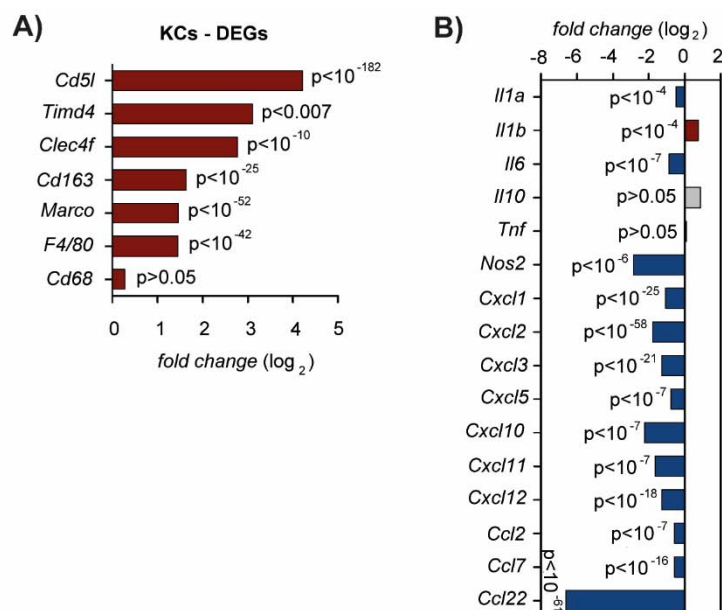


Figura 86. Análisis de DEGs relacionados con KCs, marcadores pro-inflamatorios y quimioquinas.

Análisis transcriptómico de NPCs primarias de ratones *Cort+/+* y *Cort-/-* tras cultivo primario en contacto con plástico durante 6 días. A) DEGs asociados a KCs (*F4/80* or *Adgre1*, *adhesion G protein-coupled receptor E1*; *Timd4*, *T cell immunoglobulin and mucin domain containing 4*; *Marco*, *macrophage receptor with collagenous structure*; *Clec4f*, *C-type lectin domain family 4, member f*). B) DEGs asociadas a mediadores pro-inflamatorios (*Tnf*, *tumor necrosis factor α* ; *Il1a*, *interleukin-1 α* ; *Nos2*, *nitric oxide synthase 2* o *inducible nitric oxide*; quimioquinas *Ccl* y *Cxcl*). Para cada gen se muestran los valores de *fold change* y FDR. Datos = media de 2 cultivos independientes de NPCs (6 ratones/cultivo).

Encontramos que el tratamiento con Cortistatina exógena durante el cultivo de las NPCs *Cort-/-* ejerció un efecto directo sobre su capacidad de activación y consiguió reducir la presencia de miofibroblastos $\alpha\text{SMA}^{\text{alto}}$ que sí se observaba en el cultivo que no había sido tratado (Fig. 87A y B). Además, esta menor activación celular se veía reflejada en una menor expresión de los principales DEGs asociados a músculo *Myh11*, *Actc1* y *Chrn3* que habíamos detectado regulados al alza en las NPCs deficientes en Cortistatina (Fig. 87C) durante el estudio transcriptómico, y de marcadores asociados a respuesta fibrogénica como CTGF, αSMA y colágeno (Fig. 87D).

Interesantemente, el bloqueo de los receptores SSTR o GHSR1 no solo evitó el efecto inhibitor del tratamiento con Cortistatina, sino que también incrementó la expresión de $\alpha\text{SMA}^{\text{alto}}$ en las NPCs por encima de lo observado en las NPCs sin tratar (Fig. 88), lo que sugiere la capacidad del neuropéptido Cortistatina endógeno para limitar la activación de las NPCs y su diferenciación a miofibroblastos de forma tanto paracrina como autocrina.

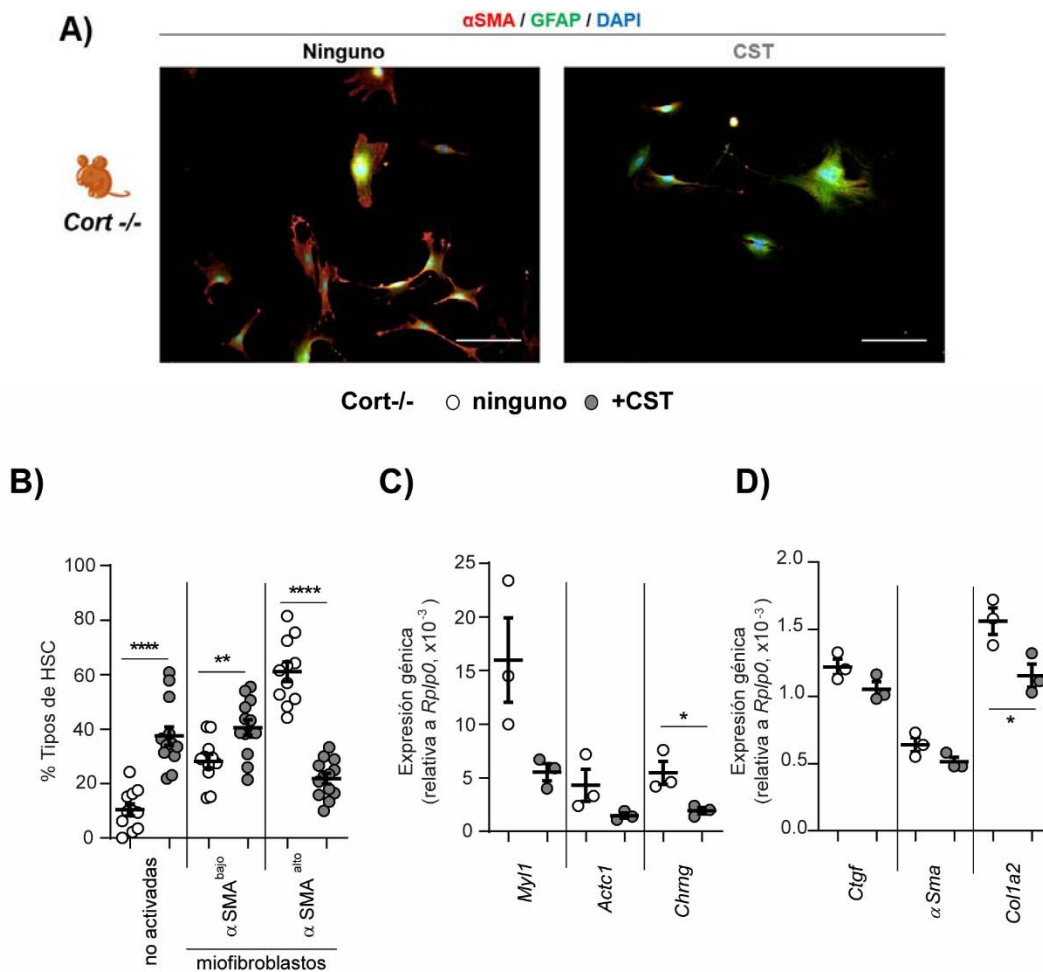


Figura 87. Cortistatina inhibe la activación de las HSCs primarias de ratón *in vitro*.

Estudio del efecto del tratamiento con Cortistatina- 29 (CST-29) cada 2 días sobre la capacidad de activación y diferenciación de las HSCs *Cort*^{-/-} en miofibroblastos α SMA⁺ tras 6 días de cultivo en contacto con plástico. A) Imágenes representativas de IFI con marcaje verde para GFAP, rojo para α SMA y azul para DAPI de células tratadas (drcha.) y no tratadas (izq.) con CST-29. B) Cuantificación del % de HSCs no activadas, miofibroblastos α SMA^{bajo} y miofibroblastos α SMA^{alto} presentes en el cultivo de NPCs *Cort*^{-/-} tratado y sin tratar con CST-29. C) Expresión génica de *Myl1*, *Actc1* y *Chrng* en cultivos tratados y no tratados con CST-29. D) Expresión génica de *Ctgf*, α Sma y *Colla2* en cultivos tratados y no tratados con CST-29. La expresión génica en cada caso fue cuantificada por qPCR en tiempo real y normalizada frente a los niveles del gen interno *Rplp0*. Blanco: Cultivo sin tratamiento. Gris: Cultivo tratado con CST-29. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de cultivos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

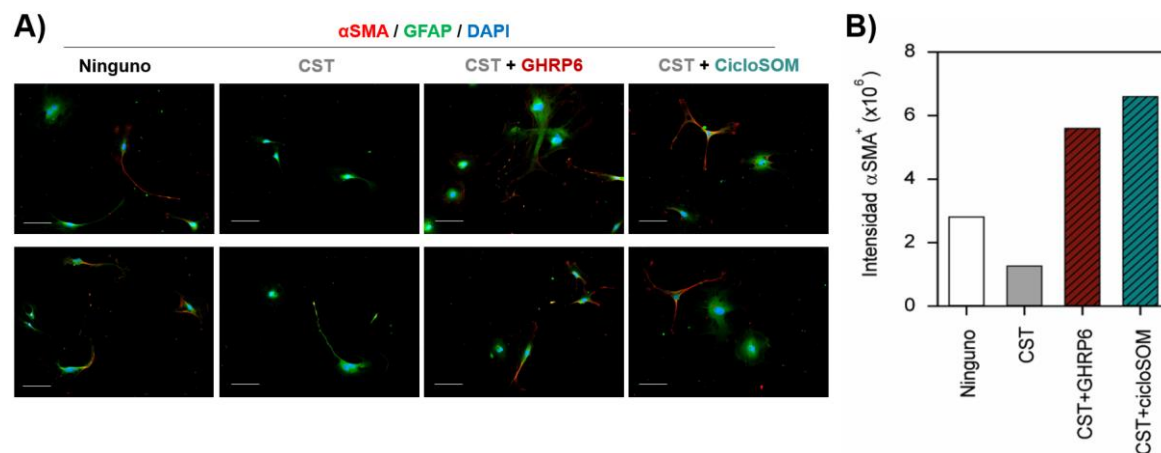


Figura 88. Los antagonistas de los receptores SSTR y GHSR1 bloquean el efecto de Cortistatina sobre las HSCs primarias de ratón.

Análisis del efecto de la administración de los antagonistas de los receptores SSTR (CicloSOM) y GHSR1 (GHRP6) cada 2 días sobre las NPCs *Cort+/+* tratadas con CST-29. A) Imágenes representativas de IFI con marcaje verde para GFAP, rojo para α SMA y azul para DAPI tras 6 días de cultivo primario (sobre plástico) y 1 día de cultivo secundario (sobre cristal). Barra de escala: 100 μ m. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de α SMA atendiendo a cada condición.

4.2.2 Estudio del efecto terapéutico de Cortistatina sobre líneas celulares de HSCs humanas.

Para comprobar si el efecto de Cortistatina observado sobre las HSCs primarias de ratón podría trasladarse a las HSCs humanas, decidimos estudiar la capacidad de activación de la línea celular LX2 en presencia de Cortistatina. Para ello, primero analizamos la diferenciación de las LX2 a miofibroblastos α SMA⁺ y la expresión tanto proteica como génica de marcadores pro-fibrogénicos.

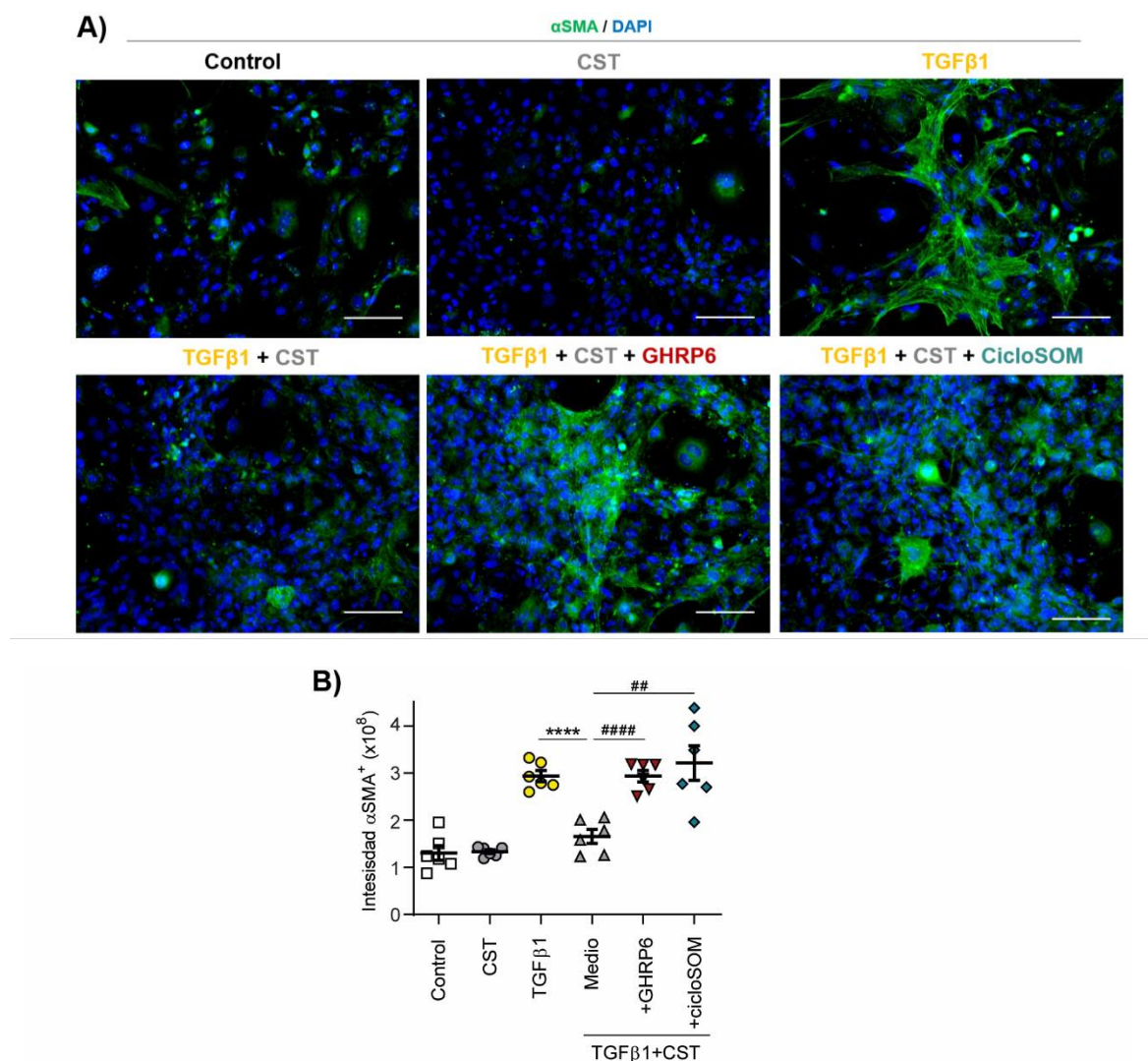


Figura 89. Cortistatina inhibe la diferenciación de las LX2 activadas con TGF β 1 a través de los receptores SSTR y GHSR1.

Análisis del efecto de la administración de los antagonistas de los receptores SSTR (CicloSOM) y GHSR1 (GHRP6) cada 2 días sobre LX2 estimuladas con TGF β 1 y tratadas con CST-17. A) Imágenes representativas de IFI con marcaje verde para α SMA y azul para DAPI tras 7 días. Control: medio sin TGF β 1 ni CST-17. Barra de escala: 100 μ m. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de α SMA atendiendo a cada condición. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de cultivos. **** $p < 0.0001$ frente a LX2 + TGF β 1, ## $p < 0.01$ y #### $p < 0.0001$ frente a LX2 + TGF β 1 + CST.

La estimulación de las LX2 con TGF β 1 provocó su activación y diferenciación en miofibroblastos α SMA⁺ (**Fig. 89A y B**). Mientras que el tratamiento con Cortistatina consiguió evitar este proceso, el uso de los antagonistas GHRP6 y CicloSOM bloqueó los receptores de Cortistatina impidiendo su unión a éstos, lo que favoreció de nuevo la activación y diferenciación de las LX2 (**Fig. 89A y B**). Esta menor activación de las células tratadas con Cortistatina se vio reflejada también en una menor expresión proteica tanto de α SMA como de CTGF (**Fig. 90**) y en la disminución de la expresión génica del propio TGF β 1 (**Fig. 90**), rompiéndose así el ciclo de retroalimentación que genera este factor al activar a las células efectoras de la respuesta fibrogénica.

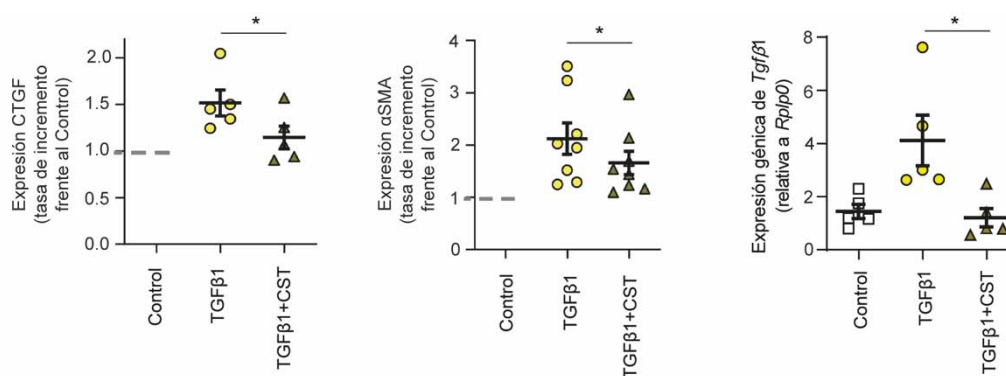


Figura 90. Cortistatina evita la expresión de factores pro-fibróticos en las LX2 estimuladas con TGF β 1.

Estudio de la expresión proteica de los factores fibróticos CTGF (a 24h), α SMA (a 7 días) cuantificada por Western Blot y normalizada frente α Tubulina expresada como tasa de incremento frente a Control (cultivo sin estimular), y de la expresión génica de TGF β 1 (a 24h) cuantificada mediante qPCR en tiempo real y normalizada frente a los niveles del gen interno *Rplp0* en cultivos de LX2 estimuladas con TGF β 1 y tratadas o no con CST-17 cada 2 días. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de cultivos. * $p < 0.05$.

Asimismo, evaluamos el efecto del tratamiento con Cortistatina sobre una de las principales características de las células fibrogénicas activadas, su capacidad contráctil. Observamos que mientras la línea celular de HSCs humanas, HHStcC, estimulada con TGF β 1 desarrollaba un elevado poder de contracción, el tratamiento con Cortistatina conseguía reducirlo (**Fig. 91 y 92**). Estos efectos de TGF β 1 y Cortistatina se produjeron tanto en células individuales (**Fig. 91A y B**) como en la población conjunta de HHStcC donde la interconexión entre las propias células incrementa aún más su capacidad de contracción al producirse un efecto sumatorio de sus fuerzas (**Fig. 92A y B**).

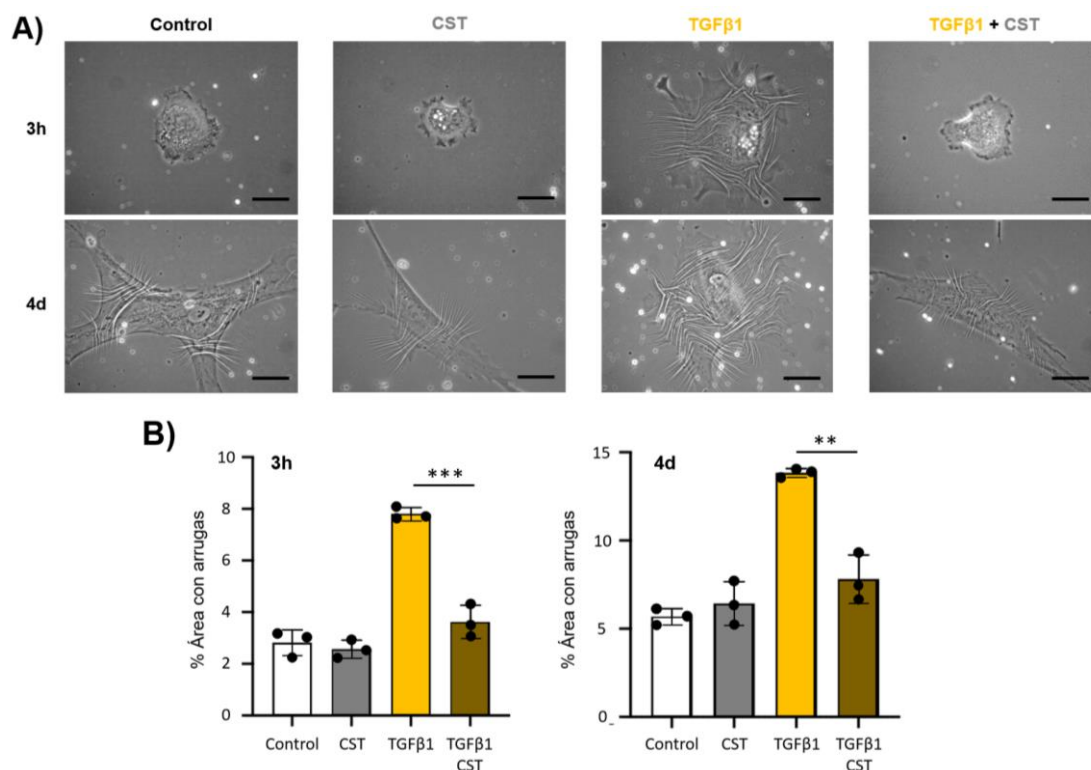


Figura 91. Cortistatina reduce la capacidad contráctil de cada HSC estimulada con TGFβ1.

Estudio de la capacidad contráctil de las HHSteCs estimuladas con TGFβ1 durante 3h o 4 días y tratadas con CST-17 cada 2 días durante este periodo mediante el ensayo de generación de arrugas. A) Imágenes representativas de las arrugas generadas en el sustrato polimérico a los tiempos indicados. Barra de escala: 50μm B) Cuantificación del área cubierta por las arrugas generadas tras 3h (izquierda) o 4 días (derecha) de estimulación con TGFβ1. Control: células cultivadas en medio sin estimular ni tratar. Datos: media + SEM. 3 cultivos independientes. **p<0.01, ***p<0.001.

