

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, IMMUNOLOGIA I NEUROCIÈNCIES
FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**Participació de la Catepsina B, la Catepsina D
i l'Esfigomielinasa Àcida en la Fibrosi
Hepàtica**

Anna Moles Fernández
Barcelona, 2009

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, IMMUNOLOGIA I NEUROCIÈNCIES
FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Programa de doctorat de Biologia cel·lular i Anatomia Patològica

Memòria per optar al títol de doctora per la Universitat de Barcelona
presentada per

ANNA MOLES FERNÁNDEZ

Tesi dirigida per

Dra. Montserrat Marí García

Dr. José Carlos Fernández-Checa Torres

Departament de Mort i Proliferació Cel·lular de l'Institut
d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consell Superior
d'Investigacions Científiques i a la Unitat de Fetge de l'Institut de
Malalties Digestives, Hospital Clínic i Provincial, Institut
d'Investigacions Biomèdiques August i Pi Sunyer

Als meus pares i a l'Adrià

Tota paraula és llum i tota llum, creixença

Miquel Martí i Pol

◦◦● Índice

Índex general

Abreviatures	19
1. Introducció	23
1.1. Fibrosi hepàtica	27
1.1.1. Rellevància clínica de la progressió de la fibrosi hepàtica	27
1.1.2. Estímuls que indueixen la fibrosi hepàtica	30
1.1.3. Desenvolupament de la fibrosi.....	31
1.1.4. Mecanismes de la fibrogènesi hepàtica.....	32
1.1.5. Reversió de la fibrosi hepàtica.....	35
1.1.6. Aproximacions terapèutiques al tractament de la fibrosi hepàtica.....	37
1.2. La cèl·lula estelada hepàtica.....	40
1.2.1. Història i nomenclatura	40
1.2.2. Descripció.....	40
1.2.2.1. Localització.....	40
1.2.2.2. Morfologia i ultraestructura.....	41
1.2.2.3. Cicle cel·lular de les CEH.....	42
1.2.2.4. Origen embriològic de les CEH.....	42
1.2.2.5. Heterogeneïtat i plasticitat de les CEH	43
1.2.3. Funcions de la CEH al fetge normal.....	44
1.2.3.1. Paper en el desenvolupament del fetge i la seva regeneració	44
1.2.3.2. Metabolisme dels retinoids.....	44
1.2.3.3 Immunoregulació.....	45
1.2.4. Activació de les CEH.....	45
1.2.4.1. Iniciació	46
1.2.4.2. Perpetuació	47
1.2.4.3. Resolució.....	50
1.3. Catepsines.....	51
1.3.1. Cisteïn catepsines.....	51
1.3.1.1. Catepsina B.....	52

1.3.2. Aspartil peptidases.....	55
1.3.2.1. Catepsina D	55
1.4. Esfingomielinases.....	58
1.4.1. Els esfingolípid.....	58
1.4.2. Els metabolisme dels esfingolípid	58
1.4.3. Aspectes generals de les esfingomielinases.....	60
1.4.4. Esfingomielinasa Neutra (NSMasa).....	60
1.4.5. Esfingomielinasa Àcida (ASMasa)	62
2. Objectius	65
3. Material i mètodes	69
3.1. Model de fibrosis hepàtica per Tetraclorur de carboni	71
3.1.1. Metabolisme del Tetraclorur de carboni.....	71
3.1.2. Model experimental <i>in vivo</i>	71
3.2. Aïllament de cèl·lules estelades hepàtiques	72
3.3. Cultius	74
3.3.1. Condicions de cultiu	74
3.3.2. Línia cel·lular.....	74
3.3.3. Tractaments cel·lulars	74
3.3.4. Assajos de migració cel·lular o <i>Wound healing</i>	75
3.4. Determinació de transaminases en sèrum	75
3.5. Obtenció de lisats totals	76
3.5.1. Protocol per l'obtenció d'un lisat total de fetge.....	76
3.5.2. Protocol per l'obtenció d'un lisat total de CEH	76
3.6. Quantificació de proteïnes.....	77