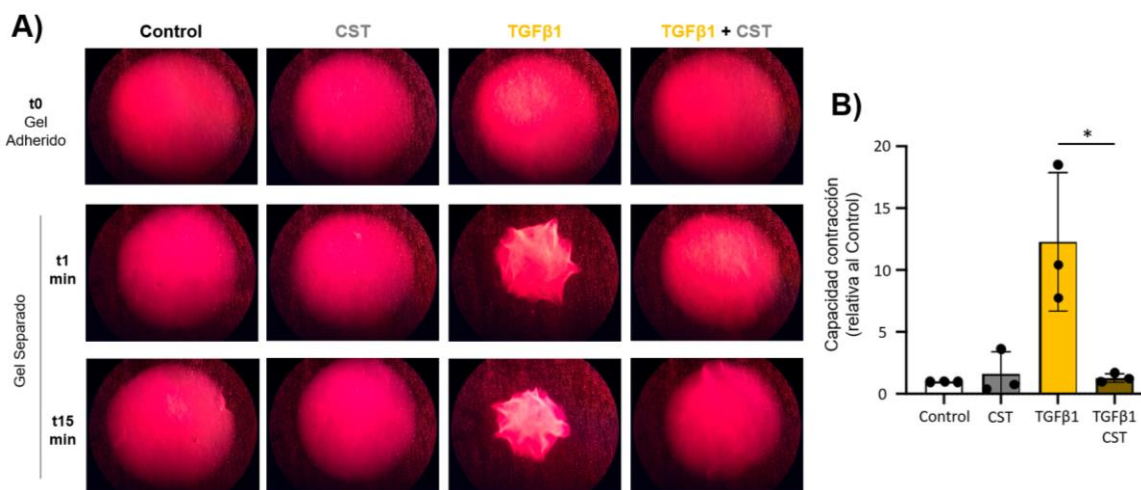


Figura 92. Cortistatin disminuye la capacidad contráctil sumatoria de la población HHSteCs.

Estudio de la capacidad contráctil de las HHSteCs cultivadas en el interior de un gel de colágeno, estimuladas con TGFβ1 durante 4 días y tratadas con CST-17 cada 2 días durante este periodo. A) Imágenes representativas del estado de contracción de los gels de colágeno según cada condición. t0: Imagen de gel adherido a la placa. t1 y t15: Imágenes del gel a 1 y 15min respectivamente tras separar el gel de la placa. B) Cuantificación de la capacidad de contracción relativa al Control a 15min tras desacoplar el gel de la placa. Control: células cultivadas en medio sin estimular ni tratar. Datos: media + SEM. 3 cultivos independientes. *p<0.05.

4.2.3 Estudio del efecto terapéutico de Cortistatina sobre fibroblastos primarios humanos.

La realización de la estancia internacional en el *Laboratory of Tissue Repair and Regeneration* dirigido por el doctor Boris Hinz me brindó la oportunidad de estudiar el efecto de Cortistatina sobre fibroblastos primarios humanos de pulmón y de piel (NHLF y NHDF respectivamente). Aunque estas células no son HSCs, ambas poblaciones son células efectoras de la respuesta fibrogénica y comparten la capacidad de diferenciarse en miofibroblastos activados de tal forma que los resultados obtenidos con ellas podrían ser trasladables.

Primero confirmamos la expresión génica de Cortistatina tanto en NHLF como en NHDF (**Fig. 93**). De forma similar a lo observado tanto en las muestras de pacientes con patologías hepáticas fibróticas (**Fig. 33**), como durante la inducción de la respuesta fibrogénica en los modelos de fibrosis hepática por inyección de un agente tóxico como CCl_4 o por daño colestático (BDL) o la activación de las LX2 (**Fig. 60**), observamos una tendencia hacia la menor expresión de Cortistatina en los NHLF y en los NHDF activados (**Fig. 93**).

Al igual que con las HHStCs, evaluamos el efecto del tratamiento con Cortistatina sobre la capacidad contráctil de los fibroblastos primarios humanos de piel y de pulmón. Observamos que la administración exógena de este neuropéptido evitó el aumento de la contracción celular en los fibroblastos activados por $\text{TGF}\beta 1$ tanto de forma individual (**Fig. 94**) como en conjunto (**Fig. 95**) y que este efecto se correlacionaba con un menor estado de diferenciación a miofibroblasto αSMA^+ en comparación con las células estimuladas pero no tratadas con Cortistatina (**Fig. 96**).

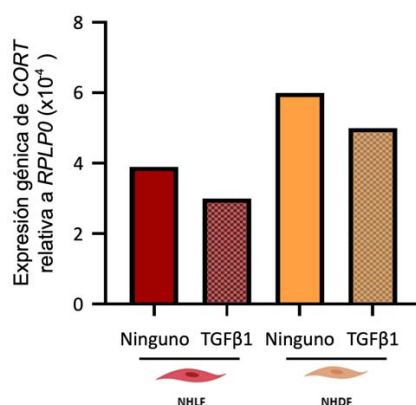


Figura 93. El desarrollo de la respuesta fibrogénica reduce la expresión génica de Cortistatina en NHLF y NHDF. Expresión génica de *CORT* en fibroblastos primarios aislados de pulmón y de piel de humanos normales (NHLF y NHDF respectivamente) activados con $\text{TGF}\beta 1$, cuantificada mediante qPCR en tiempo real y normalizada frente a los niveles del gen interno *RPLP0*. Ninguno: cultivo sin estimulación.

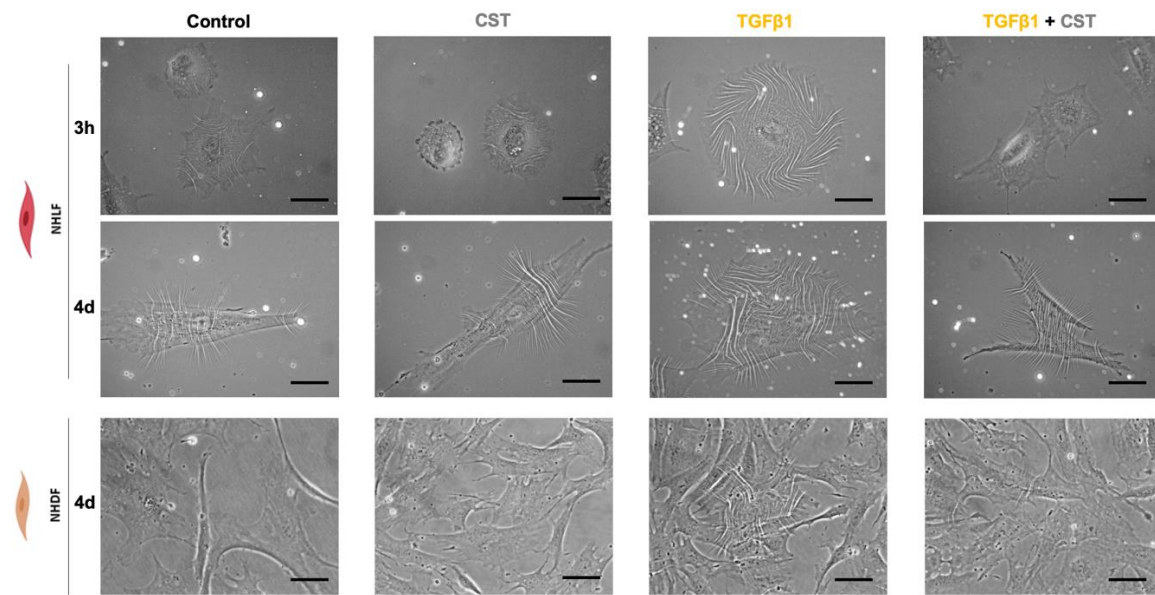


Figura 94. Cortistatina reduce la capacidad contráctil de los NHLF y NHDF.

Estudio de la capacidad contráctil de las HHSteCs estimuladas con TGFβ1 durante 3h o 4 días y tratadas con CST-17 cada 2 días durante este periodo mediante el ensayo de generación de arrugas. Imágenes representativas de las arrugas generadas por células NHLF (arriba) y NHDF (abajo) en el sustrato polimérico a los tiempos indicados. Barra de escala: 50µm. Control: células cultivadas en medio sin estimular ni tratar.

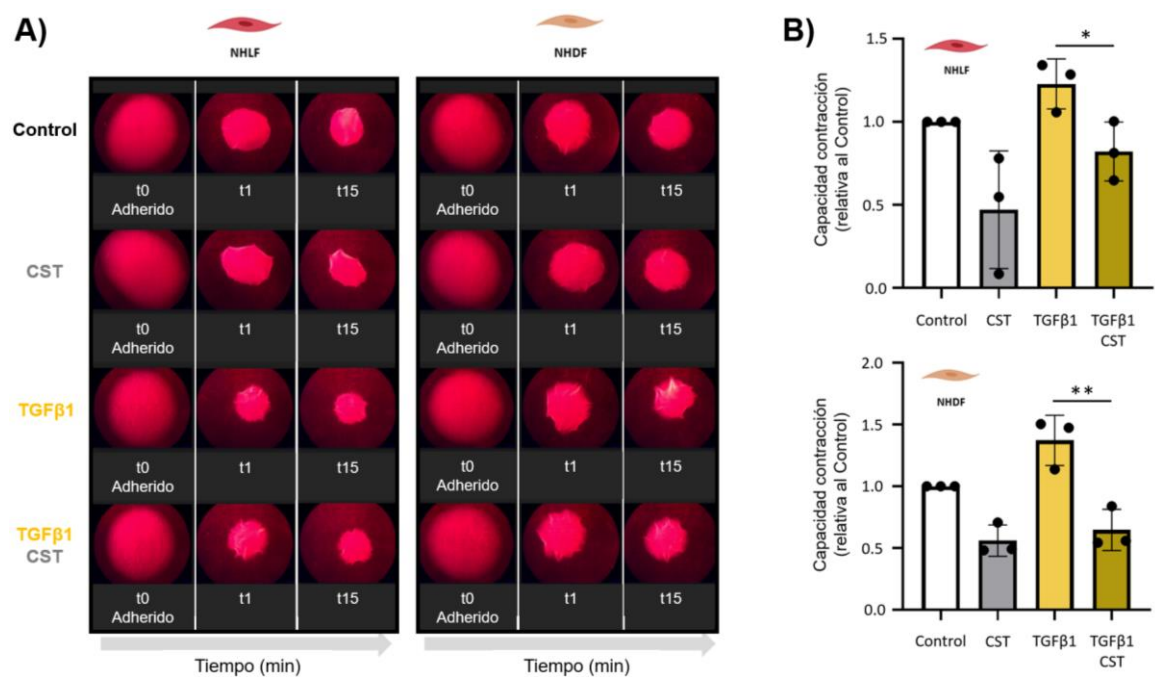


Figura 95. Efecto de Cortistatina sobre la capacidad contráctil de los NHLF y NHDF estimulados con TGFβ1

Estudio de la capacidad contráctil de los NHLF y los NHDF cultivados en el interior de un gel de colágeno, estimulados con TGFβ1 durante 4 días y tratados con CST-17 cada 2 días durante este periodo. A) Imágenes representativas de gels de colágeno estimulados según cada condición. t0: Imagen de gel adherido a la placa. t1 y t15: Imágenes del gel a 1 y 15min respectivamente tras separar el gel de la placa. B) Cuantificación de la capacidad de contracción relativa al Control (gel de colágeno no estimulado ni tratado) a los 15min tras desacoplar el gel de la placa. Control: células cultivadas en medio sin estimular ni tratar. Datos: media + SEM. 3 cultivos independientes. *p<0.05.

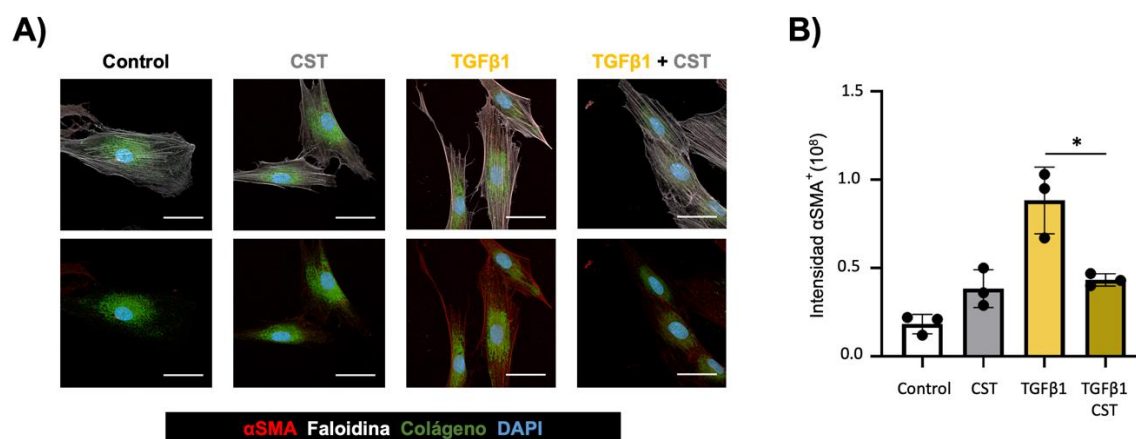


Figura 96. Efecto del tratamiento con Cortistatina sobre el estado de activación de los NHLF.

Estudio del efecto del tratamiento con CST-17 cada 2 días sobre la capacidad de activación y diferenciación en miofibroblastos αSMA^+ de los NHLF estimulados con TGF β 1 durante 4 días. A) Imágenes representativas de NHLF mediante IFI con marcaje rojo para αSMA , blanco para faloidina, verde para colágeno y azul para DAPI tras 4 días de estimulación. Barra de escala: 50 μm . B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de αSMA atendiendo a cada condición. Control: células cultivadas en medio sin estimular ni tratar. Datos: media + SEM. 3 cultivos independientes. * $p < 0.05$ frente a NHLF + TGF β 1.

Por tanto, todos los resultados obtenidos a lo largo de este objetivo dejan patente el efecto directo beneficioso del neuropéptido Cortistatina sobre la capacidad de activación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica, tanto murinas como humanas, y que los receptores SSTR y GHSR1 se encuentran implicados en su mecanismo de acción.

4.3 OBJETIVO 3. Estudiar el efecto terapéutico de la administración de Cortistatina en modelos experimentales de fibrosis hepática.

Una vez determinado el efecto directo del tratamiento con Cortistatina sobre las células efectoras de la respuesta fibrogénica, investigamos si éste se traducía en una regulación beneficiosa del desarrollo de la fibrosis hepática. Para ello, indujimos nuevamente los modelos de fibrosis hepática colestática por BDL y de fibrosis hepática tóxica por CCl₄ y tratamos a los ratones con Cortistatina. Durante este objetivo estudiamos no sólo sus efectos sobre los ratones con deficiencia en Cortistatina, sino que además contemplamos distintas pautas de tratamiento atendiendo a la posibilidad de evitar el daño e incluso revertirlo una vez establecido.

4.3.1 Tratamiento de la fibrosis hepática colestática con Cortistatina.

Primero estudiamos la capacidad de Cortistatina para evitar el fenotipo de daño fibrótico tan exacerbado que observamos en los ratones con deficiencia en su expresión durante la realización del *Objetivo 1*.

El análisis del estudio histopatológico reveló que el tratamiento con Cortistatina evitó el avance de la fibrosis en el modelo de colestático protegiendo al hígado del daño tisular fibrótico (**Fig. 99A-**

C). De tal forma que los ratones *Cort+/-* tratados con Cortistatina presentaron una menor generación de ECM y de pseudo-ductulillos (Fig. 97A y B) y un menor contenido en colágeno en el tejido hepático (Fig. 97C) en comparación con los ratones no tratados. Igualmente, la administración de Cortistatina protegió también a los hepatocitos frente al desarrollo de la exacerbada necrosis observada en los ratones no tratados (Fig. 98A-B).

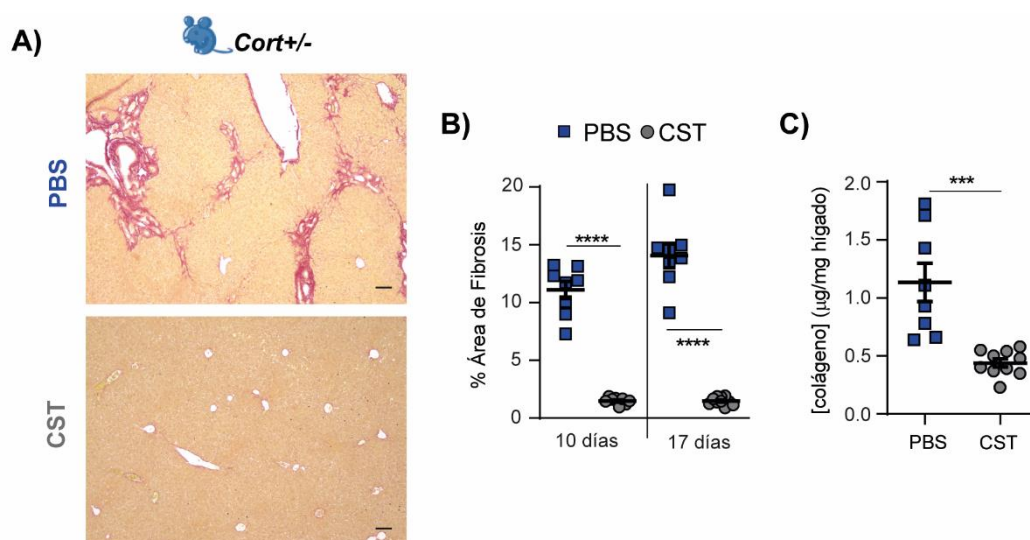


Figura 97. La administración de Cortistatina impide la exacerbada fibrosis hepática colestática observada en ratones deficientes en Cortistatina.

La fibrosis hepática colestática fue inducida en los ratones *Cort+/-* mediante BDL y el tratamiento con CST-29 o PBS se realizó mediante administración intraperitoneal (i.p) 3 veces por semana desde el inicio del modelo. A) Imágenes representativas de tejido hepático teñido de Rojo Sirio a día 17 tras BDL. Barra de escala 100µm. B) Cuantificación del área Rojo Sirio⁺ en el tejido hepático recogido a los tiempos indicados. C) Cuantificación de la generación de colágeno mediante análisis de hidroxiprolina en el tejido hepático recogido a día 17 tras inicio del modelo. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. ***p<0.001, ****p<0.0001.

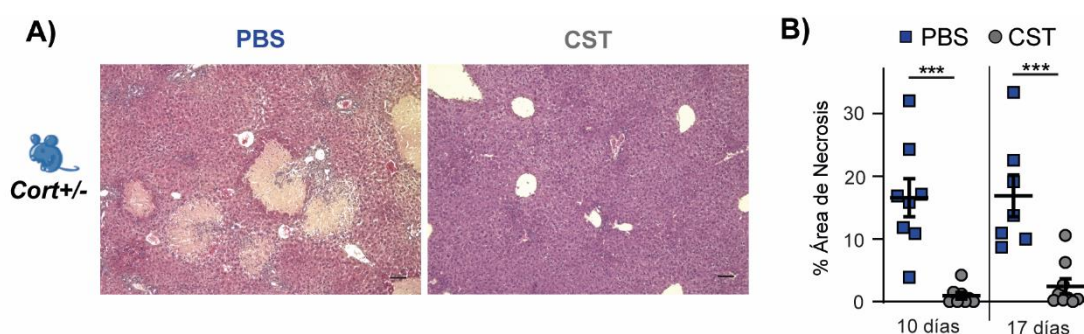


Figura 98. El tratamiento con Cortistatina evita el daño hepatocitario generado por BDL.

Análisis de la extensión de la necrosis derivada del desarrollo de fibrosis hepática colestática inducida por BDL en los ratones *Cort+/-* tratados con CST-29 o PBS vía i.p 3 veces por semana desde el inicio del modelo. A) Imágenes representativas del tejido hepático teñido con H/E a 17 días tras BDL. Barra de escala: 100µm. B) Cuantificación del área ocupada por necrosis en el tejido hepático recogido a día 10 y 17 tras inicio del modelo. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. ***p<0.001, ****p<0.0001.

Analizamos la presencia de miofibroblastos en el tejido hepático durante el desarrollo de la fibrosis colestática y detectamos una menor activación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica en los ratones *Cort+/-* tratados con Cortistatina frente a los tratados con PBS (Fig. 99A y B). El

tratamiento con Cortistatina consiguió también reducir en estos ratones la expresión génica de marcadores fibróticos (**Fig. 99C**).

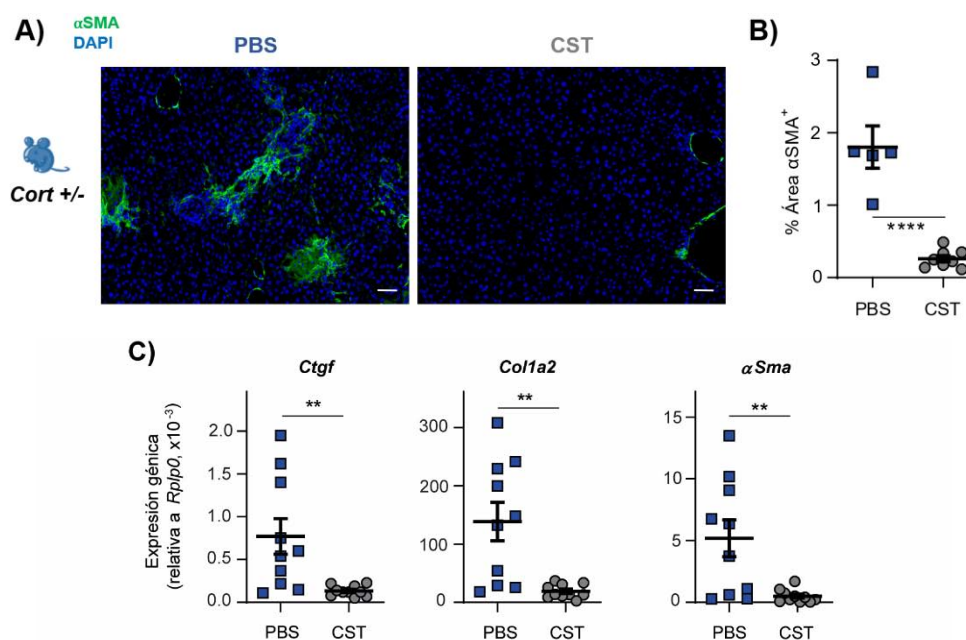


Figura 99. Efecto del tratamiento con Cortistatina sobre miofibroblastos α SMA⁺ y marcadores de fibrosis.

Análisis de la presencia de miofibroblastos activados mediante IFI y de expresión génica de CTGF, colágeno y α SMA en tejido hepático de ratones Cort^{+/-} a día 10 tras la inducción del modelo de fibrosis hepática colestática por BDL. El tratamiento vía i.p con CST-29 o PBS 3 veces por semana desde el inicio el modelo. A) Imágenes representativas de IFI de tejido hepático marcado con verde para α SMA y azul para DAPI. Barra de escala: 100 μ m. B) Cuantificación del área ocupada α SMA⁺. C) Expresión génica de *Ctgf*, *Col1a2*, *α Sma* cuantificada por qPCR en tiempo real y relativa a la expresión de *Rplp0*. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. **p<0.01.

Ya que estos resultados indican que el tratamiento con Cortistatina conseguía evitar el daño tisular cuando se administraba desde el inicio del modelo, decidimos evaluar si un tratamiento más tardío conseguiría no sólo evitar el avance de la respuesta fibrogénica sino también revertir la fibrosis ya establecida. Para ello, estudiamos distintas pautas de tratamiento durante el modelo de fibrosis hepática colestática y encontramos que Cortistatina podía ejercer su efecto terapéutico tanto en un régimen temprano, desde el día 1 (inicio del modelo) o el día 5 (cuando se producía el pico de inflamación), como en uno más tardío, desde día 14 (respuesta fibrogénica ya establecida) (**Fig. 100 y 101**). Mientras que la administración del neuropéptido en los primeros días del modelo consiguió evitar tanto la generación de los daños de carácter fibrótico (**Fig. 100A-C**) como la infiltración celular y el daño hepatocitario (**Fig. 100A y D**), el tratamiento desde el día 14 tras la BDL consiguió evitar la generación de más daño en el tejido hepático e incluso revertir el daño fibrótico ya establecido (**Fig. 100A-D**). Ambas pautas de tratamiento con Cortistatina, tanto temprano (día 5) como tardío (día 14), disminuyeron la presencia de estas células activadas en el tejido hepático de los ratones con BDL (**Fig. 101A y B**).

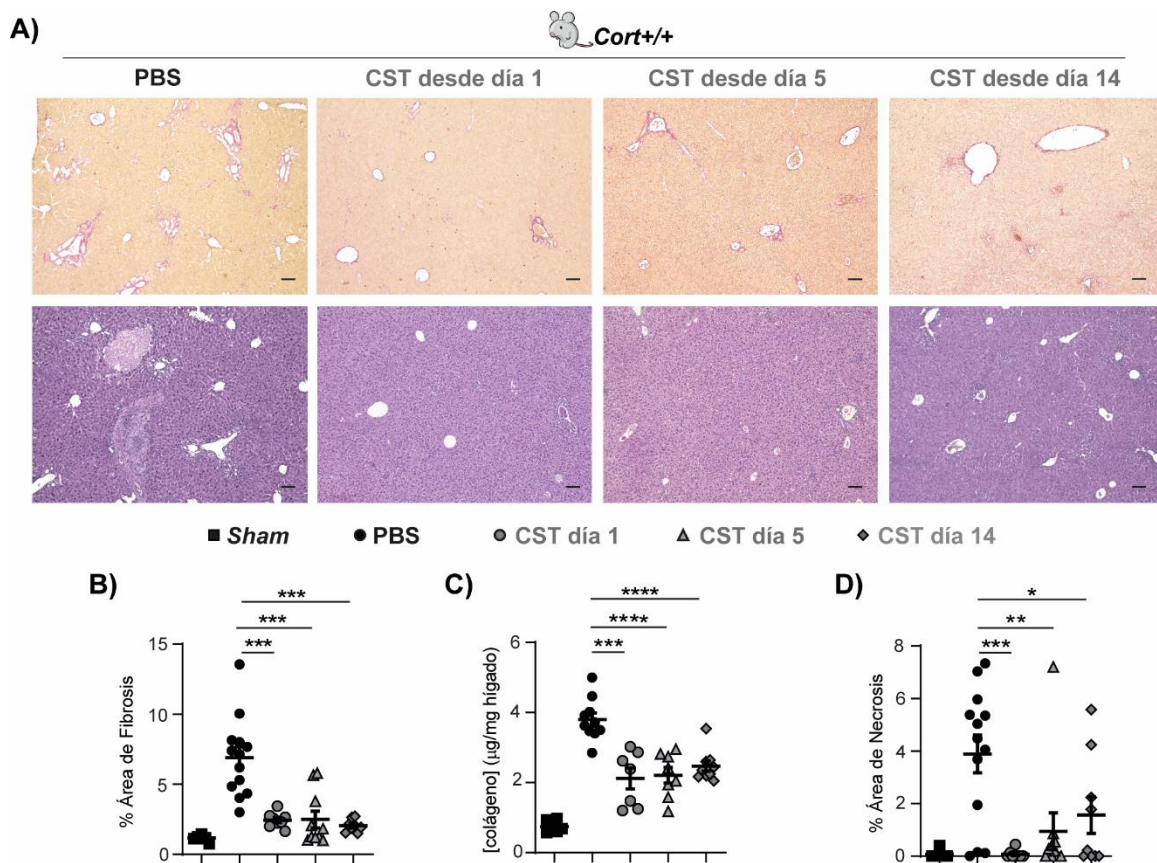


Figura 100. La administración exógena de Cortistatina protege de la fibrosis hepática colestática.

Se indujo el desarrollo de fibrosis hepática colestática en ratones *Cort^{+/+}* mediante BDL y posteriormente los ratones fueron tratados con PBS o CST-29 comenzando su administración a día 1, 5 o 14 tras la BDL atendiendo al estudio de distintas pautas terapéuticas. A) Imágenes representativas de la tinción Rojo Sirio (arriba), y de la tinción H/E (abajo). Barra de escala: 100µm. B) Cuantificación del área ocupada Rojo Sirio⁺. C) Cuantificación de la generación de colágeno en hígados recogidos mediante análisis de hidroxiprolina. D) Cuantificación del área ocupada por necrosis. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. Imágenes y datos relativos a tejido hepático obtenido a día 28 tras inicio del modelo. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

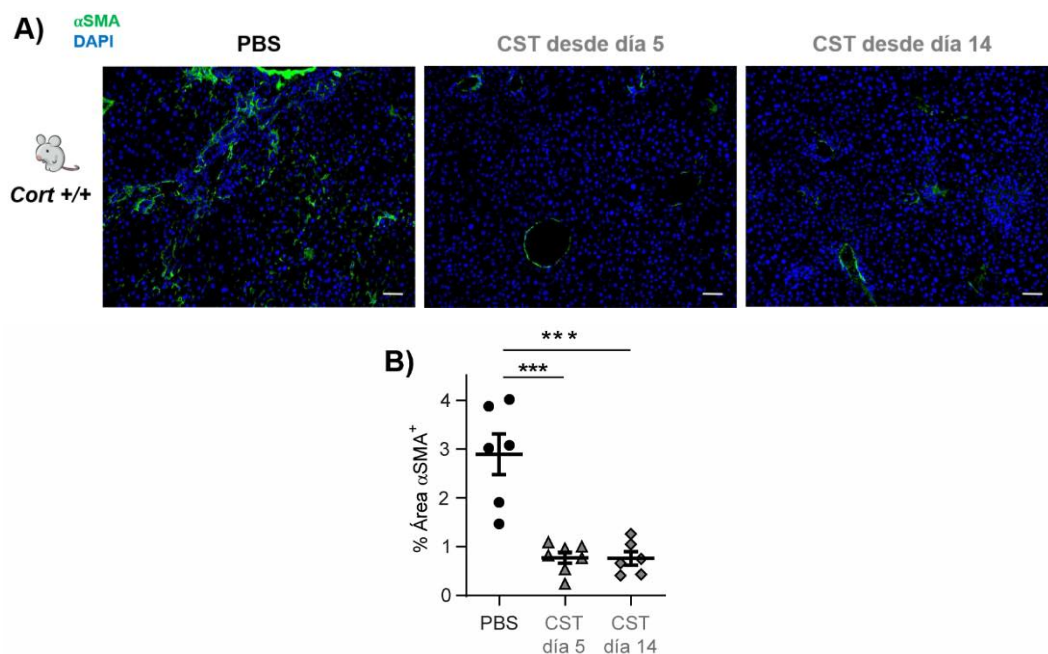


Figura 101. El tratamiento con Cortistatina disminuye la diferenciación de las células efectoras fibrogénicas

Análisis de la presencia de miofibroblastos activados mediante IFI y de expresión génica de CTGF, colágeno y α SMA en tejido hepático de ratones *Cort+/+*, tratados con CST-29 desde los días indicados o con PBS, a día 28 tras la inducción del modelo de fibrosis hepática colestática por BDL. A) Imágenes representativas de IFI de tejido hepático con marcaje verde para α SMA y azul para DAPI. Barra de escala: 100 μ m. B) Cuantificación del área ocupada por marcaje α SMA+. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. *** p <0.001.

Como vimos durante la realización del *Objetivo 1*, el desarrollo de la fibrosis durante este modelo se correlacionó con un aumento de los niveles séricos de los marcadores de daño hepático AST y ALT. De tal forma que al conseguir evitar e incluso revertir la fibrosis hepática con el tratamiento con Cortistatina, observamos que, mientras que los ratones a los que administramos PBS presentaron elevados niveles de AST y ALT en plasma, la administración tanto temprana como tardía de Cortistatina lograba reducir dichos niveles hasta incluso más de la mitad (**Fig. 102**).

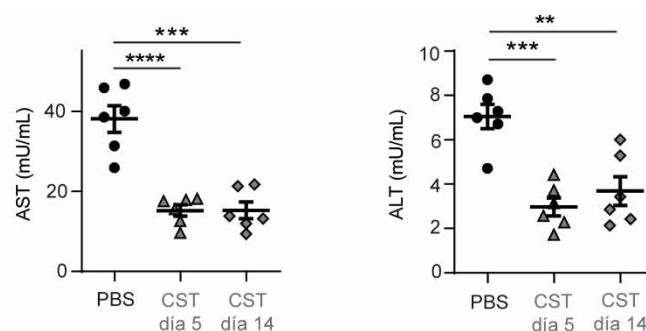


Figura 102. La administración de Cortistatina reduce los niveles séricos de AST y ALT en ratones *Cort+/+* con fibrosis hepática colestática.

Análisis de los niveles de AST y ALT realizado en muestras de plasma de ratones *Cort+/+*, tratados con CST-29 desde los días indicados o con PBS, obtenidas en el día 28 tras BDL. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001.

4.3.2 Tratamiento de la fibrosis hepática tóxica con Cortistatina.

Atendiendo a la existencia de enfermedades asociadas a la fibrosis hepática con distinta etiología, decidimos estudiar también el efecto del tratamiento con Cortistatina durante el desarrollo de la fibrosis hepática tóxica. Primero evaluamos el efecto de la administración de Cortistatina en ratones con este tipo de fibrosis y con deficiencia en la expresión del propio neuropéptido. El análisis histológico de estos ratones reveló la capacidad de Cortistatina para evitar la potente respuesta fibrogénica en los ratones no tratados donde se apreció un fuerte entramado fibrótico (**Fig. 103A y B**) que se correlacionaba con un alto contenido en colágeno (**Fig. 103C**). Esta menor generación de daño en el tejido hepático se vio asociada a su vez con la ausencia de miofibroblastos α SMA⁺ en los ratones *Cort+/-* tratados con Cortistatina (**Fig. 104A y B**).

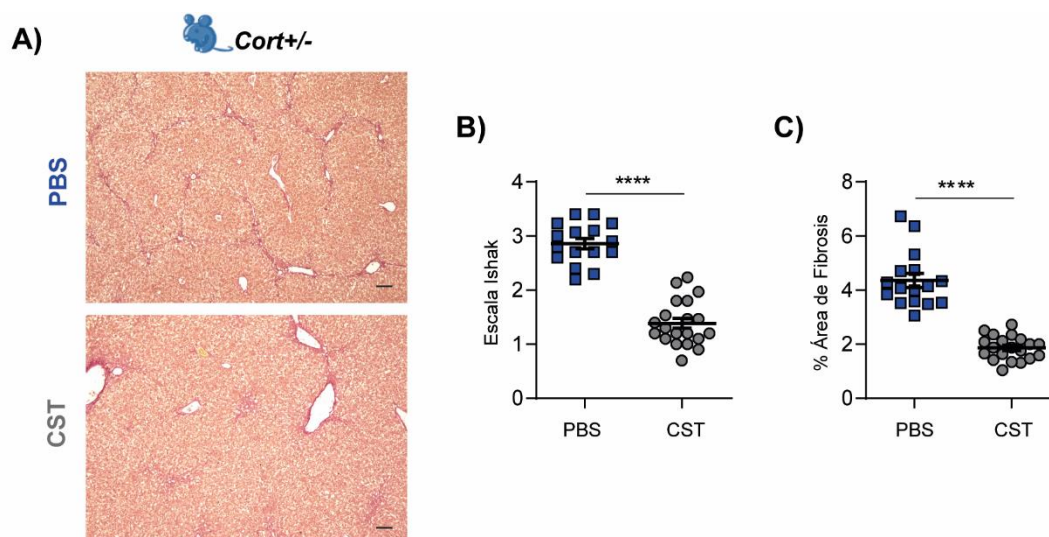


Figura 103. El tratamiento con Cortistatina protege frente al exacerbado daño fibrótico generado por CCl₄ en ratones *Cort*^{+/-}

La fibrosis hepática tóxica fue inducida en ratones *Cort*^{+/-} mediante inyecciones i.p del compuesto tóxico CCl₄ (1:9 en aceite de oliva) y el tratamiento con PBS o CST-29 se realizó vía i.p 3 veces por semana desde el inicio del modelo. A) Imágenes representativas de la tinción Rojo Sirio de tejido hepático recogido a día 31 desde inicio del modelo. Barra de escala 100µm. B) Evaluación del grado de daño por fibrosis según la escala Ishak. C) Cuantificación del área ocupada por tejido hepático Rojo Sirio⁺ a día 31. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. ****p<0.0001.

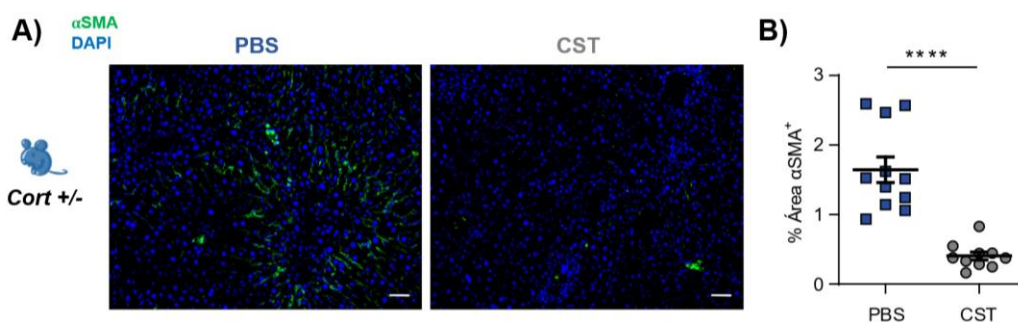


Figura 104. El tratamiento con Cortistatina disminuye la diferenciación de las células efectoras fibrogénicas en modelo de fibrosis hepática tóxica.

Análisis de la presencia de miofibroblastos activados mediante IFI en tejido hepático de ratones *Cort*^{+/-}, tratados con PBS o con CST-29, obtenido a día 31 tras la inducción del modelo de fibrosis hepática tóxica por CCl₄ (1:9 en aceite de oliva). A) Imágenes representativas de IFI de tejido hepático con marcaje verde para αSMA y azul para DAPI. Barra de escala: 100µm. B) Cuantificación del área ocupada por marcaje αSMA⁺. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. ****p<0.0001.

Para evaluar las posibles pautas del tratamiento con Cortistatina para este tipo fibrosis hepática decidimos analizar los efectos de su administración en ratones *Cort*^{+/+} comenzando el tratamiento desde día 5 o desde día 14 tras el inicio del modelo.

A pesar de haber inducido una fibrosis más exacerbada en los ratones *Cort*^{+/+} (proporción de CCl₄ en aceite de oliva 3 veces mayor a la utilizada para ratones deficientes en Cortistatina), observamos que la administración del neuropéptido conseguía evitar la desestructuración de la arquitectura interna del hígado (Fig. 105A). Mientras que los ratones *Cort*^{+/+} tratados con PBS presentaron un nivel de daño por fibrosis de alrededor de 3 en la Escala Ishak, los ratones que recibieron el

tratamiento con Cortistatina, tanto con el régimen temprano como con el tardío, desarrollaron un menor nivel de daño tisular (menos de 2 en la Escala Ishak) que se correspondía con la disminución del área ocupada por tejido fibrótico (**Fig. 105B y C**). Asimismo, el estudio de la presencia de miofibroblastos α SMA⁺ confirmó nuevamente la capacidad de Cortistatina para evitar la activación de dichas células e incluso desactivar aquellas presentes en el tejido hepático tratado desde día 14 (**Fig. 105D y E**).

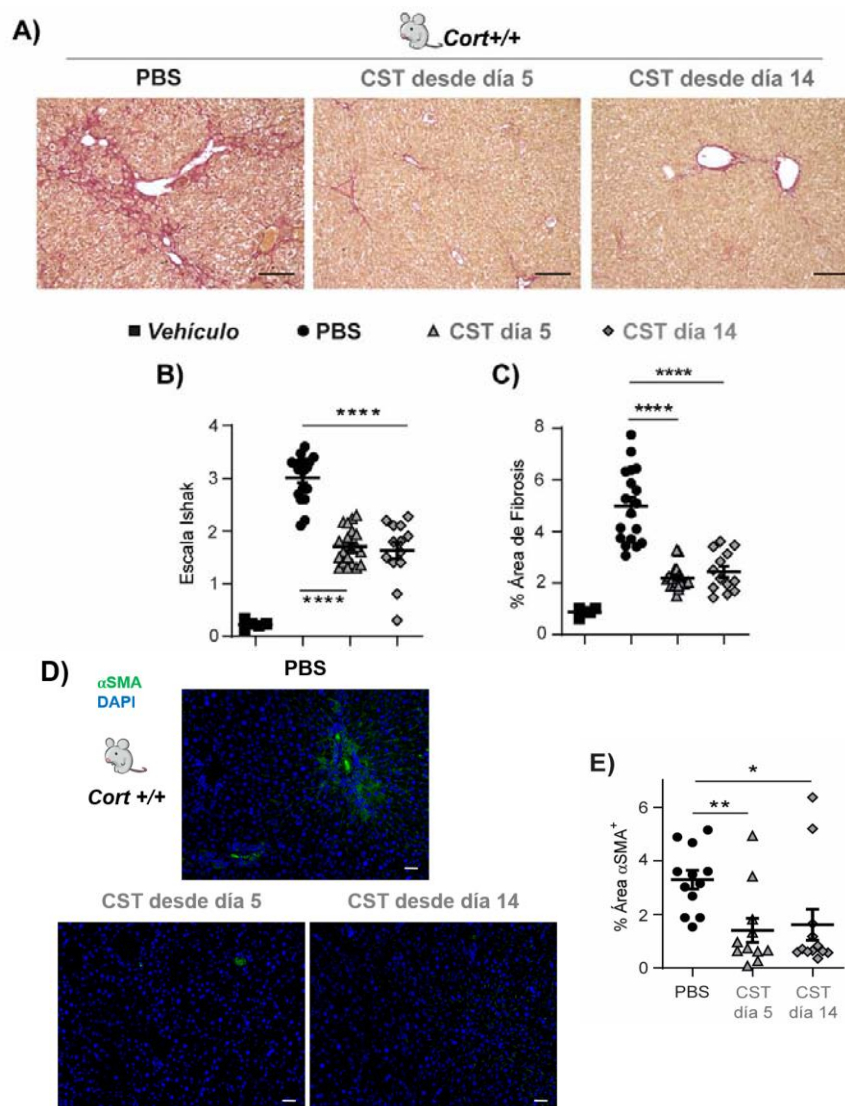
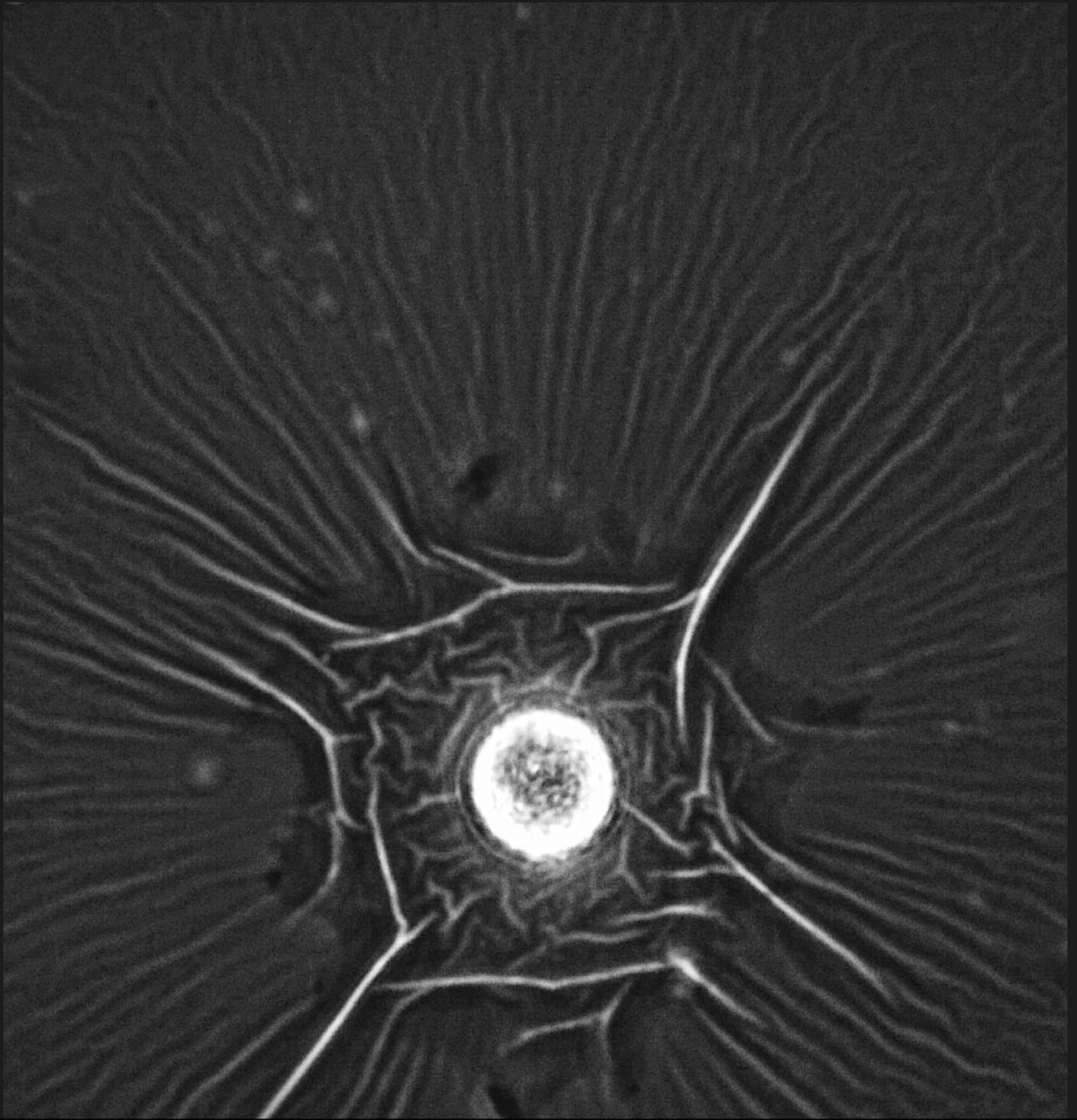


Figura 105. El tratamiento con Cortistatina reduce la severidad de la fibrosis hepatotóxica inducida en ratones *Cort*^{+/+}.