3.7. Determinació de proteïnes per <i>Western blot</i>	77
3.7.1. Electroforesi en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).....	77
3.7.2. <i>Western-blot</i>	79
3.7.3. Eliminació d'anticossos de la membrana (<i>Stripping</i>)	80
3.8. Determinació de l'activitat CtsB i CtsD.....	80
3.9. Zimografia àcida de gelatina.....	82
3.10. Determinació de l'activitat Esfingomielinasa.....	84
3.10.1. Activitat Esfingomielinasa àcida (ASMasa) en CEH o teixit hepàtic	84
3.10.2. Activitat Esfingomielinasa neutra (NSMasa) en CEH o teixit hepàtic.....	85
3.11. Quantificació de la Hidroxiprolina.....	86
3.12. Aïllament de microsomes i determinació de l'activitat enzimàtica del Citocrom P450 (CYP2E1)	88
3.12.1. Aïllament de microsomes.....	88
3.12.2. Determinació de l'activitat enzimàtica del Citocrom P450 2E1, assaig del p- nitrofenol.....	88
3.13. Tincions histològiques.....	89
3.13.1. Hematoxilina & Eosina	90
3.13.2. Sirius Red.....	91
3.14. Immunohistoquímica	91
3.14.1. Immunohistoquímica cromogènica revelada amb DAB	92
3.14.2. Immunohistoquímica de fluorescència	94
3.15. Immunocitoquímica	95
3.16. Quantificació de la proliferació cel·lular per assaig Timidina Tritiada.....	96
3.17. Transfecció amb ARNi de les CEH.....	97

3.18. Extracció d'ARN en CEH o teixit hepàtic.....	98
3.19. RT-PCR quantitativa a temps real.....	99
3.20. Estadística	101
4. Resultats	103
Bloc I: Caracterització de la contribució de la CtsB i la CtsD al procés d'activació de les CEH i al model de fibrogènesi per CCl₄.....	105
4.1. Expressió de les catepsines B i D durant l'activació de les CEH de ratolí	107
4.3. Paper de la CtsB i la CtsD en la línia cel·lular de CEH humanes LX2	112
4.4. Processament de la CtsB i la CtsD en CEH de ratolí	114
4.5. La CtsB modula la via de Fosfoinositol 3 Cinasa/AKT en CEH ratolí activades	115
4.6. Sobreexpressió de la CtsB en ratolins tractats amb CCl ₄	117
4.7. La inhibició de la CtsB atenua la fibrosi hepàtica induïda per CCl ₄	119
Bloc II: Caracterització de la contribució de l'ASMas a al procés d'activació de les CEH en relació amb les catepsines B i D.	123
4.8. L'ASMas a augmenta la seva expressió durant el procés d'activació de les CEH	125
4.9. La inhibició farmacològica de l'ASMas a disminueix el potencial profibrogènic de les CEH	125
4.10. El silenciament de l'ASMas a disminueix la CtsB i la CtsD de forma selectiva	127
4.11. La inhibició farmacològica de l'ASMas a disminueix la capacitat proliferativa de les CEH activades via Fosfoinositol 3 Cinasa/AKT	129
4.12. Les CEH procedents de ratolins deficients en ASMas a presenten un fenotip més profibrogènic	131
4.13. La inhibició de la CtsB en CEH procedents de ratolins deficients en ASMas a disminueix el seu potencial fibrogènic	133
4.14. Els ratolins deficients en ASMas a presenten més fibrosi davant del tractament amb CCl ₄	134
5. Discussió	139

6. Conclusions	151
7. Bibliografía	155
8. Annex	177

Índex de Taules

Taula 1: Factors genètics i no genètics associats amb la progressió de la fibrosi	29
Taula 2: Principals fàrmacs en desenvolupament pel tractament de la fibrosi hepàtica	39