Se generó una fibrosis hepática tóxica severa en los ratones *Cort*^{+/+} mediante inyecciones repetitivas de CCl₄ con una proporción 1:3 en aceite de oliva y los ratones fueron tratados vía i.p con PBS o CST-29 3 veces por semanas empezando en el día 5 (régimen temprano) o en el día 14 (régimen tardío). A) Imágenes representativas de tejido hepático recogido a día 42 tras inicio del modelo y teñido con Rojo Sirio. Barra de escala 100 μ m. B) Evaluación del grado de daño por fibrosis según la escala Ishak en hígados recogidos a día 42. C) Cuantificación del área ocupada por tejido hepático tinción Rojo Sirio⁺ recogido a día 42. D) IFI de tejido hepático con marcaje verde para α SMA y azul para DAPI. Imágenes representativas a día 28. Barra de escala: 100 μ m. E) Cuantificación del área ocupada por marcaje α SMA⁺. Datos = media + SEM con puntos representando valores individuales de ratones. * p <0.05, ** p <0.01, **** p <0.0001.

Teniendo presentes todos los resultados obtenidos durante el estudio del efecto terapéutico de Cortistatina en los modelos experimentales de fibrosis hepática, encontramos que el tratamiento con Cortistatina es capaz de regular el desarrollo de la fibrosis, lo que abriría la posibilidad de utilizar este neuropéptido en terapias para enfermedades hepáticas crónicas.



5. DISCUSIÓN

La lesiones hepáticas causadas por factores como el abuso de alcohol, las infecciones víricas, la colestasis o procesos inflamatorios crónicos desencadenan como respuesta procesos fisiológicos de reparación como el de la fibrosis³¹. Sin embargo, la respuesta fibrogénica puede desregularse, tornarse patológica y de esta forma generar más daños de los que se intentan reparar. Por tanto, es importante que exista un balance entre la generación y activación de factores tanto fibrogénicos como anti-fibróticos para que los procesos de cierre de heridas se resuelvan adecuadamente²⁰⁵. A pesar de tener un conocimiento considerable sobre la patogénesis del proceso fibrótico, uno de los principales cuellos de botella que afectan al diagnóstico y seguimiento de la fibrosis hepática es que la prueba estándar se basa en la biopsia hepática, procedimiento invasivo que conlleva ciertos riesgos y un alto coste financiero. Además, a pesar de los numerosos estudios en el campo de la fibrosis hepática tampoco existen actualmente terapias que sean realmente eficaces para las enfermedades hepáticas asociadas a fibrosis más allá del trasplante de órgano y la retirada del agente causante del daño. Por ello, es necesaria la búsqueda de factores endógenos que jueguen un papel clave en el desarrollo y progresión de la fibrosis y que sean capaces de regular las distintas fases de la respuesta fibrogénica, ya sea actuando en conjunto o de forma más concreta sobre los elementos implicados.

En esta tesis, a través de estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, hemos conseguido demostrar que el neuropéptido Cortistatina actúa como uno de estos factores endógenos con capacidad protectora ante el desarrollo de la respuesta fibrogénica en el hígado. Los resultados obtenidos muestran, por un lado, que la deficiencia en la expresión de Cortistatina podría utilizarse como marcador de mala prognosis de enfermedades asociadas a la fibrosis hepática y, por otro, que este neuropéptido es un candidato atractivo para el diseño de terapias anti-fibróticas para trastornos hepáticos crónicos de diferentes etiologías.

5.1 Deficiencia en Cortistatina como marcador de mala prognosis.

Aunque los mecanismos causales de las enfermedades fibróticas son diversos, todas ellas comparten alteraciones moleculares comunes que resultan en una acumulación exagerada e incontrolada de macromoléculas de ECM en los tejidos afectados y en el reemplazo del tejido normal por tejido fibrótico no funcional. En esta tesis hemos observado una gran susceptibilidad al desarrollo de fibrosis en ratones deficientes en Cortistatina tanto en el modelo de fibrosis hepatotóxica (asociado a un perfil de pacientes con hepatitis crónica viral o esteatohepatitis no alcohólica entre otras) como en el modelo de daño colestático (similar al presente en pacientes con cirrosis primaria biliar o colangitis esclerosante), lo que parece indicar la capacidad de Cortistatina para ejercer como factor endógeno modulador del desarrollo general de la fibrosis hepática independientemente del agente causal. Y es que, a pesar de que el daño hepático generado progresó de forma distinta dependiendo del modelo, como ocurriría también en pacientes con distintos tipos

de fibrosis hepática, la deficiencia en Cortistatina predispuso a los ratones en ambos casos al desarrollo de signos clínicos de mayor gravedad y de forma más temprana que en condiciones normales. Por un lado, con el modelo de BDL, a través de la acumulación de ácidos biliares en el tejido hepático debida a la obstrucción del ducto biliar, se desencadenó la proliferación de células epiteliales que llevó, en el caso de la deficiencia en Cortistatina, a la generación de un alto número de nuevos pseudo-ductulillos, al desarrollo de inflamación portal y a la exacerbada fibrosis colestática observada. Este tipo de daño indujo además muerte hepatocitaria y ruptura de la integridad del epitelio biliar. Por otro lado, con la administración de CCl_4 se produjo un fuerte daño hepatocitario debido a la formación y liberación de radicales libres hepatotóxicos en el interior del hígado que desencadenaron una potente respuesta inflamatoria y la generación de un intrincado entramado fibrótico entre la mayoría de los espacios porta y venas centrolobulillares en los ratones *Cort+/-* y *Cort-/-*. A pesar de estas diferencias en el desarrollo de la fibrosis hepática entre los dos modelos, la deficiencia en Cortistatina se tradujo en ambos casos en un daño tisular más temprano, con un gran aumento en la generación de ECM y una mayor activación y diferenciación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica en miofibroblastos, lo que conllevó una mayor expresión de marcadores de fibrosis por el tejido hepático de estos ratones y un aumento de los niveles séricos de bilirrubina, ALT y AST, principales marcadores de disfunción hepática (**Fig. 106**). De hecho, es importante señalar que la deficiencia tan solo parcial en la expresión de este neuropéptido conllevó una respuesta fibrogénica igual de descontrolada y tan tremendamente dañina como la desarrollada por los ratones *Cort-/-*.

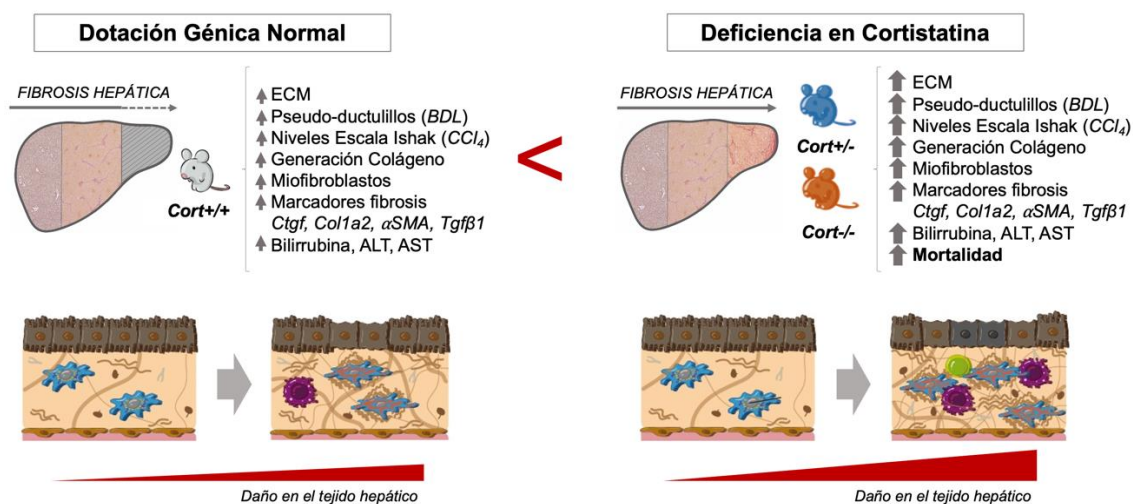


Figura 106. La deficiencia en Cortistatina predispone a mayor desarrollo del daño hepático por fibrosis.

Los ratones *Cort+/-* y *Cort-/-* presentaron una fibrosis hepática mucho más avanzada que la de los ratones *Cort+/+*. La deficiencia en Cortistatina en ambos modelos experimentales de fibrosis hepática, tóxica y colestática, conllevó una gran generación de ECM debido a la mayor presencia de fibroblastos activados en el tejido. Los altos niveles séricos de bilirrubina, ALT y AST confirmaban el elevado daño hepático presente en los ratones *Cort+/-* y *Cort-/-* que justificaba la alta tasa de mortalidad obtenida en estos ratones en con ambos tipos de fibrosis hepática.

Otro aspecto observado en los ratones *Cort+/-* y *Cort-/-* que nos pareció reseñable fue el daño en los pulmones de estos ratones durante el desarrollo del modelo de fibrosis hepática tóxica. Si bien

es cierto que la afectación del tejido pulmonar podía deberse a la exposición a CCl_4 que, a través de los radicales libres generados, provocaría una importante tormenta citoquímica de carácter destructivo, esta situación sólo fue observada en los ratones deficientes en cortistatina. Este hecho, junto con otro estudio realizado por nuestro laboratorio en relación al papel protector de Cortistatina durante la inflamación y la fibrosis pulmonar²⁰⁶, induce a pensar que quizás la deficiencia en Cortistatina conlleva una mayor susceptibilidad a daño pulmonar.

Por tanto, parece que Cortistatina estaría comportándose como un freno endógeno de la fibrosis hepática que de no estar haría que su progreso se viera agravado. Es decir, que sería esperable una peor prognosis de la fibrosis hepática en pacientes que presenten además una deficiencia total o parcial en Cortistatina, que puede ser circunstancial y más o menos transitoria o permanente. Por ejemplo, se ha descrito la disminución en la expresión de Cortistatina en situaciones que impliquen la privación de sueño o el estrés^{161,162}. Los ratones deficientes en Cortistatina presentan unos niveles anormales de glucocorticoides como consecuencia de un eje hipotálamo-pituitaria-adrenal alterado el cual está generalmente activado en respuesta a estresantes físicos y psicológicos¹⁶². Además, se sabe que existen personas con deficiencia parcial permanente en Cortistatina, ya que son heterocigotos para este neuropéptido, y que presentan patologías importantes. Estos individuos padecen el síndrome de la monosomía 1p36 asociado a la delección terminal subtelomérica más común en humanos²⁰⁷, región en la que se encuentra el gen de Cortistatina¹⁵⁷ entre otros. Las personas que padecen este síndrome desarrollan déficits funcionales y anomalías congénitas como el retraso en el crecimiento, hipotonía, defectos cardíacos congénitos o miocardiopatías dilatadas entre otros²⁰⁷. Aunque hay numerosos genes más en la región deleccionada en este síndrome, se debe tener presente la importancia de la deficiencia en Cortistatina y cómo ésta podría estar favoreciendo el avance de diversas patologías como ocurre en el caso de la fibrosis hepática.

Durante esta tesis hemos evidenciado la relación inversa existente entre el desarrollo de la fibrosis hepática y los niveles de expresión de Cortistatina. Resultados preliminares analizando bases de datos ya mostraban cómo pacientes con distintas patologías asociadas a fibrosis hepática (HBV¹⁸², HCV¹⁸³, NAFLD¹⁸⁴, colestasis biliar y atresia biliar infantil¹⁸⁵) presentaban menores niveles de expresión de este neuropéptido a medida que el grado de daño y avance de la enfermedad eran mayores. Comprobamos que esta misma relación inversa se establecía en los hígados de ratones con fibrosis hepática, tanto tóxica como colestática, y en las células efectoras de la respuesta fibrogénica cuando éstas se encontraban en estado activado. Este hecho es muy importante ya que, tal como hemos presentado, la deficiencia en Cortistatina, tanto parcial como total, predispone al desarrollo de respuestas fibróticas exacerbadas en el tejido hepático dañado. Es decir, que si un paciente presentase bajos niveles de expresión del neuropéptido Cortistatina sufriría una fibrosis hepática más temprana y de carácter avanzado, la cual va a hacer que esos mismos niveles de expresión disminuyan aún más y se genere un círculo de retroalimentación inversa que derive

probablemente en un desenlace fatal. Además, esta relación inversa entre la expresión de Cortistatina y el desarrollo de fibrosis parece no estar acotada al tejido hepático, otro estudio realizado por nuestro laboratorio ha demostrado también la misma relación inversa en otros tejidos como la piel²⁰⁸ y los pulmones²⁰⁶. Por lo que, a falta de comprobarlo en un mayor número de tejidos, podría extrapolarse estos resultados al desarrollo general de la respuesta fibrogénica.

A pesar de ser llamativo que durante desarrollo de la fibrosis hepática se detectasen unos menores niveles de expresión de Cortistatina a pesar de estarse produciendo por células tanto del tejido hepático como infiltrantes, esto podría estar ocurriendo debido a que la disminución de la expresión de este neuropéptido por parte de las HSCs sea mucho mayor que lo que pueda suponer el aumento del número de células capaces de expresar Cortistatina en el tejido hepático dañado. Además, es interesante que el *Human Protein Atlas* recoja únicamente a las células de Ito (HSCs) y a las KCs como poblaciones celulares residentes en el tejido hepático capaces de expresar Cortistatina en humano^{209,210}, lo que se podría correlacionar con la mayor expresión detectada en las LX2 con respecto a las HSCs murinas, e invita a estudiar más detenidamente el papel que Cortistatina pueda estar jugando sobre las KCs, al existir una mayor presencia de estas células en los hígados *Cort*^{-/-} como demuestra nuestro estudio transcriptómico.

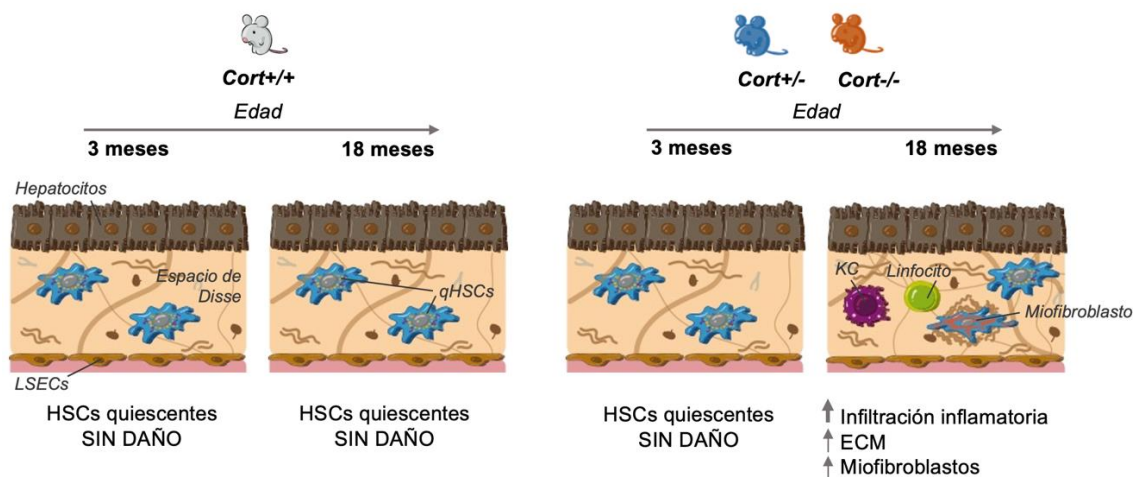


Figura 107. La deficiencia en Cortistatina implica un estado de pre-activación celular durante el envejecimiento. Mientras que no se encontraron diferencias entre el tejido hepático de ratones *Cort*^{+/+} jóvenes (3 meses) y envejecidos (18 meses), en ratones *Cort*^{+/-} y *Cort*^{-/-} de 18 meses se detectó una ligera remodelación tisular con presencia de componente inflamatorio y de miofibroblastos activados.

El estudio comparativo entre los tres genotipos de ratón *naïve* mostró que, durante el envejecimiento fisiológico, la deficiencia endógena en Cortistatina conllevaba un aumento del estado de activación de las células efectoras de respuesta fibrogénica junto con una mayor presencia de infiltrado inflamatorio en el tejido hepático (**Fig. 107**). Es interesante la incipiente remodelación tisular que se fue desarrollando a medida que los ratones deficientes en Cortistatina envejecían ya que reflejaría una situación basal de pre-activación celular que se agravaría ante estímulos dañinos, tal como observamos al inducir ambos modelos experimentales. De tal forma que, si trasladamos estos

resultados al ser humano, que durante su envejecimiento podría enfrentarse a multitud de situaciones desencadenantes de un daño hepático, la deficiencia en Cortistatina podría implicar mayores complicaciones al estar el tejido hepático ya predispuesto a desarrollar una fuerte respuesta fibrogénica. De hecho, podría incluso ser que durante el propio envejecimiento fisiológico los niveles de Cortistatina disminuyeran y esto haga que los ratones de mayor edad con una deficiencia parcial en su expresión presenten la respuesta fibrogénica detectada que, aunque de carácter leve, marca una diferencia con respecto a los ratones con dotación génica normal.

Aunque durante la inducción de los modelos experimentales se produce el reclutamiento e infiltración de componente inflamatorio, y éste es ligeramente mayor en los ratones con deficiencia en Cortistatina, esta participación no parece estar jugando un papel clave, sino que dicha deficiencia parece estar más involucrada en el desarrollo de la propia respuesta fibrogénica actuando principalmente sobre las células efectoras de esa respuesta. De hecho, nuestro cultivo de NPCs deficientes en Cortistatina reveló una mayor presencia de HSCs activadas y PFs activados, y aunque también se detectaron genes de KCs, el perfil que presentan parece estar más relacionado con un carácter inhibitorio (expresión de genes como *Ppar γ* o *Cd163*). Este hecho sería interesante estudiarlo más en detalle ya que la participación de tanto de las KCs como de los macrófagos puede tener un papel dual dependiendo de la fase de la respuesta fibrogénica y de si presentan un perfil tipo M1 o más tipo M2. De igual forma, también habría que evaluar más detenidamente el hecho de haber obtenido esta mayor participación de KCs en las NPCs aisladas de ratones *Cort*^{-/-} y, sin embargo, haber obtenido una menor expresión de F4/80 en el tejido hepático de los ratones *naïve* jóvenes. Histológicamente se podría realizar un marcaje específico para KCs y observar la mayor o menor presencia de estas células o si su presencia se encuentra asociada a algún patrón de localización concreto.

Nuestros datos indican que, a pesar de que las células hepáticas expresan niveles bajos de Cortistatina, éstos podrían regular directamente la activación y diferenciación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica en miofibroblastos. Las NPCs aisladas de ratones deficientes en Cortistatina mostraron una elevada contribución de miofibroblastos activados, mucho mayor que en la población aislada de ratones *Cort*^{+/+}. Estos miofibroblastos, además de presentar un elevado número de fibras estrés α SMA⁺, expresaban marcadores fibrogénicos por encima de lo detectado en las NPCs *Cort*^{+/+}. El análisis transcriptómico reveló que las células deficientes en Cortistatina tenían un perfil genético muy comprometido con la diferenciación a miofibroblastos contráctiles productores de ECM. También encontramos en estas células una elevada expresión de genes asociados al desarrollo y función muscular, al citoesqueleto de actina y al desarrollo de fibras celulares contráctiles (incluyendo numerosos componentes del complejo miosina muscular) (**Fig. 108**).

Es importante resaltar que al mismo tiempo que genes involucrados en la formación/diferenciación muscular, como *Myog*²¹¹, *Mymk*²¹² o *Myod1*²¹³ estaban altamente regulados al alza en las células deficientes en Cortistatina, otros genes que bloquean la miogénesis, como *Mstn*²¹⁴, se encontraban regulados a la baja de forma significativa. También detectamos en estas células la regulación al alza (casi 200 veces mayor) de los genes *Chrnd*^{215,216} y *Chrnγ*^{217,218}, codificantes para la subunidades δ y γ de los receptores colinérgicos/nicotínicos, que son expresados solamente por células musculares, pero no una expresión diferencial de otras subunidades que sí se expresan en otros tipos celulares. De forma similar encontramos un incremento diferencial (40 veces mayor) en la expresión de *Car3*^{219,220}, gen codificante para la isoforma 3 de la anhidrasa carbónica específica de músculo, en las células deficientes en Cortistatina. Todos estos resultados indican que, ante la deficiencia en Cortistatina, las NPCs desarrollan un fenotipo activado más cercano al muscular, con el que durante la respuesta fibrogénica se podrían desarrollar funciones contráctiles de forma más potente que si se expresara Cortistatina con normalidad. Esto es interesante ya que se ha descrito que los miofibroblastos con gran capacidad contráctil son abundantes en las fases avanzadas de las enfermedades asociadas a fibrosis hepática, cuando se pierde la capacidad de reversión/resolución de la respuesta fibrogénica⁴⁵.

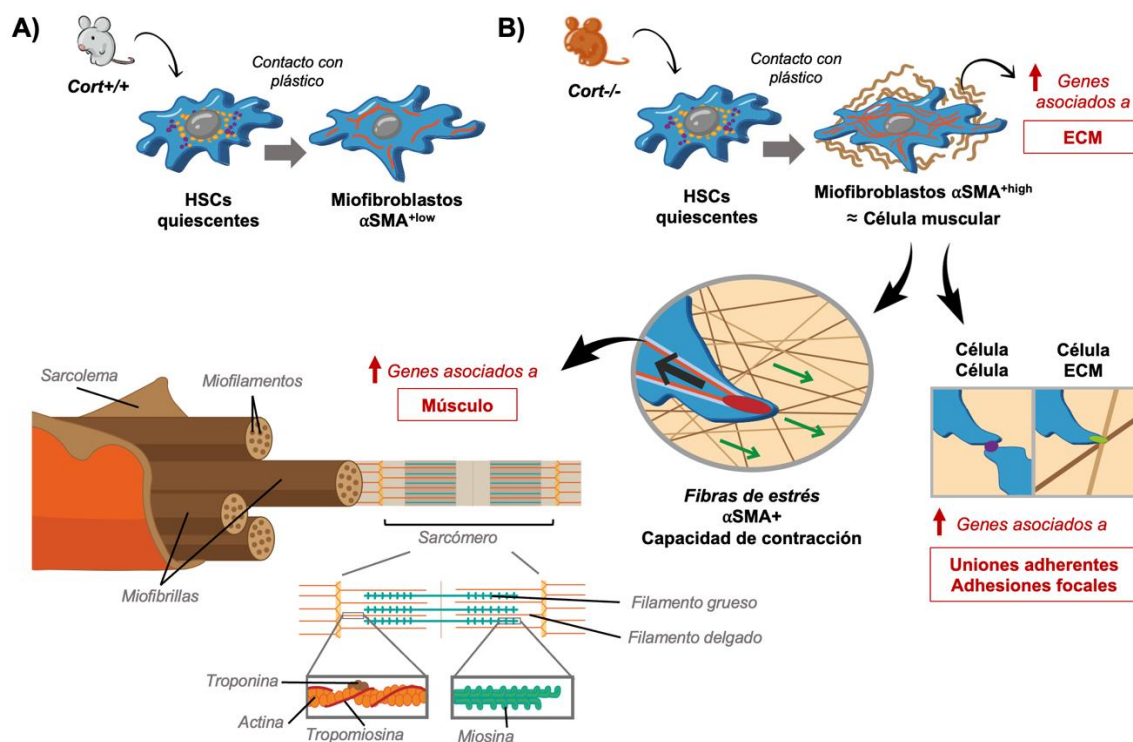


Figura 108. Principales diferencias fenotípicas y genotípicas entre las NPCs primarias *Cort*^{+/+} y *Cort*^{-/-}.