Índex de Figures

Figura 1: Arquitectura sinusoïdal i localització de les CEH	41
Figura 2: Canvis subendotelials que acompanyen al dany hepàtic durant l'activació de les CEH	46
Figura 3: Característiques fenotípiques de l'activació de les CEH durant el dany hepàtic i la resolució	50
Figura 4: Estructura de raigs X de la catepsina B humana	52
Figura 5: Representació de la catepsina D	56
Figura 6: Implicació de la catepsina B i D en l'apoptosi	57
Figura 7: Representació esquemàtica del metabolisme dels esfingolípid	59
Figura 8: Comparació de la seqüència predita de l'NSMasa3 amb les seqüències de l'NSMasa1 i l'NSMasa2	61
Figura 9: Acció de la ceramida com a segon missatger	63
Figura 10: Metabolisme del Tetraclorur de carboni	71
Figura 11: Expressió de les proteïnes CtsB, la CtsD i α -SMA al llarg del temps d'activació de CEH de ratolí	107
Figura 12: L'expressió de la CtsB i la CtsD present en el medi extracel·lular	108
Figura 13: Localització cel·lular de la CtsB i la CtsD en CEH de 7 dies	109
Figura 14: Expressió de la CtsB i la CtsD davant del silenciament amb els seus respectius ARNi	110
Figura 15: Expressió de OAS1, α -SMA i TGF β davant de la transfecció amb ARNi i migració per <i>wound healing</i>	111
Figura 16: Activitat de la CtsB i expressió de l' α -SMA davant de l'inhibidor Ca074-Me CEH activades	111
Figura 17: Expressió de la CtsB i la CtsD en LX2	112
Figura 18: Activitat de la CtsB en LX2 i CEH de ratolí	112
Figura 19: Expressió relativa de l' α -SMA en LX2 després de la inhibició de la CtsB	113

Figura 20: Proliferació de les LX2 després del silenciament de CtsB i/o CtsD	113
Figura 21: Processament mutu de les catepsines B i D	114
Figura 22: El silenciament de la CtsB afecta el processament de la CtsD i a l'inrevés	115
Figura 23: Nivells proteics de PDGF β -R durant l'activació de les CEH	116
Figura 24: Efecte de la inhibició de la CtsB o la CtsD sobre la degradació de PDGF β -R	116
Figura 25: Efecte de la inhibició de la CtsB o la CtsD sobre la fosforilació d'AKT	116
Figura 26: Efecte de la inhibició de PI3K per LY294002 sobre la fosforilació d'AKT	117
Figura 27: Colocalització de la CtsB o la CtsD amb GFAP en tall histològic de fetges de ratolins control i tractats amb CCl ₄	118
Figura 28: Expressió de la CtsB i la CtsD en CEH vs fetges controls o tractats amb CCl ₄	119
Figura 29: Esquema del model experimental per a l'administració del CCl ₄ i el Ca074-Me	119
Figura 30: Nivells d'alanina aminotransferasa en sèrum i nivells d'hidroxiprolina	120
Figura 31: Tincions hematoxilina i eosina, i Sirius red sobre talls histològics de fetge	121
Figura 32: Activitat del citocrom P450 2E1 de microsomes	122
Figura 33: Detecció d' α -SMA i mieloperoxidasa (MPO) sobre talls histològics de fetge	122
Figura 34: Activitat ASMas i NSMas al llarg del temps d'activació de les CEH	125
Figura 35: Expressió de CtsB, CtsD i α -SMA davant de la inhibició amb Imipramina	126
Figura 36: Expressió relativa de l'ARNm de l' α -SMA davant de la inhibició de l'ASMas	127
Figura 37: Expressió de l'ASMas, la CtsB i la CtsD davant de la transfecció amb ARNi de l'ASMas	128
Figura 38: Quantificació del <i>Western blot</i> de la Figura 37B	128
Figura 39: Expressió relativa de l'ARNm de l' α -SMA davant de la transfecció amb ARNi de l'ASMas	128
Figura 40: Proliferació de CEH tractades amb o sense Ca074-Me o Imipramina	129
Figura 41: Efecte de la inhibició de l'ASMas sobre la fosforilació d'AKT	130
Figura 42: Expressió relativa de l'ARNm de diferents gens marcadors de fibrosi al llarg del temps d'activació de ratolins ASMas ^{+/+} i ratolins ASMas ^{-/-}	131
Figura 43: Expressió de la CtsB, la CtsD i l' α -SMA en CEH procedents de ratolins ASMas ^{+/+} i ratolins ASMas ^{-/-}	132
Figura 44: Expressió de l' α -SMA i taxa de proliferació de CEH procedents de ratolins ASMas ^{+/+} i ratolins ASMas ^{-/-} davant de la inhibició de la CtsB	133
Figura 45: Nivells d'alanina aminotransferasa en sèrum i activitat CtsB en fetge	135

Figura 46: Expressió de CtsB, CtsD i α -SMA en fetge i nivells d'hidroxiprolina	135
Figura 47: Tincions hematoxilina i eosina, i Sirius red sobre talls histològics de fetge	137
Figura 48: Detecció d' α -SMA i mieloperoxidasa (MPO) sobre talls histològics de fetge	137
Figura 49: Participació de les CtsB i D i l'ASMas en el procés d'activació de la CEH	149

◦ ◦ ● Abreviatures

Abreviatures

AP-1: Activator protein-1 o proteïna activadora-1.

ASMa: Esfingomielinasa àcida.

CCL21: Chemokine (C-C motif) ligand 21 o quimiocina (motiu C-C) lligand 21.

CCR5: Chemokine (C-C motif) receptor 5 o receptor quimiocina (motiu C-C) 5.

CEH: Cèl·lula estelada hepàtica.

Cèl·lules NK: Cèl·lules natural killers.

CTGF: Connective tissue growth factor o factor de creixement del teixit connectiu.

CtsB: Catepsina B.

CtsD: Catepsina D.

CYP2E1: Citocrom P450 2E1.

D.E.: Desviació estàndard.

DDR-2: Discoidin domain receptor 2 o receptor del domini discoidina 2.

EGF: Endothelial growth factor o factor de creixement endotelial.

EHNA: Esteohepatitis no alcohòlica.

ERK: Extracellular signal-regulated kinases o cinases regulades per senyals extracel·lulars.

ERO: Espècies reactives de l'oxigen.

ET-1: Endotelina-1.

EtOH: Etanol.

GFAP: Glial fibrillary acidic protein o proteïna àcida fibril·lar de la glia.

HGF: Hepatocellular growth factor o factor de creixement hepatocel·lular.

HNE: 4-hidroxi-2,3-noneal.

IGF-I: Insulina growth factor type I o factor de creixement de la insulina tipus I.

JNK: c-Jun cinasa.

LPS: Lipopolisacàrid bacterià.

M6P: Residus manosa 6P.

MAPK: Mitogen-activated protein kinase o proteïna cinasa activadora de la mitogènesi.

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1 o proteïna quimioattractant de monòcits-1.

MCP-2: Monocyte chemoattractant protein-2 o proteïna quimioattractant de monòcits-2.

ME: Matriu extracel·lular.

MHC- II: Major histocompatibility complex type II o complex d'histocompatibilitat de tipus II.

MMP-2: Metalloprotease type 2 o metal·loproteasa de tipus 2.

MnSOD: Manganese superoxide dismutase o manganès superòxid dismutasa.

NF- κ B: Factor nuclear- κ B.

NGF: Nerve growth factor o factor de creixement nerviós.

NGFR: Nerve growth factor receptor o receptor del factor de creixement nerviós.

NPD: Niemann Pick disease o malaltia de Niemann Pick.

NSMasa: Esfingomielinasa neutra.

OAS1: 2'-5' Oligoadenilat sintetasa 1

PDGF: Platelet-derived growth factor o factor de creixement derivat de les plaquetes.

PI3K: Fosfoinositol 3 cinasa.

RA: Retinoic acid o àcid retinoic.

RANTES: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted.

RBP: Retinol binding protein o proteïna d'unió al retinol.

RE/Golgi: Reticle endoplasmàtic/Golgi.

α -SMA: Smooth muscle actin o actina del múscul llis.

SMasa: Esfingomielinasa.

TGF β : Transforming growth factor β o factor de creixement transformant β

TIMP-1: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 o Inhibidor tissular de metal·loproteasa-1.

TNF- α : Tumor necrosis factor α o factor de necrosi tumoral α .

TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand o lligand inductor de l'apoptosi relacionat amb TNF.

VEGF: Vascular endothelial growth factor o factor de creixement vascular endotelial.

VHB: Virus de l'hepatitis B.

VHC: Virus de l'hepatitis C.

◦ ◦ ● 1. Introducció

La introducció d'aquesta tesi es troba dividida en quatre capítols fonamentals per a la comprensió del treball desenvolupat. En el primer capítol es descriu la malaltia en la que es centren els estudis experimentals realitzats, la fibrosis hepàtica. En el segon capítol, la cèl·lula estelada hepàtica, es descriuen a nivell cel·lular els esdeveniments que donen lloc a aquesta malaltia. Per últim, en els últims dos capítols, s'introdueixen tant les catepsines B i D com la esfingomielinasa àcida, enzims en els quals s'han centrat els estudis.