Las HSCs primarias aisladas de ratones *Cort*^{+/+} a pesar de activarse en contacto con el plástico durante su cultivo (A), no llegaron a activarse y diferenciarse de forma tan exacerbada como las aisladas de ratones *Cort*^{-/-}. El análisis transcriptómico de ambos genotipos, y que queda recogido en el Anexo 1, reveló en las NPCs deficientes en Cortistatina un perfil genético muy comprometido con la generación de matriz extracelular, la interacción tanto célula – célula como célula-ECM a través de uniones adherentes o adhesiones focales, y con la expresión de gran cantidad de genes involucrados en músculo a distintos niveles (sarcolema, miofibrillas, miofilamentos, sarcómero, troponina, actina, tropomiosina, miosina...) que sugieren una gran capacidad contráctil por parte de estas células.

A todo lo anterior se suma la expresión regulada a la baja de genes asociados a la senescencia de las HSCs, de tal forma que la deficiencia en Cortistatina predispondría a tener unas células con un alto grado de activación y diferenciación, probablemente irreversible, y una mayor capacidad para mantenerse en ese estado y no ser eliminadas del microambiente hepático. Es importante resaltar el hecho de que la administración del neuropéptido Cortistatina exógeno tanto en los cultivos de HSCs humanas (LX2) como de NPCs *Cort*^{-/-} evitó el elevado grado de activación y la expresión tanto de marcadores fibrogénicos como de genes asociados a músculo, con lo que demostramos así la capacidad de Cortistatina para actuar directamente sobre las células fibrogénicas. Esto invita a pensar en posibles terapias basadas en Cortistatina para el tratamiento de la fibrosis hepática teniendo como diana directa las células efectoras de la respuesta fibrogénica. Además, hay que tener también en cuenta que Cortistatina podría estar también afectando a otras células del tejido hepático, como los propios hepatocitos, en los que Cortistatina podría estar actuando como un factor de supervivencia, de tal forma que falta aumentaría su susceptibilidad a morir, o a presentar más daños como observamos en los modelos experimentales.

Como ya se ha indicado previamente en esta tesis, a pesar de que las HSCs se consideran la fuente principal de miofibroblastos activados en el tejido hepático, numerosos estudios indican que otras poblaciones celulares fibrogénicas podrían contribuir también a la generación de miofibroblastos dependiendo de la etiología del daño³²⁻³⁴. Mientras que en el daño por hepatotoxicidad se atribuye a las HSCs activadas, las PFs se encuentran más implicadas en la fibrosis causada por daño colestático³⁶. Por lo que el tener una mayor expresión de genes relacionados con PFs activados y de genes implicados en la ruta Wnt (ruta implicada en el desarrollo de la fibrosis colestática y que promueve además la proliferación de colangiocitos^{34,221}) sugiere la posibilidad de que la población de miofibroblastos α SMA⁺ detectada en el tejido hepático del ratones con fibrosis colestática podría haberse generado desde HSCs, PFs e incluso colangiocitos a través de la transición epitelio-mesénquima. Atendiendo a los resultados tan relevantes obtenidos con las células aisladas de ratones *naïve*, sería realmente interesante estudiar también el efecto de la deficiencia en Cortistatina sobre NPCs aisladas tras la inducción de un daño tanto hepatotóxico como colestático, y obtener además las células en diversos momentos del desarrollo de la respuesta fibrogénica para ver la participación de las distintas poblaciones en las diferentes etapas del desarrollo de la fibrosis. Asimismo, al haberse obtenido un fenotipo tan marcado y distinto en las células con deficiencia total en Cortistatina, habría que analizar el estado de las células aisladas de ratones con deficiencia parcial, para comprobar si presentarían un perfil génico más cercano al de las células *Cort*^{-/-}, como sugiere el fenotipo observado durante el desarrollo de los modelos experimentales, o sería más de carácter intermedio entre *Cort*^{-/-} y *Cort*^{+/+}.

Durante el análisis transcriptómico observamos también la regulación al alza de *Smpd3* (*Neutral sphingomyelin phosphodiesterase 3*, también conocida como *NSMase2*) y de los genes codificantes

para las catepsinas J (también denominada C), E y H, mientras que la L se encontraba regulada a la baja. Este hecho es llamativo ya que diversas publicaciones han resaltado la participación de *ASMase* (*Acidic sphingomyelin*), pero no de *NSMase2*, y de otras catepsinas, como la B y la D, en la activación de las HSCs y la fibrosis hepática^{222,223,224}. Debido al papel que podrían estar jugando estos factores en las NPCs deficientes en Cortistatina sería adecuado un estudio más profundo sobre el tema.

Asimismo, otro aspecto que suscita nuevas preguntas es la regulación a la baja de numerosos genes implicados en la ruta de señalización del IFN γ (*Ifit1*, *Ifit3*, *Igtp*, *Irgm2*, *Irf1,9* y *7*, *Stat1* o *Stat2*, entre otros) en las células deficientes en Cortistatina. Esta menor expresión podría correlacionarse con una mayor susceptibilidad a infecciones víricas, de tal manera que enfermedades como la hepatitis vírica podrían tener efectos mucho más devastadores en el tejido hepático debido a la ausencia de expresión de este neuropéptido. Sería interesante estudiar el efecto de Cortistatina en este otro tipo de modelo de daño hepático, ya que se nos plantea la posibilidad de que la deficiencia en este neuropéptido conllevara una peor prognosis, no por una mayor respuesta fibrogénica, sino también por una mayor propensión a ser infectados por virus al no tener una respuesta antiviral adecuada. De hecho, esto encajaría con los resultados obtenidos en el análisis comparativo entre hígados de individuos sanos y de pacientes con distintas patologías asociadas a la fibrosis hepática utilizando la base de datos 'National Cancer for Biotechnology Informatoin Gene Expression Omnibus database' donde encontramos que pacientes con el virus de la hepatitis B¹⁸² y de la hepatitis C¹⁸³ presentaban niveles bajos de expresión de Cortistatina. De igual forma, durante este análisis encontramos también la relación inversa entre la expresión de Cortistatina y el desarrollo de otras patologías como NAFLD¹⁸⁴ y colestasis biliar y atresia biliar infantil¹⁸⁵ lo que refuerza los resultados obtenidos con los modelos experimentales empleados durante esta tesis.

Todos nuestros resultados nos inducen a pensar que el neuropéptido Cortistatina podría ser considerado un marcador de mala prognosis en pacientes con enfermedades asociadas a la fibrosis hepática. De tal forma que un estudio de su expresión en los pacientes podría ponerles en alerta ante el empeoramiento de sus síntomas si es que el desarrollo de la fibrosis se viera acompañado de la deficiencia en Cortistatina. De ahora en adelante sería adecuada la realización de un estudio prospectivo de pacientes con este tipo de patologías para estudiar no sólo la expresión génica de Cortistatina en muestras de biopsias hepáticas sino también la posible correlación con cambios en los niveles en sangre.

5.2 Cortistatina como terapia anti-fibrótica para trastornos hepáticos.

Nuestro estudio, junto con otros, ha demostrado que tanto Cortistatina como sus receptores son expresados en las células efectoras de la respuesta pro-fibrogénica, por lo que, este neuropéptido podría actuar sobre ellas de manera autocrina/paracrina^{187,189,225}. De hecho, a través del uso de

antagonistas de los receptores de Somatostatina y de Ghrelina comprobamos la capacidad de Cortistatina para ejercer su efecto anti-fibrogénico a través de ambos tipos de receptores tanto en las HSCs primarias de ratón como en las LX2 activadas con TGF β 1 (**Fig. 109**). Aunque también hemos estudiado su propia producción, TGF β 1 no es de los factores que se han visto más regulados por Cortistatina, sí su vía de señalización como refleja la activación de las HSCs. Durante esta tesis no se ha podido realizar un estudio del mecanismo de acción de Cortistatina sobre las HSCs, pero otro estudio realizado en nuestro laboratorio mostró que fibroblastos pulmonares deficientes en Cortistatina también presentaban respuesta fibrótica exacerbada y sobre-activación de las vías intracelulares canónicas (Smad2/3) y no canónicas (Akt, p38, MAPK, ERK1/2) activadas por TGF β 1, incluso en ausencia de estimulación pro-fibrogénica²⁰⁶. Por lo que, se podría pensar que Cortistatina sería capaz de ejercer su efecto de la misma forma en las HSCs, y que su administración conllevaría una disminución de la sobre-activación de dichas rutas.

Independientemente del mecanismo implicado, el tratamiento con Cortistatina consiguió también reducir la capacidad contráctil de las células efectoras activadas con TGF β 1, tanto de la línea celular de HSCs humanas como de los fibroblastos humanos de piel y pulmón. Este hecho es relevante ya que dicha capacidad contráctil se encuentra estrechamente relacionada con el desarrollo de la hipertensión portal^{199,75}. De tal forma que, si la administración de Cortistatina reduce la capacidad contráctil de las HSCs y nuestros resultados muestran que el tratamiento con el neuropéptido ejerce el efecto contrario al generado ante la deficiencia en su expresión, cabría pensar que las HSCs deficientes en Cortistatina pudieran tener una mayor capacidad de contracción, lo cual coincidiría con los resultados obtenidos con el estudio transcriptómico. Así, esta mayor capacidad contráctil de las HSCs deficientes en Cortistatina podrían correlacionarse con el daño tisular tan exacerbado observado durante el modelo de fibrosis colestática.

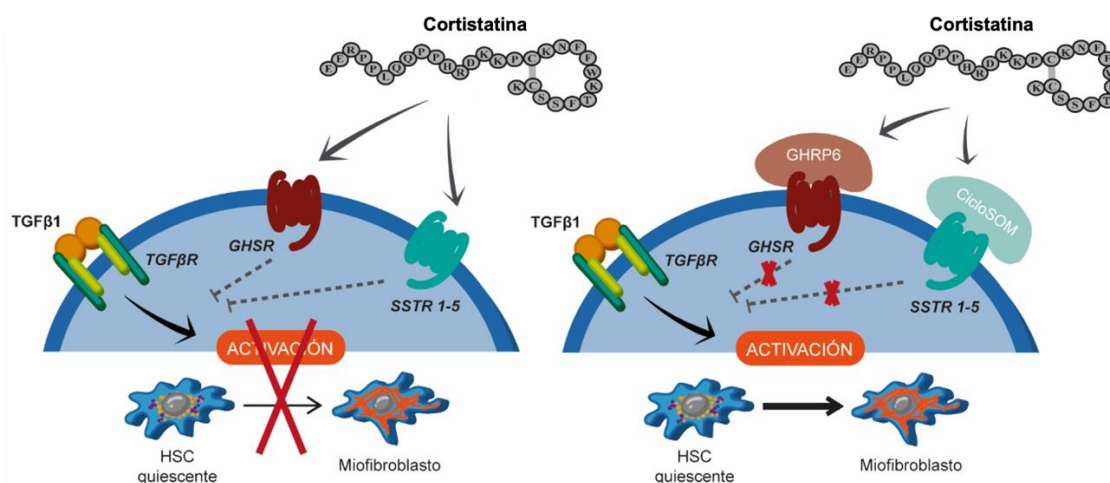


Figura 109. Cortistatina es capaz de ejercer su efecto anti-fibrogénico a través de SSTR1-5 y GHSR.

Los ensayos con los antagonistas de los receptores GHSR1a y SSTR1-5, GHRP6 y CicloSOM respectivamente, demostraron la capacidad de Cortistatina para evitar la activación de las HSCs a través de su unión a ambos tipos de receptores. El bloqueo de los receptores impidió la inhibición de la ruta de TGF β 1 y, por tanto, dicha estimulación favoreció a la activación de las HSCs y su diferenciación a miofibroblastos α SMA⁺.

Además, aunque queda clara la capacidad de Cortistatina para actuar sobre el desarrollo de la fibrosis en conjunto, y que este efecto se produce a través de la desactivación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica como sugieren nuestros resultados *in vitro*, no se puede descartar que Cortistatina esté evitando la apoptosis del hepatocito, ya que esta población celular no sólo es capaz de expresar el propio neuropéptido sino también sus receptores y, por tanto, podría responder ante su administración con mecanismos de protección.

Durante los últimos años, la investigación se ha centrado en los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la fibrosis hepática, y, aunque algunos estudios farmacológicos han dado buenos resultados en modelos experimentales, éstos han fallado en la traslación a muestras humanas. Nuestros resultados revelan claramente la capacidad de Cortistatina para evitar la activación y diferenciación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica a miofibroblastos, no sólo en líneas celulares de HSCs, sino también en fibroblastos primarios humanos, que si bien no son HSCs, plantean un escenario similar y abren la vía de un posible tratamiento en humanos. Además, con esta tesis hemos conseguido demostrar el efecto terapéutico de Cortistatina, no sólo a nivel celular, sino también en el desarrollo de la fibrosis hepática con modelos experimentales tanto de daño crónico, como el de BDL, como de daño agudo, como el de CCl₄ (Fig. 110).

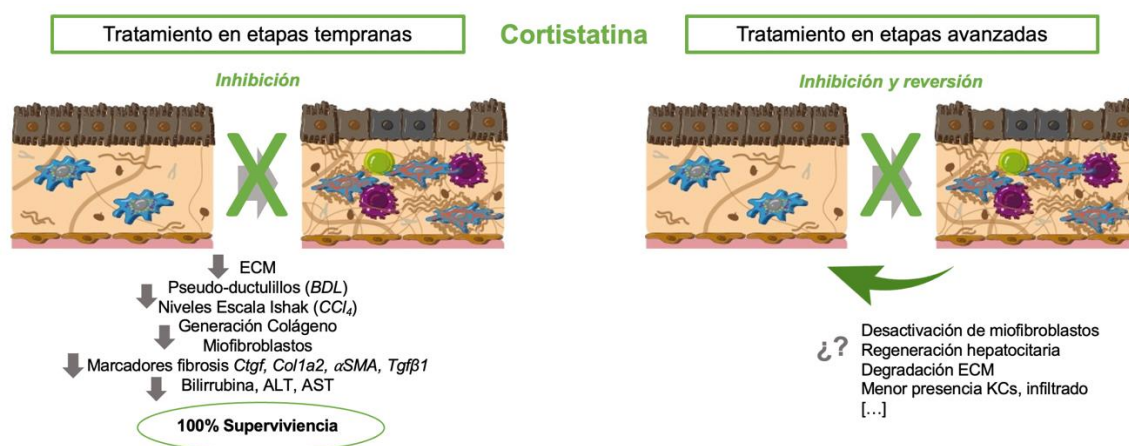


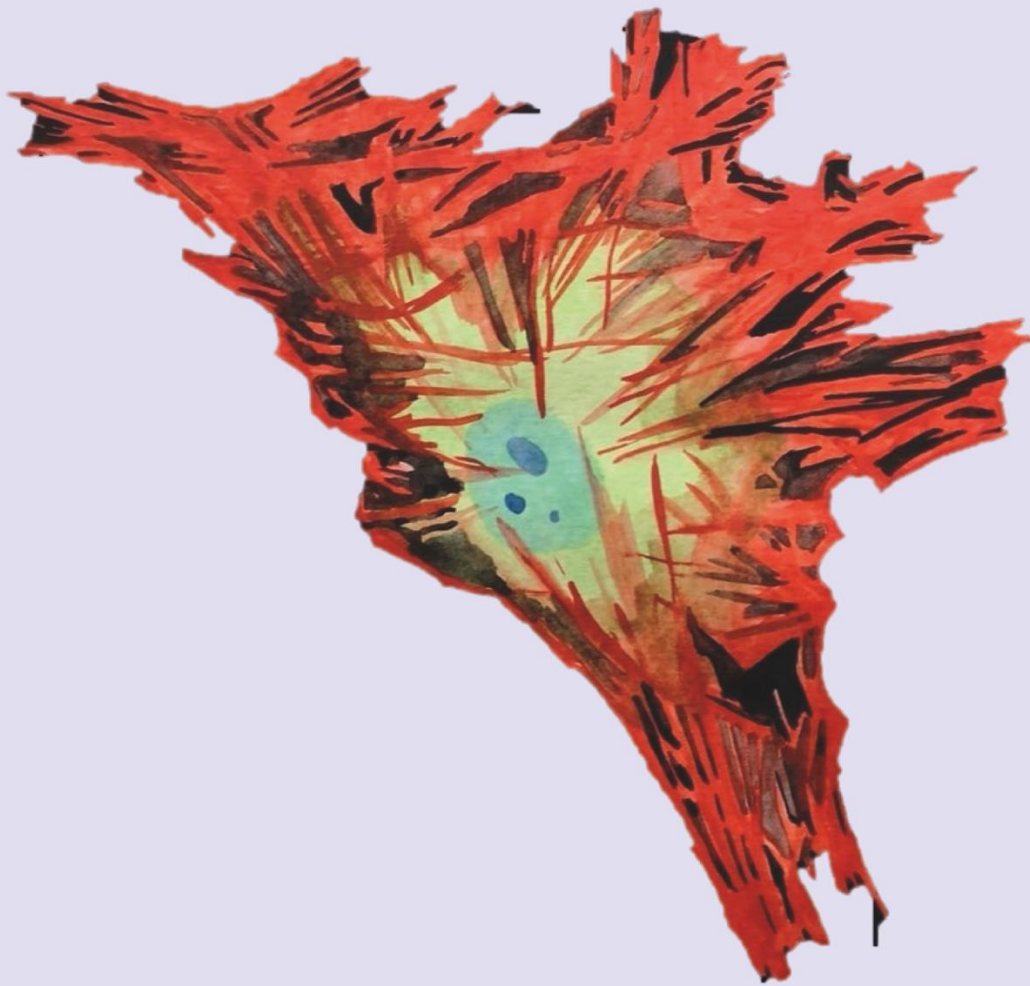
Figura 110. Administración de Cortistatina para el tratamiento temprano o avanzado de la fibrosis hepática.

El tratamiento con Cortistatina consiguió inhibir el avance de la fibrosis hepática en los modelos de daño tanto hepatotóxico como colestático cuando se administró tanto en etapas tempranas como avanzadas y se obtuvo un menor grado de daño tisular y la supervivencia de todos los ratones en ambos modelos. Además, Cortistatina logró revertir los daños tisulares generados por la fibrosis cuando se administró una vez ya establecida la respuesta fibrogénica, aunque queda aún por conocer a través de qué mecanismo estaría favoreciendo la resolución del proceso.

Actualmente, existen factores con potenciales efectos terapéuticos para la fibrosis hepática ya en fase de ensayos clínicos como Selonsertib¹²⁵ o los agonistas del receptor Farnesoid X¹³⁵ entre otros. Sin embargo, la mayoría de ellos se centran en el tratamiento de una u otra patología hepática asociada a la fibrosis y actúan sobre determinadas fases o factores concretos de la respuesta fibrogénica, en etapas tempranas de su desarrollo principalmente. Además, algunos tratamientos

presentan riesgos, como es el caso de Selonsertib, sobre el que se ha detectado un aumento de la susceptibilidad al desarrollo de hepatocarcinoma en ratones deficientes en ASK1¹²⁶. En cambio, el uso de una terapia anti-fibrótica basada en la administración de Cortistatina tiene otros numerosos puntos a favor. Por un lado, Cortistatina es un factor endógeno del que no se ha descrito ni observado ningún tipo de toxicidad generada por su administración, incluso con su re-administración a lo largo del tiempo. De hecho, el perfil de seguridad del tratamiento con Cortistatina es favorable en humanos y ya ha demostrado su eficacia clínica en el tratamiento de la enfermedad de Cushing²²⁶, de la acromegalia²²⁷. Por otro, además de la ya descrita actividad anti-inflamatoria^{164,176}, Cortistatina posee capacidad anti-fibrogénica como se ha demostrado, y puede actuar no sólo directamente sobre las células efectoras de la respuesta fibrogénica, sino también sobre el microambiente que las rodea, de tal forma que se estarían tratando varias etapas del desarrollo de la fibrosis y esto supondría una cualidad más con la que cuentan pocos de los fármacos que se están evaluando actualmente. Además, estudios previos han descrito el efecto terapéutico sobre las respuestas fibrogénicas de varios agonistas de los receptores que son reconocidos por Cortistatina, los receptores SSTR y GHSR^{187,189,191,225,228-230}. Estos datos sugieren que la unión de Cortistatina a ambas clases de receptor, podría permitir un efecto anti-fibrótico sinérgico más potente que cada uno de ellos por separado. Es importante resaltar que con la administración de Cortistatina desde tiempos cortos conseguimos evitar el daño tisular asociado al avance de la fibrosis hepática y con su administración más avanzada en el tiempo, una vez establecida la respuesta fibrogénica, no sólo conseguimos evitar el avance de la fibrosis sino también su reversión, lo que abre una gran ventana terapéutica donde pacientes con distintos grados de fibrosis hepática podrían ser tratados efectivamente. Y, aunque habría que realizar más estudios, el tratamiento con Cortistatina plantea incluso la existencia de opciones para aquellos pacientes desahuciados, que no tienen más opción que recibir un trasplante de hígado, pero éste no llega a tiempo. Y es que la administración de este neuropéptido, al poder evitar el avance e incluso revertir el daño fibrótico, podría hacerles ganar ese tiempo tan necesario hasta recibir el trasplante.

En cualquier caso, como se ha demostrado en esta tesis, los resultados obtenidos con el tratamiento con Cortistatina son realmente interesantes y prometedores en muchos aspectos, por lo que teniendo presentes todos estos puntos favorables descritos, Cortistatina surge como un candidato atractivo para el diseño de terapias anti-fibróticas para trastornos hepáticos crónicos de diferentes etiologías. Los siguientes pasos necesarios para su uso en terapia serían el estudio de bioseguridad en sujetos humanos, la evaluación de los efectos anti-fibróticos en una población pequeña de humanos y, finalmente, la evaluación de los efectos anti-fibróticos en una población heterogénea de mayor tamaño.



Acuarela
Raquel Benítez Ruiz

CONCLUSIONS/CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONS

1. The hepatic expression of the neuropeptide Cortistatin inversely correlates with the development of the fibrotic response in liver.
2. Endogenous Cortistatin deficiency predisposes to the development of incipient fibrogenic response in liver tissue during physiological aging.
3. Partial or total deficiency in Cortistatin promotes early and exacerbated development of clinical signs of tissue damage and increased mortality rate in animals subjected to experimental hepatotoxic- and cholestatic-induced liver fibrosis.
4. Cortistatin-deficient fibrogenic effector cells of the liver present a high state of activation and differentiation to myofibroblast, with a genetic profile compromised with the generation of extracellular matrix, the formation of actin fibers, the focal cell adhesion, and the expression of genes associated with muscle development and function.
5. Cortistatin treatment directly impairs the activation of hepatic fibrotic cells and their differentiation to myofibroblasts. Blockade of SSTR and GHSR1 in HSCs abolishes the inhibitory effect of Cortistatin in the fibrogenic response.
6. Early Cortistatin treatment prevents the development of the fibrogenic response in experimental models of toxic and cholestatic liver fibrosis and its administration in advanced stages reverses the fibrosis already established in both models.