1.1. Fibrosi hepàtica

1.1.1. Rellevància clínica de la progressió de la fibrosi hepàtica

La fibrosi hepàtica representa un gran problema mèdic amb una taxa significativa de mortalitat i morbiditat. La fibrosi hepàtica podria ser definida com una resposta de tancament de ferida o *wound healing* davant d'una varietat d'estímuls crònics d'origen tan divers com infeccions cròniques per agents virals (principalment pels virus de l'hepatitis B i C (VHB i C)), causes metabòliques, autoimmunes, infeccions per helmints, sobrecàrrega de ferro o coure, obstrucció biliar o pel consum crònic de tòxics com l'alcohol. A més, actualment cada cop hi ha més indicis de que l'esteatohepatitis no alcohòlica (EHNA) podria ser una altra causa de fibrosi hepàtica.

La fibrosi hepàtica es caracteritza per una excessiva deposició de proteïnes de la matriu extracel·lular (ME) que finalment condueix a la cirrosi hepàtica i la fallida total del fetge. La cirrosi, estat últim de la progressió de la fibrosi, es caracteritza específicament per la formació de nòduls regeneratius de parènquima envoltats i separats per septes de fibres, amb canvis significatius en la angio-arquitectura. Actualment, també està àmpliament acceptat que la capillarització dels sinusoides a causa de la deposició de fibres de la ME en l'espai de Disse juga un paper clau en la reducció progressiva de les funcions hepàtiques [1]. Per una altra banda, s'ha de tenir en compte que el desenvolupament de la fibrosi hepàtica està influenciat tant per causes genètiques com per factors ambientals (Taula 1). Estudis epidemiològics han identificat polimorfismes en un cert nombre de gens candidats que podrien participar en la progressió de la fibrosi hepàtica en humans [2].

L'impacte clínic de la progressió de la fibrogènesi es descriu millor amb els següents conceptes i xifres [3]:

- a) Actualment s'estima que un milió de pacients al món es troba afectat per alguna forma de malaltia hepàtica crònica.
- b) Dels pacients afectats per una malaltia hepàtica crònica, s'espera que del 25 al 30% desenvolupin una fibrosi i/o cirrosi.
- c) Dins de les malalties del tracte gastrointestinal, la cirrosi hepàtica és la causa de mort no neoplàsica més comuna a Europa i els EUA, i representa en total la setena causa més comuna de mort en els països desenvolupats.

- d) La cirrosi hepàtica està associada amb càncer de fetge primari, una patologia que augmenta significativament la taxa de mortalitat.
- e) Finalment, en la pròxima dècada es prediu un increment de les malalties hepàtiques cròniques, principalment associades amb la infecció crònica per VHC. Aquest fet farà que probablement disminueixi significativament la disponibilitat d'òrgans per a donacions, l'únic tractament resolutiu en aquests moments.

La progressió de la fibrosi cap a la cirrosi normalment es dona en com a mínim 10-15 anys. Tot i això, es pot donar de manera molt més ràpida (2-3 anys) en unes condicions concretes descrites com a fulminants, com per exemple en nens afectats per atresia biliar, pacients amb colestasi intrahepàtica familiar progressiva o pacients que han estat sotmesos a un transplantament hepàtic a causa d'una cirrosi per VHB o HC [4].

Tipus de malaltia hepàtica	Gens candidats	Gens candidats	Factors no genètics
Infecció crònica per VHC	HFE Angiotensinogen TGFβ1 TNF-α ApoE MEH MCP-1 MCP-2 Factor V	Gen hereditari de l'hemocromatosi Angiotensinogen Factor de creixement transformant β1 Factor de necrosi tumoral α Apolipoproteïna E Hidroxilasa epoxídica microsomal Proteïna quimioattractant de monòcits tipus-1 Proteïna quimioattractant de monòcits tipus-2 Factor V (Leiden)	Ingesta d'alcohol Coinfecció amb VIH i/o amb virus hepatitis B Edat en el moment de l'infecció aguda Trasplantament de fetge Diabetis mellitus Absència de resposta a la teràpia
Induïda per l'alcohol	IL-10 IL-1β ADH ALDH CYP2E1 TNF-α CTLA-4 TAP2 MnSOD	Interleucina 10 Interleucina 1β Alcohol deshidrogenasa Aldèhid deshidrogenasa Citocrom P450 2E1 Factor de necrosi tumoral α Antigen citotòxic de limfòcits T de tipus 4 Antigen processat associat a transportador de tipus 2 Manganès superòxid dismutasa	Ingesta d'alcohol Episodis d'hepatitis alcohòlica
EHNA	HFE Angiotensinogen TGFβ1	Gen hereditari de l'hemocromatosi Angiotensinogen Factor de creixement transformant β1	Edat Severitat de la obesitat Diabetis mellitus Hipertriglicèdèmia
Cirrosi biliar primària	IL-1β TNF-α ApoE	Interleucina 1β Factor de necrosi tumoral α Apolipoproteïna E	
Hepatitis autoimmune	HLA-II	Antigen humà leucocitari de tipus II	Hepatitis autoimmune de tipus II Absència de resposta a la teràpia

Taula 1: Factors genètics i no genètics associats amb la progressió de la fibrosi en diferents tipus de malalties hepàtiques cròniques [5].