7. CONCLUSIONES

1. Existe una correlación inversa entre la expresión hepática del neuropéptido Cortistatina y el desarrollo de la respuesta fibrogénica en el hígado.
2. La deficiencia endógena en Cortistatina predispone al desarrollo de una incipiente respuesta fibrogénica en el tejido hepático durante el envejecimiento fisiológico.
3. La deficiencia parcial o total en Cortistatina promueve el desarrollo temprano y exacerbado de signos clínicos de daño tisular y una mayor tasa de mortalidad en animales sometidos a fibrosis hepática experimental hepatotóxica y colestática.
4. Las células efectoras de la respuesta fibrogénica deficientes en Cortistatina en el hígado presentan un elevado estado de activación y diferenciación a miofibroblasto, con un perfil genético comprometido con la generación de matriz extracelular, la formación de fibras de actina, la adhesión focal celular, y la expresión de genes asociados al desarrollo y función muscular.
5. El tratamiento con Cortistatina altera directamente la activación de las células fibróticas hepáticas y su diferenciación a miofibroblastos. El bloqueo de SSTR y GHSR1 en HSC suprime el efecto inhibitorio de Cortistatina en la respuesta fibrogénica.
6. El tratamiento sistémico con Cortistatina administrado de forma temprana evita el desarrollo de la respuesta fibrogénica en modelos experimentales de fibrosis hepática tóxica y colestática y su administración en etapas avanzadas revierte la fibrosis ya establecida en ambos modelos.

1. Wynn, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.* **117**, 524 (2007).
2. Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M. et al. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *J. Hepatol.* **58**, 593–608 (2013).
3. Rockey, D. C., Darwin Bell, P. & Hill, J. A. Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1138–1149 (2015).
4. Bataller, R., North, K. E. & Brenner, D. A. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: A critical appraisal. *Hepatology* **37**, 493–503 (2003).
5. Walayat, S., Martin, D., Patel, J. et al. Role of albumin in cirrhosis: from a hospitalist’s perspective. *J Community Hosp Intern Med Perspect* **7**, 8–14. (2017).
6. Spinella, R., Sawhney, R. & Jalan, R. Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications. *Hepatol. Int.* **10**, 124–132 (2016).
7. Garcia-Martinez, R., Caraceni, P., Bernardi, M. et al. Albumin: Pathophysiologic basis of its role in the treatment of cirrhosis and its complications. *Hepatology* **58**, 1836–1846 (2013).
8. Gavira, C. M., Correa Arango, G. & Navas, N. M. Alcohol, cirrhosis, and genetic predisposition. *Rev. Colomb. Gastroenterol.* **31**, 27–35 (2016).
9. Li, Z. & Diehl, A. M. Innate immunity in the liver. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **19**, 565–571 (2003).
10. Kubes, P., Jenne, C. & Snyder, J. Immune Responses in the Liver. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 247–277 (2018).
11. Shuai, Z., Leung, M. W. Y., He, X. et al. Adaptive immunity in the liver. *Cell. Mol. Immunol.* **13**, 354–368 (2016).
12. Zheng, M. & Tian, Z. Liver-Mediated Adaptive Immune Tolerance. *Front. Immunol.* **10**, 2525 (2019).
13. Kruepunga, N., Hakvoort, T. B. M., Hikspoors, J. P. J. M. et al. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1865**, 869–878 (2019).
14. Abdel-Misih, S. R. Z. & Bloomston, M. Liver Anatomy. *Surg. Clin. North Am.* **90**, 643–653 (2010).
15. Bogdanos, D. P., Gao, B. & Gershwin, M. E. Liver immunology. *Compr. Physiol.* **3**, 567–598 (2013).
16. Boyer, J. L. Bile formation and secretion. *Compr. Physiol.* **3**, 1035–1078 (2013).
17. Cai, X., Wang, J., Wang, J. et al. Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: New insights into therapy. *Pharmacol. Res.* **155**, (2020).
18. Zhou, W. C., Zhang, Q. B. & Qiao, L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* **20**, 7312–7324 (2014).
19. Nolan, J. P. Endotoxin, reticuloendothelial function, and liver injury. *Hepatology* **1**, 458–465 (1981).
20. Fausto, N., Laird, A. & Webber, E. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.* **9**, 1527–1536 (1995).
21. Chen, Y. & Tian, Z. Innate lymphocytes: pathogenesis and therapeutic targets of liver diseases and cancer. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 57–72 (2021).
22. Crawford, J. M. & Burt, A. D. Anatomy, pathophysiology and basic mechanisms of disease. in *MacSween’s Pathology of the Liver* 1–77 (2012).
23. Strange, R. C. Hepatic bile flow. *Physiol. Rev.* **64**, 1055–1102 (1984).
24. Häussinger, D. & Kordes, C. Space of Disse: A stem cell niche in the liver. *Biol. Chem.* **401**, (2019).
25. Sibulesky, L. Anatomía normal del hígado. *Clin. Liver Dis.* **2**, S61S-S63S (2013).
26. Housset, C., Chrétien, Y., Debray, D. et al. Functions of the Gallbladder. *Compr. Physiol.* **6**, 1549–1577 (2016).

27. Panther, E., Spangenberg, H., Neumann-Haefelin, C. et al. [The role of the virus specific T-cell response in acute and chronic HBV and HCV infection]. *Z. Gastroenterol.* **42**, 39–46 (2004).
28. Billerbeck, E., Böttler, T. & Thimme, R. Regulatory T cells in viral hepatitis. *World J. Gastroenterol.* **13**, 4858 (2007).
29. Lackner, C. & Tiniakos, D. Fibrosis and alcohol-related liver disease. *J. Hepatol.* **70**, 294–304 (2019).
30. Lieber, C. S. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* **34**, 9–19 (2004).
31. Bataller, R. & Brenner, D. A. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* **115**, 209–218 (2005).
32. Kisseleva, T. The origin of fibrogenic myofibroblasts in fibrotic liver. *Hepatology* **65**, 1039–1043 (2017).
33. Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M. et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, (2014).
34. Mederacke, I., Hsu, C. C., Troeger, J. S. et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat. Commun.* **4**, 1–11 (2013).
35. Beaussier, M., Wendum, D., Schiffer, E. et al. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Lab. Invest.* **87**, 292–303 (2007).
36. Tuchweber, B., Desmoulière, A., Bochaton-Piallat, M. et al. Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab. Investig.* **74**, 265–278 (1996).
37. Karin, D., Koyama, Y., Brenner, D. et al. The Characteristics of Activated Portal Fibroblasts / Myofibroblasts in Liver Fibrosis. *Differentiation* **92**, 84–92 (2016).
38. Dranoff, J. A., Kruglov, E. A., Toure, J. et al. Ectonucleotidase NTPDase2 is selectively down-regulated in biliary cirrhosis. *J. Investig. Med.* **52**, 475–482 (2004).
39. Lua, I., Li, Y., Zagory, J. et al. Characterization of hepatic stellate cells, portal fibroblasts, and mesothelial cells in normal and fibrotic livers. *J. Hepatol.* **64**, 1137–1146 (2016).
40. Zhao, Y. L., Zhu, R. T. & Sun, Y. L. Epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis. *Biomed. Reports* **4**, 269–274 (2016).
41. Scholten, D., Reichart, D., Paik, Y. et al. Migration of fibrocytes in fibrogenic liver injury. *Am. J. Pathol.* **179**, 189–198 (2011).
42. Kisseleva, T., Uchinami, H., Feirt, N. et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J. Hepatol.* **45**, 429–438 (2006).
43. Kisseleva, T., Cong, M., Paik, Y. H. et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 9448–9453 (2012).
44. Iredale, J. P., Benyon, R. C. & Pickering, J. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* **102**, 538–549 (1998).
45. Troeger, J. S., Mederacke, I., Gwak, G. Y. et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology* **143**, (2012).
46. Wake, K. Karl Wilhelm Kupffer And His Contributions To Modern Hepatology. *Comp. Hepatol.* **3**, S2 (2004).
47. Chang, M. L. & Yang, S. S. Metabolic Signature of Hepatic Fibrosis: From Individual Pathways to Systems Biology. *Cells* **8**, (2019).
48. Enzan, H., Hayashi, Y., Miyazaki, E. et al. Morphological Aspects of Hepatic Fibrosis and Ito Cells (Hepatic Stellate Cells), with Special Reference to Their Myofibroblastic Transformation. *Liver Dis. Hepatic Sinusoidal Cells* 219–231 (1999).

49. Friedman, S. L. Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* **88**, 125–172 (2008).
50. Nallagangula, K. S., Nagaraj, S. K., Venkataswamy, L. et al. Liver fibrosis: A compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. *Futur. Sci. OA* **4**, (2018).
51. Kendall, T. J., Henedige, S., Aucott, R. L. et al. p75 Neurotrophin receptor signaling regulates hepatic myofibroblast proliferation and apoptosis in recovery from rodent liver fibrosis. *Hepatology* **49**, 901–910 (2009).
52. Friedman, S. L., Rockey, D. C., McGuire, R. F. et al. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology* **15**, 234–243 (1992).
53. Puche, J. E., Saiman, Y. & Friedman, S. L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr. Physiol.* **3**, 1473–1492 (2013).
54. Ramadori, G., Neubauer, K., Odenthal, M. et al. The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells of rat liver and is downregulated during cell growth and by transforming growth factor- β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 739–742 (1992).
55. Yamada, T., Imaoka, S., Kawada, N. et al. Expression of cytochrome P450 isoforms in rat hepatic stellate cells. *Life Sci.* **61**, 171–179 (1997).
56. Rockey, D. C. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin. Liver Dis.* **21**, 337–349 (2001).
57. Bauer, M., Bauer, I., Sonin, N. V. et al. Functional significance of endothelin B receptors in mediating sinusoidal and extrasinusoidal effects of endothelins in the intact rat liver. *Hepatology* **31**, 937–947 (2000).
58. Rockey, D. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* **37**, 4–12 (2003).
59. Bellanti, F., Sastre, J. & Serviddio, G. Reactive Oxygen Species (ROS) and Liver Disease Therapy. *Syst. Biol. Free Radicals Antioxidants* 1809–1838 (2014).
60. Zhan, S., Jiang, J., Wu, J. et al. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology* **43**, 435–443 (2006).
61. Han, H., Desert, R., Das, S. et al. Danger signals in liver injury and restoration of homeostasis. *J. Hepatol.* **73**, 933 (2020).
62. Tan, Z., Liu, Q., Jiang, R. et al. Interleukin-33 drives hepatic fibrosis through activation of hepatic stellate cells. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 388–398 (2018).
63. Caparrós, E. & Francés, R. The Interleukin-20 Cytokine Family in Liver Disease. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
64. Tan, Z., Qian, X., Jiang, R. et al. IL-17A Plays a Critical Role in the Pathogenesis of Liver Fibrosis through Hepatic Stellate Cell Activation. *J. Immunol.* **191**, 1835–1844 (2013).
65. Crespo Yanguas, S., Cogliati, B., Willebrords, J. et al. Experimental models of liver fibrosis. in *Archives of Toxicology* vol. 90 1025–1048 (Springer Verlag, 2016).
66. Tsuchida, T. & Friedman, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 397–411 (2017).
67. Kolios, G., Valatas, V. & Kouroumalis, E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J. Gastroenterol.* **12**, 7413–7420 (2006).
68. Winwood, P. J., Schuppan, D., Iredale, J. P. et al. Kupffer cell-derived 95-kd type IV collagenase/gelatinase B: Characterization and expression in cultured cells. *Hepatology* **22**, 304–315 (1995).
69. Li, H., You, H., Fan, X. et al. Hepatic macrophages in liver fibrosis: pathogenesis and potential therapeutic targets. *BMJ Open Gastroenterol.* **3**, e000079 (2016).

70. Matsuda, M. & Seki, E. Hepatic Stellate Cell–Macrophage Crosstalk in Liver Fibrosis and Carcinogenesis. *Semin. Liver Dis.* **40**, 307–320 (2020).
71. Bansal, R., van Baarlen, J., Storm, G. et al. The interplay of the Notch signaling in hepatic stellate cells and macrophages determines the fate of liver fibrogenesis. *Sci. Rep.* **5**, 1–12 (2015).
72. Park, S. M. The Crucial Role of Cholangiocytes in Cholangiopathies. *Gut Liver* **6**, 295 (2012).
73. Higashi, T., Friedman, S. L. & Hoshida, Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **121**, 27–42 (2017).
74. Chen, M., Liu, J., Yang, W. et al. Lipopolysaccharide mediates hepatic stellate cell activation by regulating autophagy and retinoic acid signaling. *Autophagy* **13**, 1813–1827 (2017).
75. Rockey, D. C. Hepatic Fibrosis, Stellate Cells, and Portal Hypertension. *Clin. Liver Dis.* **10**, 459–479 (2006).
76. Kikuchi, A., Pradhan-Sundd, T., Singh, S. et al. Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Contributes to Human Hepatic Stellate Cell Proliferation and Migration. *Am. J. Pathol.* **187**, 2273–2287 (2017).
77. Kinnman, N., Gorla, O., Wendum, D. et al. Hepatic stellate cell proliferation is an early platelet-derived growth factor-mediated cellular event in rat cholestatic liver injury. *Lab. Invest.* **81**, 1709–1716 (2001).
78. Borkham-Kamphorst, E. & Weiskirchen, R. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. *Cytokine and Growth Factor Reviews* vol. 28 53–61 (2016).
79. Qian, Y., Han, J., Zhou, L. et al. Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Reduces Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Activation and Inflammatory Cytokines in Hepatic Stellate Cells In Vitro. *Med. Sci. Monit.* **24**, 5533 (2018).
80. Seitz, T., Freese, K., Dietrich, P. et al. Fibroblast Growth Factor 9 is expressed by activated hepatic stellate cells and promotes progression of hepatocellular carcinoma. *Sci. Reports 2020 101* **10**, 1–9 (2020).
81. Lee, K. S., Buck, M., Houglum, K. et al. Activation of hepatic stellate cells by TGF α and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J. Clin. Invest.* **96**, 2461–2468 (1995).
82. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B. et al. Myofibroblasts and mechano: Regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 349–363 (2002).
83. Stempien-Otero, A., Kim, D. H. & Davis, J. Molecular networks underlying myofibroblast fate and fibrosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **97**, 153–161 (2016).
84. Gressner, O. A. & Gressner, A. M. Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases. *Liver Int.* **28**, 1065–1079 (2008).
85. Lipson, K. E., Wong, C., Teng, Y. et al. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, S24 (2012).
86. Hasegawa, D., Wallace, M. C. & Friedman, S. L. Chapter 4 - Stellate Cells and Hepatic Fibrosis. in *Stellate Cells in Health and Disease* 41–62 (Elsevier Inc., 2015).
87. Lachowski, D., Cortes, E., Rice, A. et al. Matrix stiffness modulates the activity of MMP-9 and TIMP-1 in hepatic stellate cells to perpetuate fibrosis. *Sci. Reports 2019 91* **9**, 1–9 (2019).
88. Murphy, F. R., Issa, R., Zhou, X. et al. Inhibition of Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells by Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Is Mediated via Effects on Matrix Metalloproteinase Inhibition: Implications for reversibility of liver fibrosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 11069–11076 (2002).
89. Marra, F., Romanelli, R. G., Giannini, C. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* **29**, 140–148 (1999).
90. Iredale, J. P. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin. Liver Dis.* **21**,

- 427–436 (2001).
91. Schrader, J., Fallowfield, J. & Iredale, J. P. Senescence of activated stellate cells: not just early retirement. *Hepatology* **49**, 1045–1047 (2009).
 92. Singh, H. D., Otano, I., Rombouts, K. et al. TRAIL regulatory receptors constrain human hepatic stellate cell apoptosis. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
 93. Saile, B., Knittel, T., Matthes, N. et al. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am. J. Pathol.* **151**, 1265 (1997).
 94. de Oliveira da Silva, B., Ramos, L. F. & Moraes, K. C. M. Molecular interplays in hepatic stellate cells: apoptosis, senescence, and phenotype reversion as cellular connections that modulate liver fibrosis. *Cell Biol. Int.* **41**, 946–959 (2017).
 95. Song, G., Pacher, M., Balakrishnan, A. et al. Direct Reprogramming of Hepatic Myofibroblasts into Hepatocytes in Vivo Attenuates Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell* **18**, 797–808 (2016).
 96. Eyden, B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 22–37 (2008).
 97. Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J. & Al, E. The myofibroblast: One function, multiple origins. *Am. J. Pathol.* **170**, 1807–1816 (2007).
 98. Hinz, B. The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *J. Biomech.* **43**, 146–155 (2010).
 99. Reynaert, H., Thompson, M. G., Thomas, T. & Geerts, A. Hepatic stellate cells: Role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* **50**, 571–581 (2002).
 100. Hinz, B. The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr. Res. Transl. Med.* **64**, 171–177 (2016).
 101. Walraven, M. & Hinz, B. Therapeutic approaches to control tissue repair and fibrosis: Extracellular matrix as a game changer. *Matrix Biol.* **71–72**, 205–224 (2018).
 102. Wight, T. N. & Potter-Perigo, S. The extracellular matrix: An active or passive player in fibrosis? *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **301**, G950 (2011).
 103. Arthur, M. J. P. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* vol. 279 (2000).
 104. Sengupta, M., Abuirqeba, S., Kameric, A. et al. A two-hit model of alcoholic liver disease that exhibits rapid, severe fibrosis. *PLoS One* **16**, e0249316 (2021).
 105. Scholten, D., Trebicka, J. & Liedtke, C. The carbon tetrachloride model in mice. *Lab. Anim.* **49**, 4–11 (2015).
 106. Wallace, M. C., Hamesch, K., Lunova, M. et al. Standard Operating Procedures in Experimental Liver Research: Thioacetamide model in mice and rats. *Lab Anim* **49**(, 21–9 (2015).
 107. Chooi, K. F., Rajendran, D. B. K., Phang, S. S. G. et al. The Dimethylnitrosamine Induced Liver Fibrosis Model in the Rat. *J. Vis. Exp.* **2016**, (2016).
 108. Tag, C. G., Sauer-Lehnen, S., Weiskirchen, S. et al. Bile Duct Ligation in Mice: Induction of Inflammatory Liver Injury and Fibrosis by Obstructive Cholestasis. *J. Vis. Exp.* **96**, 52438 (2015).
 109. Zhong, F., Zhou, X., Xu, J. et al. Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Digestion* **101**, 522–535 (2020).
 110. Oligschlaeger, Y. & Shiri-Sverdlov, R. NAFLD Preclinical Models: More than a Handful, Less of a Concern? *Biomedicines* **8**, (2020).
 111. Manautou, J. E., Campion, S. N. & Aleksunes, L. M. Regulation of Hepatobiliary Transporters during Liver Injury. in *Comprehensive Toxicology, Second Edition* vol. 9 175–220 (Elsevier Inc., 2010).
 112. Takahashi, Y. & Fukusato, T. Animal Models of Liver Diseases. in *Animal Models for the Study of*

- Human Disease: Second Edition* 313–339 (Elsevier Inc., 2017).
113. Xu, L., Hui, A. Y., Albanis, E. et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: New tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* **54**, 142–151 (2005).
 114. Michalopoulos, G. K. Liver Regeneration. (2007).
 115. Stanger, B. Z. Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. *Annu. Rev. Physiol.* **77**, 179–200 (2015).
 116. Michalopoulos, G. K., Barua, L. & Bowen, W. C. Transdifferentiation of Rat Hepatocytes Into Biliary Cells After Bile Duct Ligation and Toxic Biliary Injury. *Hepatology* **41**, 535–44 (2005).
 117. Michalopoulos, G. K. Advances in liver regeneration. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 897–907 (2014).
 118. Lefkowitz, J. H. Liver Biopsy Assessment in Chronic Hepatitis. *Arch. Med. Res.* **38**, 634–643 (2007).
 119. Apte, M. V. & Wilson, J. S. Mechanisms of pancreatic fibrosis. *Dig. Dis.* **22**, 273–279 (2004).
 120. Páramo Hernández, D. B., Regino, W. O. & Pineda Ovalle, L. F. *Fibrogénesis hepática: Hepatic fibrogenesis*. (2010).
 121. Vinaixa, C., Rubín, A., Aguilera, V. et al. Recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Ann. Gastroenterol. Q. Publ. Hell. Soc. Gastroenterol.* **26**, 304 (2013).
 122. Mossanen, J. C., Krenkel, O., Ergen, C. et al. Chemokine (C-C motif) receptor 2-positive monocytes aggravate the early phase of acetaminophen-induced acute liver injury. *Hepatology* **64**, 1667–1682 (2016).
 123. Marra, F. & Tacke, F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* **147**, (2014).
 124. Imajo, K., Kessoku, T., Honda, Y. et al. Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. *Gastroenterology* **150**, 626-637.e7 (2016).
 125. Loomba, R., Lawitz, E., Mantry, P. S. et al. The ASK1 inhibitor selonsertib in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, phase 2 trial. *Hepatology* **67**, 549–559 (2018).
 126. Nakagawa, H., Hirata, Y., Takeda, K. et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibits hepatocarcinogenesis by controlling the tumor-suppressing function of stress-activated mitogen-activated protein kinase. *Hepatology* **54**, 185–195 (2011).
 127. Harrison, S. A., Abdelmalek, M. F., Caldwell, S. et al. Simtuzumab Is Ineffective for Patients With Bridging Fibrosis or Compensated Cirrhosis Caused by Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **155**, 1140–1153 (2018).
 128. Barreyro, F. J., Holod, S., Finocchietto, P. V. et al. The pan-caspase inhibitor Emricasan (IDN-6556) decreases liver injury and fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* **35**, 953–966 (2015).
 129. Pockros, P. J., Schiff, E. R., Shiffman, M. L. et al. Oral IDN-6556, an antiapoptotic caspase inhibitor, may lower aminotransferase activity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **46**, 324–329 (2007).
 130. Shiffman, M. L., Pockros, P., McHutchison, J. G. et al. Clinical trial: the efficacy and safety of oral PF-03491390, a pancaspase inhibitor - a randomized placebo-controlled study in patients with chronic hepatitis C. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **31**, 969–978 (2010).
 131. Shiffman, M., Freilich, B., Vuppalanchi, R. et al. LP37 : A placebo-controlled, multicenter, double-blind, randomised trial of emricasan in subjects with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and raised transaminases. *J. Hepatol.* **62**, S282 (2015).
 132. Di Sario, A., Bendia, E., Svegliati Baroni, G. et al. Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production. *J. Hepatol.* **37**, 584–591 (2002).

133. Budas, G., Karnik, S., Jonnson, T. et al. Reduction of Liver Steatosis and Fibrosis with an Ask1 Inhibitor in a Murine Model of Nash is Accompanied by Improvements in Cholesterol, Bile Acid and Lipid Metabolism. *J. Hepatol.* **64**, S170 (2016).
134. Flores-Contreras, L., Sandoval-Rodríguez, A. S., Mena-Enriquez, M. G. et al. Treatment with pirfenidone for two years decreases fibrosis, cytokine levels and enhances CB2 gene expression in patients with chronic hepatitis C. *BMC Gastroenterol.* **14**, (2014).
135. Lindor, K. D. Farnesoid X receptor agonists for primary biliary cirrhosis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **27**, 285–288 (2011).
136. Alvarez-Sola, G., Uriarte, I., Latasa, M. U. et al. Fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19) protects from diet-induced hepatic steatosis: development of an FGF19-based chimeric molecule to promote fatty liver regeneration. *Gut* **66**, 1818–1828 (2017).
137. Nicholes, K., Guillet, S., Tomlinson, E. et al. A mouse model of hepatocellular carcinoma: ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **160**, 2295–2307 (2002).
138. Zhou, M., Yang, H., Learned, R. M. et al. Non-cell-autonomous activation of IL-6/STAT3 signaling mediates FGF19-driven hepatocarcinogenesis. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
139. Fu, J., Oveisi, F., Gaetani, S. et al. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology* **48**, 1147–1153 (2005).
140. Toyama, T., Nakamura, H., Harano, Y. et al. PPARalpha ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 697–704 (2004).
141. Bae, M. A., Rhee, S. D., Jung, W. H. et al. Selective inhibition of activated stellate cells and protection from carbon tetrachloride-induced liver injury in rats by a new PPARgamma agonist KR62776. *Arch. Pharm. Res.* **33**, 433–442 (2010).
142. Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V. et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1675–1685 (2010).
143. Cusi, K., Orsak, B., Bril, F. et al. Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial. *Ann. Intern. Med.* **165**, 305–315 (2016).
144. Verzijl, C. R. C., Van De Peppel, I. P., Struik, D. et al. Pegbelfermin (BMS-986036): an investigational PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Opin. Investig. Drugs* **29**, 125–133 (2020).
145. Sanyal, A., Charles, E. D., Neuschwander-Tetri, B. A. et al. Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Lancet* **392**, 2705–2717 (2019).
146. Bhattacharya, D., Basta, B., Mato, J. M. et al. Aramchol downregulates stearyl CoA-desaturase 1 in hepatic stellate cells to attenuate cellular fibrogenesis. *JHEP reports Innov. Hepatol.* **3**, (2021).
147. Loomba, R., Kayali, Z., Noureddin, M. et al. GS-0976 Reduces Hepatic Steatosis and Fibrosis Markers in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **155**, 1463-1473.e6 (2018).
148. Chalasani, N., Abdelmalek, M. F., Garcia-Tsao, G. et al. Effects of Belaepectin, an Inhibitor of Galectin-3, in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis With Cirrhosis and Portal Hypertension. *Gastroenterology* **158**, 1334-1345.e5 (2020).
149. Harrison, S. A., Bashir, M. R., Guy, C. D. et al. Resmetirom (MGL-3196) for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* **394**, 2012–2024 (2019).
150. Yokohama, S., Yoneda, M., Haneda, M. et al. Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **40**, 1222–1225 (2004).
151. Georgescu, E. F., Ionescu, R., Niculescu, M. et al. Angiotensin-receptor blockers as therapy for mild-

- to-moderate hypertension-associated non-alcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* **15**, 942–954 (2009).
152. Abdel Salam, S., A. H. Adan, R., Alba, F. et al. *Neuropeptides : methods and protocols*. (Humana Press, 2011). doi:10.1007/978-1-61779-310-3.
153. Gonzalez-Rey, E., Delgado-Maroto, V., Souza-Moreira, L. et al. Neuropeptides as Therapeutic Approach to Autoimmune Diseases. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3158–3172 (2010).
154. De Lecea, L., Criado, J. R., Prospero-Garcia, Ó. et al. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* **381**, 242–245 (1996).
155. Spier, A. D. & De Lecea, L. Cortistatin: A member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Res. Rev.* **33**, 228–241 (2000).
156. De Lecea, L., Ruiz-Lozano, P., Danielson, P. E. et al. Cloning, mRNA expression, and chromosomal mapping of mouse and human preprocortistatin. *Genomics* **42**, 499–506 (1997).
157. CORT cortistatin [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=1325>.
158. Cort cortistatin [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=12854>.
159. Hökfelt, T., Broberger, C., Xu, Z. Q. D. et al. Neuropeptides - An overview. *Neuropharmacology* **39**, 1337–1356 (2000).
160. de Lecea, L. Cortistatin—Functions in the central nervous system. *Mol. Cell. Endocrinol.* **286**, 88–95 (2008).
161. Ibáñez-Costa, A., Luque, R. M. & Castaño, J. P. Cortistatin: A new link between the growth hormone/prolactin axis, stress, and metabolism. *Growth Horm. IGF Res.* **33**, 23–27 (2017).
162. Gonzalez-Rey, E., Pedreño, M., Delgado-Maroto, V. et al. Lulling immunity, pain, and stress to sleep with cortistatin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1351**, 89–98 (2015).
163. Dalm, V. A., Van Hagen, P. M., de Krijger, R. R. et al. Distribution pattern of somatostatin and cortistatin mRNA in human central and peripheral tissues. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **60**, 625–629 (2004).
164. Gonzalez-Rey, E. & Delgado, M. Emergence of cortistatin as a new immunomodulatory factor with therapeutic potential in immune disorders. *Mol. Cell. Endocrinol.* **286**, 135–140 (2008).
165. Gottero, C., Prodam, F., Destefanis, S. et al. Cortistatin-17 and -14 exert the same endocrine activities as somatostatin in humans. *Growth Horm. IGF Res.* **14**, 382–387 (2004).
166. Siehler, S., Nunn, C., Hannon, J. et al. Pharmacological profile of somatostatin and cortistatin receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **286**, 26–34 (2008).
167. De Lecea, L. & Castaño, J. P. Cortistatin: Not just another somatostatin analog. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2**, 356–357 (2006).
168. van Hagen, P. M., Dalm, V. A., Staal, F. et al. The role of cortistatin in the human immune system. *Mol. Cell. Endocrinol.* **286**, 141–147 (2008).
169. Fukusumi, S., Kitada, C., Takekawa, S. et al. Identification and characterization of a novel human cortistatin-like peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 157–163 (1997).
170. Patel, Y. C. General Aspects of the Biology and Function of Somatostatin. In: Somatostatin. *Basic Clin. Asp. Neurosci.* **4**, 1–16 (1992).
171. Cassoni, P., Muccioli, G., Marrocco, T. et al. Cortistatin-14 inhibits cell proliferation of human thyroid carcinoma cell lines of both follicular and parafollicular origin. *J. Endocrinol. Invest.* **25**, 362–368 (2002).
172. Mear, Y., Enjalbert, A. & Thirion, S. GHS-R1a constitutive activity and its physiological relevance. *Front. Neurosci.* **7**, (2013).

173. Robas, N., Mead, E. & Fidock, M. MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J. Biol. Chem.* **278**, 44400–44404 (2003).
174. Allia, E., Tarabra, E., Volante, M. et al. Expression of cortistatin and MrgX2, a specific cortistatin receptor, in human neuroendocrine tissues and related tumours. *J. Pathol.* **207**, 336–345 (2005).
175. Broglio, F., Grottoli, S., Arvat, E. et al. Endocrine actions of cortistatin: In vivo studies. *Mol. Cell. Endocrinol.* **286**, 123–127 (2008).
176. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Robledo, G. et al. Cortistatin, a new antiinflammatory peptide with therapeutic effect on lethal endotoxemia. *J. Exp. Med.* **203**, 563–571 (2006).
177. Gonzalez-Rey, E., Varela, N., Sheibanie, A. F. et al. Cortistatin, an antiinflammatory peptide with therapeutic action in inflammatory bowel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4228–4233 (2006).
178. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Del Moral, R. G. et al. Therapeutic effect of cortistatin on experimental arthritis by downregulating inflammatory and Th1 responses. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 582–588 (2007).
179. Delgado-Maroto, V., Falo, C. P., Forte-Lago, I. et al. The neuropeptide cortistatin attenuates experimental autoimmune myocarditis via inhibition of cardiomyogenic T cell-driven inflammatory responses. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 267–280 (2017).
180. Delgado-Maroto, V., Benitez, R., Forte-Lago, I. et al. Cortistatin reduces atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE-deficient mice and the formation of foam cells. *Sci. Rep.* **7**, 1–15 (2017).
181. Souza-Moreira, L., Morell, M., Delgado-Maroto, V. et al. Paradoxical effect of cortistatin treatment and its deficiency on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **191**, 2144–2154 (2013).
182. Wang, M., Gong, Q., Zhang, J. et al. Characterization of gene expression profiles in HBV-related liver fibrosis patients and identification of ITGBL1 as a key regulator of fibrogenesis. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
183. Mas, V. R., Maluf, D. G., Archer, K. J. et al. Genes involved in viral carcinogenesis and tumor initiation in hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Mol. Med.* **15**, 85–94 (2009).
184. Moylan, C. A., Pang, H., Dellinger, A. et al. Hepatic gene expression profiles differentiate presymptomatic patients with mild versus severe nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **59**, 471–482 (2014).
185. Bessho, K., Mourya, R., Shivakumar, P. et al. Gene expression signature for biliary atresia and a role for interleukin-8 in pathogenesis of experimental disease. *Hepatology* **60**, 211–223 (2014).
186. Koca, S. S., Ozgen, M., Sarikaya, M. et al. Ghrelin prevents the development of dermal fibrosis in bleomycin-induced scleroderma. *Clin. Exp. Dermatol.* **39**, 176–181 (2014).
187. Moreno, M., Chaves, J. F., Sancho-Bru, P. et al. Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans. *Hepatology* **51**, 974–985 (2010).
188. Crestani, B., Chapron, J., Wallaert, B. et al. Octreotide treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a proof-of-concept study. *Eur. Respir. J.* **39**, 772–775 (2012).
189. Borie, R., Fabre, A., Prost, F. et al. Activation of somatostatin receptors attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax* **63**, 251–258 (2008).
190. Wang, J., Wang, L., Song, G. et al. The mechanism through which octreotide inhibits hepatic stellate cell activity. *Mol. Med. Rep.* **7**, 1559–1564 (2013).
191. Cetin, E., Kanbur, M., Cetin, N. et al. Hepatoprotective effect of ghrelin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Regul. Pept.* **171**, 1–5 (2011).
192. Duran-Prado, M., Morell, M., Delgado-Maroto, V. et al. Cortistatin inhibits migration and proliferation of human vascular smooth muscle cells and decreases neointimal formation on carotid

- artery ligation. *Circ. Res.* **112**, 1444–1455 (2013).
193. Antoniu, S. A. Somatostatin analogs for idiopathic pulmonary fibrosis therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs* **17**, 1137–1140 (2008).
 194. Córdoba-Chacón, J., Gahete, M. D., Pozo-Salas, A. I. et al. Cortistatin is not a somatostatin analogue but stimulates prolactin release and inhibits GH and ACTH in a gender-dependent fashion: Potential role of ghrelin. *Endocrinology* **152**, 4800–4812 (2011).
 195. Standish, R. A., Cholongitas, E., Dhillon, A. et al. An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut* **55**, 569–578 (2006).
 196. Goodman, Z. D. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases q. *J Hepatol* **47**, 598–607 (2007).
 197. Maschmeyer, P., Flach, M. & Winau, F. Seven steps to stellate cells. *J. Vis. Exp.* **10**, 2710 (2011).
 198. Weiskirchen, S., Tag, C. G., Sauer-Lehnen, S. et al. Isolation and culture of primary murine hepatic stellate cells. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1627 165–191 (Humana Press Inc., 2017).
 199. Shendure, J. & Ji, H. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1135–1145 (2008).
 200. Andrés-León, E., Núñez-Torres, R. & Rojas, A. M. miARma-Seq: a comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis. *Sci. Reports 2016 61* **6**, 1–8 (2016).
 201. Kim, D., Langmead, B. & Salzberg, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods 2015 124* **12**, 357–360 (2015).
 202. Nikolayeva, O. & Robinson, M. D. edgeR for differential RNA-seq and ChIP-seq analysis: an application to stem cell biology. *Methods Mol. Biol.* **1150**, 45–79 (2014).
 203. Reeb, P. D., Bramardi, S. J. & Steibel, J. P. Assessing Dissimilarity Measures for Sample-Based Hierarchical Clustering of RNA Sequencing Data Using Plasmode Datasets. *PLoS One* **10**, e0132310 (2015).
 204. Yu, G., Wang, L. G., Han, Y. et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* **16**, 284–287 (2012).
 205. Hernandez-Gea, V. & Friedman, S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **6**, 425–456 (2011).
 206. Barriga, M., Benitez, R., Ferraz-de-Paula, V. et al. Protective role of cortistatin in pulmonary inflammation and fibrosis. *Br. J. Pharmacol.* **178**, 4368–4388 (2021).
 207. Jordan, V. K., Zaveri, H. P. & Scott, D. A. 1p36 deletion syndrome: An update. *Appl. Clin. Genet.* **8**, 189–200 (2015).
 208. Barriga, M., Benitez, R., Robledo, G. et al. The neuropeptide Cortistatin regulates Dermal and Pulmonary Fibrosis in an experimental model of Systemic Sclerosis. *Neuroendocrinology* (2021).
 209. Single cell type - CORT - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000241563-CORT/single+cell+type/liver>.
 210. Karlsson, M., Zhang, C., Méar, L. et al. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci. Adv.* **7**, (2021).
 211. MYOG Gene - GeneCards | MYOG Protein | MYOG Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYOG&keywords=myog>.
 212. MYMK Gene - GeneCards | MYMK Protein | MYMK Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYMK&keywords=mymk>.
 213. MYOD1 Gene - GeneCards | MYOD1 Protein | MYOD1 Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYOD1&keywords=myod1>.
 214. MSTN Gene - GeneCards | GDF8 Protein | GDF8 Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MSTN&keywords=mstn>.

215. CHRND cholinergic receptor nicotinic delta subunit [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1144>.
216. CHRND Gene - GeneCards | ACHD Protein | ACHD Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHRND&keywords=chrnd>.
217. CHRNG cholinergic receptor nicotinic gamma subunit [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1146>.
218. CHRNG Gene - GeneCards | ACHG Protein | ACHG Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHRNG&keywords=chrng>.
219. CA3 Gene - GeneCards | CAH3 Protein | CAH3 Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CA3&keywords=car3>.
220. Feng, H. Z. & Jin, J. P. Carbonic anhydrase III is expressed in mouse skeletal muscles independent of fiber type-specific myofilament protein isoforms and plays a role in fatigue resistance. *Front. Physiol.* **7**, 597 (2016).
221. Kosar, K., Cornuet, P., Singh, S. et al. WNT7B Regulates Cholangiocyte Proliferation and Function During Murine Cholestasis. *Hepatology. Commun.* **0**, 2021 (2021).
222. Moles, A., Tarrats, N., Morales, A. et al. Acidic sphingomyelinase controls hepatic stellate cell activation and in vivo liver fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* **177**, 1214–1224 (2010).
223. Moles, A., Tarrats, N., Fernández-Checa, J. C. et al. Cathepsins B and D drive hepatic stellate cell proliferation and promote their fibrogenic potential. *Hepatology* **49**, 1297–1307 (2009).
224. Moles, A., Tarrats, N., Fernández-Checa, J. C. et al. Cathepsin B overexpression due to acid sphingomyelinase ablation promotes liver fibrosis in Niemann-Pick disease. *J. Biol. Chem.* **287**, 1178–1188 (2012).
225. Reynaert, H., Rombouts, K., Vandermonde, A. et al. Expression of somatostatin receptors in normal and cirrhotic human liver and in hepatocellular carcinoma. *Gut* **53**, 1180–1189 (2004).
226. Giordano, R., Picu, A., Bonelli, L. et al. The activation of somatostatinergic receptors by either somatostatin-14 or cortistatin-17 often inhibits ACTH hypersecretion in patients with Cushing's disease. *Eur. J. Endocrinol.* **157**, 393–398 (2007).
227. Grottoli, S., Gasco, V., Broglio, F. et al. Cortistatin-17 and somatostatin-14 display the same effects on growth hormone, prolactin, and insulin secretion in patients with acromegaly or prolactinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 1595–1599 (2006).
228. Tracy, T. F., Tector, A. J., Goerke, M. E. et al. Somatostatin analogue (octreotide) inhibits bile duct epithelial cell proliferation and fibrosis after extrahepatic biliary obstruction. *Am. J. Pathol.* **143**, 1574–1578 (1993).
229. Fort, J., Oberti, F., Pilette, C. et al. Antifibrotic and hemodynamic effects of the early and chronic administration of octreotide in two models of liver fibrosis in rats. *Hepatology* **28**, 1525–1531 (1998).
230. Sikiric, P., Seiwerth, S., Grabarevic, Z. et al. Hepatoprotective effect of BPC 157, A 15-aminoacid peptide, on liver lesions induced by either restraint stress or bile duct and hepatic artery ligation or CC14 administration. A comparative study with dopamine agonists and somatostatin. *Life Sci.* **53**, PL291–PL296 (1993).

ANEXOS

ANEXO 1.

Debido al enorme peso de las tablas, los datos se pueden consultar públicamente en Sequence Read Archive (SRA): PRJNA71406

ANEXO 2.

Tabla A. Top 110 de DEGs relacionados con músculo regulados al alza en las NPCs *Cort*^{-/-} frente a las *Cort*^{+/-}.

GEN	DESCRIPCIÓN	Log ₂ FC	FDR. Valor p	FUNCIÓN, EXPRESIÓN, C
<i>Myl1</i>	<i>myosin, light polypeptide 1</i>	9.15	<10 ⁻²⁶	Componente del complejo miosina expresado en m
<i>Chrng</i>	<i>cholinergic receptor, nicotinic, gamma polypeptide</i>	8.69	<10 ⁻²³	Subunidad del receptor nicotínico expresado especi papel en la organogénesis neuromuscular
<i>Myh8</i>	<i>myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal</i>	8.66	<10 ⁻¹⁸	Componente del complejo miosina en células del m
<i>Chrnd</i>	<i>cholinergic receptor, nicotinic, delta polypeptide</i>	7.53	<10 ⁻⁸	Junto con gamma se expresa solamente en células
<i>Mylk4</i>	<i>myosin light chain kinase family, member 4</i>	7.44	<10 ⁻⁸	Quinasa específica de Ser/Thr que regula la cadena
<i>Myh3</i>	<i>myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic</i>	7.27	<10 ⁻⁸²	Componente del complejo miosina en células del m
<i>Myh7</i>	<i>myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta</i>	6.63	<10 ⁻⁴	Cadena pesada beta (o lenta) de la miosina cardíaca
<i>Myog</i>	<i>myogenin</i>	6.27	<10 ⁻⁵⁷	Esencial para la diferenciación funcional del m reversión de la diferenciación de las células muscul
<i>Hjv</i>	<i>hemojuvelin BMP co-receptor</i>	6.08	0.002	Miembro de la familia de proteínas de moléculas esquelético, el corazón y el hígado
<i>Csrp3</i>	<i>cysteine and glycine-rich protein 3</i>	5.99	0.002	Regulador positivo de miogénesis. Actúa como c factores como <i>Myod1</i> y <i>Myog</i>
<i>Kcnc4</i>	<i>potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 4</i>	5.80	0.005	Canal de potasio controlado por voltaje que se e excitabilidad de los miocitos
<i>Mov10l1</i>	<i>Helicasa 1 de ARN del complejo RISC como Mov10</i>	5.58	0.033	Helicasa expresada en células del músculo liso
<i>Car3</i>	<i>Anhidrasa carbónica 3</i>	5.16	<10 ⁻⁸	Isoforma expresada específicamente en células mus
<i>Actc1</i>	<i>Actina alfa de músculo cardíaco 1</i>	5.00	<10 ⁻⁵⁶	Componente del aparato contráctil en células musc
<i>Tnnt3</i>	<i>Troponina 3</i>	4.73	<10 ⁻¹⁸	Componente del complejo troponina que junto dependiente de calcio del músculo estriado
<i>Mymk</i>	<i>Miomarcador, factor de fusión de mioblastos</i>	4.64	<10 ⁻¹⁹	Media la función de mioblastos. Involucrado en m músculo esquelético
<i>Lrm1</i>	<i>Repetición neuronal 1 rica en leucina</i>	4.59	<10 ⁻¹⁷	Expresado en mioblastos somáticos tempranos
<i>Myh1</i>	<i>Cadena pesada de miosina 1</i>	4.43	<10 ⁻⁵⁶	Componente del complejo miosina en células del m
<i>Tnni2</i>	<i>Troponina I2</i>	4.28	<10 ⁻³	Componente del complejo troponina que junto dependiente de calcio del músculo estriado
<i>Myod1</i>	<i>Mov10 like RISC complex RNA helicase 1</i>	4.27	<10 ⁻²⁰	Inicia el proceso miogénico. Está involucrado en la
<i>Myoc</i>	<i>myocilin</i>	4.22	<10 ⁻³	Expresada en células del músculo liso, fibroblas Involucrada en la formación de fibras de estrés

GEN	DESCRIPCIÓN	Log ₂ FC	FDR. Valor p	FUNCIÓN, EXPRESIÓN, C
<i>Arpp21</i>	<i>cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 21</i>	4.22	<10 ⁻³	Participa en la diferenciación miogénica. Activa el
<i>Rbm24</i>	<i>RNA binding motif protein 24</i>	3.75	<10 ⁻⁶	Media preferencialmente la inclusión de exones esp importantes para la diferenciación de células del m
<i>Sgcg</i>	<i>sarcoglycan, gamma</i>	3,60	0,001	Proporciona un vínculo estructural entre el citoesqu de células musculares
<i>Cacna1s</i>	<i>calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit</i>	3,50	<10 ⁻⁵	Papel en la excitación-contracción del músculo esq
<i>Ttr</i>	<i>transthyretin</i>	3,38	0,003	Regulador de la diferenciación de mioblastos. Ta (vitamina A) en el plasma al asociarse con la protei
<i>Vgll2</i>	<i>vestigial like family member 2</i>	3,32	0,003	Cofactor de la expresión génica regulada por esquelético
<i>Actn2</i>	<i>actinin alpha 2</i>	3,31	<10 ⁻¹¹	Isoforma de la actinina alfa específica para el esqueléticos y cardiacos
<i>Ctsj</i>	<i>cathepsin J</i>	3,30	0,0009	Isoforma de catepsina que se puede encontrar rel músculo esquelético
<i>Lmod3</i>	<i>leiomodín 3 (fetal)</i>	3,30	0,004	Proteína que actúa como catalizador de la nucl organización de filamentos delgados sarcoméricos
<i>Mb</i>	<i>myoglobin</i>	3,29	0,0002	Hemoproteína globular monomérica expresada en responsable del almacenamiento y transferencia d mitocondrias
<i>Trim72</i>	<i>tripartite motif-containing 72</i>	2,90	<10 ⁻⁷	Relacionado con contracción del músculo liso y co
<i>Cdh15</i>	<i>cadherin 15</i>	2,88	<10 ⁻⁶	Factor expresado particularmente en mioblastos y r
<i>Casq2</i>	<i>calsequestrin 2</i>	2,88	<10 ⁻¹¹	Proteína fijadora de calcio que lo almacena para la sarcoplásmico en las células cardíacas y del múscu
<i>Clcnka</i>	<i>chloride channel, voltage-sensitive Ka</i>	2,77	0,0002	Canal de cloruro expresado en miocitos de músculo
<i>Mybph</i>	<i>myosin binding protein H</i>	2,72	<10 ⁻¹³	Componente estructural del músculo
<i>Acta1</i>	<i>actin, alpha 1, skeletal muscle</i>	2,70	<10 ⁻⁵⁴	Actina alfa de músculo esquelético. Componente p
<i>Ano5</i>	<i>anoctamin 5</i>	2,65	0,0006	Proteína transmembrana abundante en células del r
<i>Hcn4</i>	<i>hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 4</i>	2,62	<10 ⁻⁶	Isoforma presente en músculo cardíaco relacio despolarización de la membrana durante el poten cardíaco
<i>Tnnc2</i>	<i>troponin C2, fast</i>	2,61	<10 ⁻⁸	Subunidad C2 del complejo proteico troponina c músculo estriado
<i>Syndig1</i>	<i>synapse differentiation inducing 1</i>	2,59	0,021	Proteína expresada en músculo cardíaco
<i>Synpo2l</i>	<i>synaptopodin 2-like</i>	2,54	<10 ⁻¹¹	Proteína asociada a actina que puede desempeñar basada en actina

GEN	DESCRIPCIÓN	Log ₂ FC	FDR. Valor p	FUNCIÓN, EXPRESIÓN, C
<i>Myom3</i>	<i>myomesin family, member 3</i>	2,52	<10 ⁻⁸	Factor que puede vincular el citoesqueleto de filamento de actina en el músculo estriado
<i>Ttn</i>	<i>titin</i>	2,43	<10 ⁻⁸	Proteína grande y abundante de músculo estriado que participa en el ensamblaje de la maquinaria contráctil en las células musculares
<i>Xirp1</i>	<i>xin actin-binding repeat containing 1</i>	2,40	<10 ⁻⁶	Proteína que protege los filamentos de actina durante la contracción y polimerización
<i>Lmod2</i>	<i>leiomodín 2 (cardiac)</i>	2,38	0,007	Proteína que media la nucleación de filamentos de actina durante la polimerización
<i>Thbs4</i>	<i>thrombospondin 4</i>	2,35	<10 ⁻³⁴	Glucoproteína adhesiva que media las interacciones célula-célula involucrada en procesos de proliferación celular, migración y miocardiocitos
<i>P2ry13</i>	<i>purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 13</i>	2,34	<10 ⁻⁴	Receptor purinérgico expresado en el músculo esquelético que es importante en su desarrollo y reparación
<i>Cdh19</i>	<i>cadherin 19, type 2</i>	2,27	0,0002	Glucoproteína de adhesión célula-célula dependiente de calcio de cadherina extracelular expresada en fibras musculares
<i>Tbx15</i>	<i>T-box 15</i>	2,19	<10 ⁻⁵	Controla la determinación del tipo de fibra del músculo esquelético
<i>Klhl30</i>	<i>kelch-like 30</i>	2,09	<10 ⁻¹¹	En el desarrollo del músculo esquelético, varios procesos de proliferación y/o diferenciación que da lugar a la formación de los músculos maduros
<i>Kcnb2</i>	<i>potassium voltage gated channel, Shab-related subfamily, member 2</i>	2,04	0,009	Entre sus diversas funciones se incluye la regulación de la actividad eléctrica
<i>Musk</i>	<i>muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase</i>	1,98	<10 ⁻¹⁰	Juega un papel central en la formación y mantenimiento de la unión neuromuscular entre la neurona motora y el músculo esquelético

Log₂FC: *Fold change* de la expresión de DEGs entre NPCs *Cort*^{-/-} y *Cort*^{+/+} expresada como valores Log₂. Valor p de FDR: Valor p para la tasa

Tabla B. DEGs de NPCs *Cort*^{-/-} frente a NPCs *Cort*^{+/+} anotados en GO para Componentes Celulares.

GO ID	DESCRIPCIÓN	Ratio de Genes	p-adjust	DEG: regulados al alza y regulados a la baja en
62023	Matriz extracelular que contiene colágeno	104/1852	<10 ⁻²³	<i>Thbs4/Lox/Dpt/Igfbp6/Mgp/Eln/Adams5/Fbln5/Ptprz1/Col8a1/Tgfb2/Megf6/Cilp/In2/Igf2/Col4a5/Gpc3/Smoc1/Lum/Col6a3/Tgfb3/Col14a1/Pcsk6/Cspg4/Npnt/Col9/Mfap5/Frem1/Timp3/Ccn3/Spock2/Myoc/Col4a6/Il16/Timp2/Iiga6/Col3a1/Htra1/Mmp9/Col12a1/Emilin2/Postn/Lamb2/Entpd1/Dag1/Tgfb1/Srpx2/Col1a1/Fmod/Lama6/Pmp22/Plxdc2/Prepl/Lgals1/Pcolce2/Itih2/Serping1/Agrr/Vegfa/Lgals9/Serpine2/Col24a1/Pkm/Rarres2/Dcn/Bmp1/Loxl2/E1/Sod3/Egfl7/Ctsl/Serpine1/Adams4/Anxa6/Runx1</i>
31012	Matriz extracelular	121/1852	<10 ⁻²²	<i>Thbs4/Lox/Dpt/Igfbp6/Mgp/Eln/Ccn5/Adams5/Fbln5/Lrrn1/Ptprz1/Col8a1/Ling1/Lama2/Clec14a/Fbln2/Igf2/Wnt5a/Col4a5/Gpc3/Smoc1/Lum/Col6a3/Tgfb3/Col4/Ntn4/Lamc2/Wnt2/Anxa1/Ltbp4/Megf9/Mfap5/Frem1/Timp3/Cd180/Ccn3/Spock2/Htra1/Fbn1/Smoc2/S100a10/Lamc3/Col5a3/Mmp9/Col12a1/Emilin2/Postn/Lama6/ApoE/Lamc1/Vwf/S100a3/Itgb4/Col16a1/Ltbp1/Gpc6/Pmp22/Plxdc2/Tgfb3/Vegf/Mmp13/Alpl/Wnt4/Serping1/Agrr/Vegfa/Lgals9/Serpine2/Col24a1/Pkm/Rarres2/3/Tnc/Mmp10/Plscr1/Plod1/Sod3/Egfl7/Ctsl/Ccbe1/Serpine1/Mmp3/Adams4/Lrrn1</i>
09897	Lado externo de la membrana plasmática	97/1852	<10 ⁻¹³	<i>Adgre1/Cd163/Thy1/Itgal/Gpihbp1/Cd36/Fcgr2b/Plet1/Musk/Siglece/Cd59a/Flo1/Ebi3/Wnt2/Vtcn1/Anxa1/Slamf7/Amot/Itga4/Rorc/Alcam/Itga1/Ackr3/Lrp2/Itga6/1/Stab2/Ngfr/ApoE/Cd55/Vwf/Ceacam1/Prn/Itgb6/Cd48/Folr1/Tgfb3/Cd22/Ghr23/Pdpr/Il13ra2/H2-Q6/Tnfrsf9/H2T23/Ighm/H2Q7/H2Q4/Cxcl10/H2-Ab1/H2K1/Chrn2/H2Q10/B2m/H2T22/H2D1/Itga2/Abcg1/Il6/Ccr7/Serpine2/H2T24/Cd24a/Ccr5/Lepr/Cd28/Cd40/Btn1a1/Ada/Ccr2/Ctsl/Gm8909/Vcam1/Cd31</i>
15629	Citoesqueleto de actina	108/1852	<10 ⁻¹³	<i>Myh3/Actc1/Myh1/Acta1/Tnnt3/Myl1/Hspb7/Ccn5/Myh8/Cobl/Ablim1/Mybph/Acta1/Mylpf/Tnnc2/Tin/Myom3/Flot1/Mylk/Anln/Tnnt2/Hck/Acta2/Pknx2/Spta1/Xirp1/yb/Anxa1/Myo5b/Myh7/Amot/Myl7/Myo1f/Actn3/Tnnc1/Ahnak/Synpo2/Aif1/Shro2/Ror1/Limch1/Tpm2/Tnni2/Tmod2/Gas2l1/Myom2/Cap2/Rac2/Myo1d/Lmod3/Pg85/Myo5a/Cit/Mst1r/Myom1/Fscn1/Zyx/Pawr/Asap1/Arhgap21/Gas2l3/Rflnb/Plk4/Krt19/Ddx58/Gbp2/Slc2a1/Crmp1/Pdpx/Smtnl2/Snca/Mpp4/Fmn2/Rnd1/Fblim1/Sh2b2</i>
05865	Filamento fino de músculo estriado	20/1852	<10 ⁻¹⁰	<i>Acta1/Tnnt3/Actn2/Tnni1/Lmod1/Tnnc2/Tin/Myom3/Tnnt2/Mybpc3/Actn3/Tnnc1/Myom1/Neb</i>
43292	Fibra contráctil	62/1852	<10 ⁻¹⁰	<i>Myh3/Actc1/Myh1/Acta1/Tnnt3/Myl1/Myod1/Jph2/Krt8/Actn2/Casq2/Synpo21/Myl1/m3/Tnnt2/Acta2/Mybpc3/Cacna1s/Npnt/Vcl/Myh7/Myl7/Actn3/Nos1ap/Dmd/Tnni2/Tmod2/Csrp3/Ryr1/Myom2/Cavin4/Cav3/Pde4dip/Sync/Lmod3/Pgm5/Dag1/kbp1a/Slc8a1/Krt19/Slc2a1/Kcnj8/Twf2/Psma6</i>

GO ID	DESCRIPCIÓN	Ratio de Genes	p-adjust	DEG: regulados al alza y regulados a la baja en
42383	Sarcolema	49/1852	<10 ⁻¹⁰	<i>Aqp1/Atp1a3/Cd36/Krt8/Trim72/Agri/Flot1/Lama2/Bsg/Col6a3/Tgfb3/Cacna1s/ar2a/Sgcg/Popdc2/Fxyd1/Ryr1/Itga7/Scn1b/Nos3/Cav3/Sync/Pgm5/Dag1/Chrmcd/Adra1b/Cav1/Slc8a1</i> <i>Krt19/Slc2a1/Kcnj8/Bsg/Vdr/Vcam1/Car4/Kcnj2/Anxa6</i>
36379	Miofilamento	20/1852	<10 ⁻¹⁰	<i>Acta1/Tnnt3/Actn2/Tnni1/Lmod1/Tnnc2/Tnn1/Myom3/Tnnt2/Mybpc3/Actn3/Tnnc1/Myom1/Neb</i>
30016	Miofibrilla	57/1852	<10 ⁻⁹	<i>Actc1/Myh1/Acta1/Tnnt3/Myh1/Myod1/Jph2/Krt8/Actn2/Casq2/Synpo2/Tnni1/Lcna1s/Vcl/Myh7/Myh1/Actn3/Nos1ap/Dmd/Tnnc1/Ahnak/Synpo2/Nexn/Ldb3/MyhCavin4/Cav3/Pde4dip/Sync/Lmod3/Pgm5/Dag1/Synpo/Lmod2/Myom1/Klh141/Neb</i> <i>Krt19/Slc2a1/Kcnj8/Twf2/Psma6</i>
44449	Parte de fibra contráctil	55/1852	<10 ⁻⁹	<i>Actc1/Myh1/Acta1/Tnnt3/Jph2/Krt8/Actn2/Casq2/Synpo2/Myh1/Tnni1/Lmod1/cna1s/Npnt/Vcl/Myh7/Myh1/Actn3/Nos1ap/Dmd/Tnnc1/Ahnak/Synpo2/Nexn/Ldbom2/Cavin4/Cav3/Sync/Lmod3/Pgm5/Dag1/Synpo/Lmod2/Myom1/Klh141/Neb/A</i> <i>Krt19/Slc2a1/Psma6</i>

ID GO (Identificador de ontología genética) y descripción de los términos de las Componentes Celulares ordenados por valores de ajuste p descendente. NPCs *Cort*^{-/-} (FDR<0.05) en cada término de GO relacionado con el número total de DEGs que se anotan en los Componentes Celulares de GO por término de GO. Rojo: genes regulados al alza en NPCs *Cort*^{-/-}. Azul: genes regulados a la baja en NPCs *Cort*^{-/-}.

Tabla C. DEGs de NPCs *Cort*^{-/-} frente a NPCs *Cort*^{+/+} anotados en GO para Procesos Biológicos.

GO ID	DESCRIPCIÓN	Ratio de Genes	p-adjust	DEG: regulados al alza y regulados a la baja en
98542	Respuesta de defensa ante otro organismo	116/1833	<10 ⁻¹⁷	<i>Trem14/Adamts5/Cd36/Lyz2/Clec4n/Hck/Mpeg1/Syk/Arg2/C5ar1/Slc11a1/Il1b/Fpr2/Myo1f/Clec4e/Fgl2/Htra1/Acp5/Tlr8/Nef1/Cxcl13/Ptprc/Stab1/Irf7/Zbp1/Isg15/Rtp4/Gbp3/Ifit1/Ifit3/Oas12/Rsad2/Ifit3b/Oas1a/Lcn2/Oas1/Irgp9/Hp/Mx2/H2T23/Oas2/Ifih1/Bst2/Ighm/Oas1g/Arg1/Cxcl1/Dhx58/Ddx58/Stat1/Gbp4/H2K1/Trim34a/Gbp6/Adar/Kcnj8/Oas3/Ddx60/Plac8/Trex1/Gbp7/Irf1/Cxcr1/Trim12a/Gbp9/Epha2/Ltf/Eif2ak2/Rarres2/Isg20/Gapdh/Igkc/Apobec1/Trim1cr1/Pglyrp1/Il4ra/Camp/Tlr3/Oas1c/Ifitm1/Ifit1b2/Serpine1/Vgf/H2M3/Gsdmd/</i>
03012	Procesos del Sistema muscular	105/1833	<10 ⁻¹⁷	<i>Myh3/Myog/Actc1/Myh1/Tnnt3/Myh1/Smpd3/Chrn3/Myod1/Myom3/Trim72/Myhk/Ednrb/Myh8/Lmod1/Igfl/Itga2/Trim63/Chrd/Tnnc2/Tnn1/Myom3/Trim72/Myhk/Dmpk/Tnnt2/La1/Ccn4/Cacna1s/Npnt/Myh7/Actn3/Dmd/Tnnc1/Aif1/Myoc/Gsn/Lmna/Tpm2/Tnnt2/Myom2/Scn1b/Nos3/Cav3/Klf15/Lmod3/Mrvi1/Lmod2/Abat/Tbx20/Agtr/Myomgcd/Adora1/Adra1b/Cav1/Anxa6/Rock2/Fkbp1a/Gpd11/Slc8a1</i> <i>Stc1/Atp1a3/Gdnf/Kcnj8/Ptgs2/Bdkrb2/Tnfrsf1b/Agri/Arg2/Lck/Ptger3/Sorbs2/Mada/Drd1/Sphk1/Kcnj2/Mstn</i>

GO ID	DESCRIPCIÓN	Ratio de Genes	p-adjust	DEG: regulados al alza y regulados a la baja en
50900	Migación leucocitaria	94/1833	<10 ⁻¹⁷	<i>Thbs4/Smpd3/Vegfd/Thy1/Ednrb/Pgf/Cnr2/Wnt5a/Syk/C5ar1/Csf3r/Cd300a/Aocpr2/Itga1/Tnfsf18/Ccn3/Aif1/Il16/tga6/Mmp9/Jaml/C3ar1/Rac2/Cxcl13/Ptprj/Seeps8/Pawr/Hc/Slamf1/Gpr35/Madcam1/Adora1/Itgam/Vav1</i> <i>Cxcl2/Ccl22/Spp1/S100a9/S100a8/Cxcl1/Cxcl3/Cxcl10/Ccl7/Itga2/Ch25h/Gremegfa/Lgals9/Mif/Il1a/Rarres2/Itga4/Itgb3/Ecm1/Ptger3/Bdkrb1/Cd24a/Ppbb/Tnfr/Slc37a4/Cxcl14/Vcam1/Ager/Ripk3/Serpine1/Mdk/Cyp7b1/Vegfc/Mstn</i>
06936	Contracción muscular	86/1833	<10 ⁻¹⁷	<i>Myh3/Actc1/Myh1/Tnnt3/Myh1/Smpd3/Chrnng/Ednrb/Myh8/Chrn2/Actn2/Casq2/d/Tnnc2/Ttn/Myom3/Mylk/Dmpk/Tnnt2/Hcn4/Acta2/Mybpc3/Kcne3/Npy1r/Cacn1/Tnnt2/Tmod2/Atp1b1/Fxyd1/Csrp3/Ryr1/Ncf1/Myom2/Scn1b/Cav3/Lmod3/Mrvi/hrna1/Pawr/Akap6/Ank2/Sgcd/Adora1/Adra1b/Cav1/Anxa6/Rock2/Fkbp1a/Gpd/Stc1/Atp1a3/Gdnf/Kcni8/Ptgs2/Bdkrb2/Agrn/Arg2/Lck/Ptger3/Map2k1/Edn1/Ma</i>
35456	Respueta a interferon-beta	33/1833	<10 ⁻¹⁷	<i>Gbp3/Ift1/Xaf1/Ift3/Igtp/Irgm2/Iigp1/Iftm3/Bst2/Ift204/Irgm1/Tgtp2/Ift203/Ift207/Mndal/Gbp6/Ift213/Trex1/Irf1/Aim2/Ift205/Plscr1/Ikbke/Ift209/Iftm1/Gm121</i>

ID GO (Identificador de ontología genética) y descripción de Iso terminos de las Procesos Biológicos ordenados por valores de ajuste p descen NPCs *Cort*-/ (FDR<0.05) en cada término de GO relacionado con el número total de DEGs que se anotan en los Procesos Biológicos de GO término de GO. Rojo: genes regulados al alza en NPCs *Cort*-/. Azul: genes regulados a la baja en NPCs *Cort*-/.

Tabla D. DEGs de NPCs *Cort*-/ frente a NPCs *Cort*+/- anotados en GO para Funciones Moleculares.

GO ID	DESCRIPCIÓN	Ratio de Genes	p-adjust	DEG: regulados al alza y regulados a la baja en
03779	Unión a actina	101/1814	<10 ⁻¹²	<i>Myh3/Myh1/Tnnt3/S100a4/Myh8/Cobl/Ablim1/Actn2/Synpo2/Myh11/Tnnt1/Lrnox2/Spta1/Anxa8/Xirp1/Myh10/Mybpc3/Clmn/Epb4113/Tln2/Vcl/Map1a/Myosynpo2/Aif1/Shroom3/Cnn1/Pstpip2/Nexn/Tns4/Diaph3/Ldb3/Gsn/Mtss2/Vash1/Csrp3/Myom2/Nos3/Cap2/Tagln/Myo1d/Cobll1/Lmod3/Shtn1/Dag1/Synpo/Fm5a/Add3/Eps811/Myom1/Fhdc1/Eps8/Ceacam1/Snta1/Fscn1/Pawr/Gas213/Aka18a/Tmem201</i> <i>Nos2/Trpc6/Ccr5/Scin/Tmsb10/Snca/Tw2/Hcls1/Lrrk2/Enah/Anxa6</i>
30545	Actividad reguladora de receptor	98/1814	<10 ⁻¹¹	<i>Thbs4/Vegfd/Ccn5/Pgf/Bmp2/Tgfb2/Igf1/Efemp1/Pnoc/Gdf6/Igf2/Wnt5a/Tgfb3/Tnfsf18/Ccn3/Il16/Fbn1/Gpnmb/Sct/Ttr/Cxcl13/Fgf12/Agf/Epo/Wfikn2/Bmp6/x1/Nrtn</i> <i>Cxcl2/Ccl22/Spp1/Stc1/Il11/Csf3/Cxcl1/Ly6e/Cxcl3/Csf2/Pri8a9/Lif/Cxcl10/C2/Cxcl5/Il6/Ccl2/Agrn/Ccl11/Vegfa/Pdgra/Tnfsf9/Mif/Il1a/Penk/Bmp1/Adm/FgDkk2/Edn1/Ccl1/Npy/Sema4c/Il1rn/Pglyrp1/Cdc42ep2/Cxcl14/Sema3e/Osm/1</i>

GO ID	DESCRIPCIÓN	Ratio de Genes	p-adjust	DEG: regulados al alza y regulados a la baja e
05201	Constituyente estructural de matriz extracelular	41/1814	<10 ⁻⁸	<i>Thbs4/Dpt/Igfbp6/Eln/Fbln5/Col8a1/Efemp1/Lama2/Fbln2/Col4a5/Lum/Col6a2/Col4a6/Col3a1/Fbn1/Tnc/Col5a3/Col12a1/Emilin2/Postn/Lamb2/Tgfbi/Srp/Col1a1/Pcolce2</i> <i>Agrn/Col24a1/Ecm1/Col7a1</i>
05539	Unión a glucosaminoglicanos	52/1814	<10 ⁻⁷	<i>Thbs4/Ccn5/Adamts5/Lpl/Cemip/Vit/Pcsk6/Ccn4/Ccdc80/Cfh/Lamc2/Fbln7/Rsb1/Itga6/Col3a1/Fbn1/Gpmb/Smoc2/Col5a3/Cxcl13/Fgf12/Postn/Ptprc/Selp/Prnp/Stab2/Pglyrp1/Itgam</i> <i>Cxcl10/Ccl7/Ccl2/Agrn/Vegfa/Serpine2/Ltf/Dcn/Hk1/Lyve1/Liph/Ager/Mdk/An</i>
50839	Unión a moléculas de adhesión celular	58/1814	<10 ⁻⁷	<i>Thbs4/Thy1/Itgal/Ccn5/Fbln5/Ptprz1/Igf1/Cpe/Cdh13/Cdh15/Igf2/Ptpn6/Syk/Ctla4/Timp2/Itga6/Col3a1/Fbn1/Gpmb/Itgb8/Nrxn2/Jaml/Nectin2/Itga7/Nos3/Ptprj1/Cadm1/Vwf/Itgb6/Itgb4/Col16a1/Akap5/Itgb5/Ptprf/Cldn7</i> <i>Isg15/Spp1/Nos2/Ptpr1/Itga4/Itgb3/Cd177/Vcam1/Madcam1</i>

ID GO y descripción de los términos de las Funciones Moleculares ordenados por valores de ajuste p descendentes. Relación de genes: número de genes de un término de GO relacionado con el número total de DEGs que se anotan en las Funciones Moleculares de GO (1814 genes). Ajuste p: Significancia al alza en NPCs *Cort*^{-/-}. Azul: genes regulados a la baja en NPCs *Cort*^{-/-}.