1.1.2. Estímuls que indueixen la fibrosi hepàtica

Com ja hem mencionat, existeixen múltiples estímuls que es troben implicats en el desenvolupament de la fibrosi hepàtica. Entre ells destaquen el consum crònic d'alcohol i la EHNA [6].

1.1.2.1. Consum crònic d'alcohol

El consum crònic d'alcohol representa la causa principal de fibrosi hepàtica en els EUA. L'estrès oxidatiu està associat amb la fibrosi induïda per etanol. L'efecte profibrogènic de l'alcohol es pot donar mitjançant dos vies:

1. Per les espècies reactives de l'oxigen (ERO) durant el metabolisme de l'alcohol a través del Citocrom P450 2E1 (CYP2E1):

Les espècies reactives de l'oxigen es creu que estimulen la producció de ME per part de les cèl·lules estelades hepàtiques (CEH). De fet, s'ha descrit com l'estrès oxidatiu indueix l'expressió del col·lagen 1A1, un dels principals components de la ME [7]. La inhibició de l'activitat del CYP2E1 redueix la formació d'ERO i la generació de productes de peroxidació lipídica en animals intoxicats amb alcohol. La generació d'ERO a causa del metabolisme de l'alcohol també pot ser produïda per la NADPH oxidasa present en les cèl·lules de Kupffer. A més, les ERO poden activar les cèl·lules de Kupffer, augmentant així la producció de citocines proinflamatòries i profibrogèniques.

2. Per l'acció de l'acetaldehid, metabòlit primari de l'etanol:

Per altra banda, es sap que l'acetaldehid augmenta la transcripció del col·lagen, però encara es desconeix detalladament el mecanisme. S'ha descrit que en CEH tractades amb acetaldehid es dona un augment de la unió proteica del factor de transcripció BTEB a una regió rica en GC localitzada entre -1484 i 1476 del gen promotor del $\alpha 1(I)$ col·lagen [8].

1.1.2.2. Esteatohepatitis no alcohòlica (EHNA)

La esteatohepatitis no alcohòlica (EHNA) és una de les malalties hepàtiques amb un augment més gran de la incidència, especialment en els EUA. El model actualment més

acceptat de desenvolupament de l'EHNA és la hipòtesis dels “dos insults”. El “primer insult” seria el desenvolupament de la esteatosi hepàtica, molt sovint causada per una dieta rica en greixos i l'adquisició de resistència a la insulina. La generació de citocines proinflamatòries com el factor de necrosi tumoral- α (TNF- α) i la interleucina -6 (IL-6) portarien a un estrès oxidatiu que juntament amb la inflamació és el que es coneix com el “segon insult”. Com la fibrosi, l'EHNA es caracteritza també per una inflamació causada per neutròfils, arrodoniment i degeneració dels hepatòcits i alanina i aspartat aminotransferases elevades en sèrum. S'estima que del 20 al 40% dels pacients diagnosticats amb EHNA progressen cap a una fibrosi hepàtica i/o cirrosi, mentre que els pacients amb esteatosi únicament, sense el component inflamatori, no ho fan.

1.1.3. Desenvolupament de la fibrosi

Els hepatòlegs utilitzen el terme miofibroblast (MFs) per definir les cèl·lules profibrogèniques que es troben en fetges danyats crònicament (fibrosi/cirrosi) i expressen una sèrie d'antígens específics, el més àmpliament acceptat i característic dels quals és l' α -SMA (α -actina de múscul llis). La font cel·lular dels components de la ME ha estat motiu de controvèrsia durant els últims 15 anys. Actualment, evidències clíniques i experimentals indiquen que diferents tipus de MFs hepàtics són els que inequívocament contribueixen a la progressiva deposició de fibres de la ME. Una anàlisi immunohistoquímica sobre fetges fibròtics i cirròtics, tant en models experimentals com en biòpsies humanes, va concloure que existeixen com a mínim tres poblacions diferents de cèl·lules productores de ME, que poden ser definides com [9]:

1. Miofibroblasts portals/septals, cèl·lules amb un repertori idèntic que es localitzen tant a la part interna del septe fibròtic (MFs septals) com al tracte portal (MFs portals).
2. Cèl·lules estelades hepàtiques (CEH) o CEH/MFs, majoritàriament localitzades en els sinusoides capil·laritzats envoltats pels tractes portals expandits.
3. Miofibroblast de la interfície, localitzats essencialment en l'encreuament entre el septe fibròtic i el parènquima circumdant.

Si ens fixem en l'origen hepàtic de les diferents poblacions de MFs, a part de l'evident relació entre les CEH i CEH/MFs, s'han de subratllar els següents conceptes:

1. Els miofibroblasts portals/septals són probablement originats a partir de (mio)fibroblast portals.
2. Els miofibroblasts de la interfície, basant-se en el seu perfil d'antígens, són probablement originats a partir de CEH activades.
3. S'ha proposat recentment que els MFs (particularment els de la interfície i alguns septals) podrien ser també originats a partir de cèl·lules mare pluripotents derivades de la medulla òssia, les quals s'ha vist que poden empeltar-se en fetges crònicament danyats [10].

Independentment de l'origen, en condicions d'un dany hepàtic crònic totes les poblacions cel·lulars responsables de la producció de ME pateixen un procés anomenat activació. Aquests canvis morfològics i fenotípics han estat àmpliament estudiats en CEH obtingudes tant de fetges humans com de rata o ratolí, al ser cultivades en un substrat de plàstic. Sota aquestes condicions, les CEH pateixen una transdiferenciació des del seu fenotip original (fenotip d'acumulació de retinoids) cap a un fenotip activat similar al MF. Aquest fenotip de MF clàssicament inclou les següents característiques rellevants [11],[1]:

1. Elevada capacitat proliferativa.
2. Augment de la síntesi de components de la ME, particularment de col·làgens fibril·lars, així com de factors implicats en la remodelació de la ME.
3. Capacitat per migrar (resposta quimiotàctica).
4. Augment de la síntesi de factors de creixement (retroalimentació autocrina) i citocines proinflamatòries.
5. Contractilitat en resposta a components vasoactius.

Tot i que el model proposat en base als estudis *in vitro* pot representar una simplificació, es considera raonablement similar al que probablement estigui succeint *in vivo*.

1.1.4. Mecanismes de la fibrogènesi hepàtica

Els mecanismes capaços de provocar i mantenir la fibrogènesi hepàtica poden ser classificats de forma genèrica en tres grups principals:

- 1.1.4.1. Activació crònica de la reacció de tancament de ferida o *wound healing*.
- 1.1.4.2. Estrès oxidatiu
- 1.1.4.3. Alteració de les interaccions epitel·li-mesènquima.

1.1.4.1. Activació crònica de la reacció de tancament de ferida

L'activació crònica de la reacció de tancament de ferida és el mecanisme més comú i rellevant en la fibrogènesi hepàtica. A grans trets es caracteritza per:

1. Persistència del dany hepatocel·lular i colangiocel·lular amb un grau variable de necrosi i apoptosi.
2. Infiltrat inflamatori que inclou cèl·lules mononuclears i cèl·lules del sistema immune.
3. Activació de diferents tipus de cèl·lules productores de ME (CEH, miofibroblasts portals, etc).
4. Canvis en la qualitat i quantitat de la ME hepàtica, associats a una disminució o absència de la remodelació davant la presència d'un intent persistent de regeneració hepàtica.

Al llarg del temps s'han identificat diversos factors de transcripció i citocines en la reacció crònica de tancament de ferida que afecten el potencial profibrogènic de les CEH/MFs. Entre elles destaquen les adipocines, citocines predominantment secretades pels adipòcits, que tenen una implicació en processos de fibrosi hepàtica i en patologies com les malalties de fetge gras no-alcohòliques i l'EHNA. La leptina és secretada en pacients amb EHNA o altres tipus de malalties hepàtiques cròniques. La leptina exerceix diferents accions biològiques sobre les CEH, entre les que s'inclouen la inducció de la síntesi de col·lagen, l'estimulació de la proliferació cel·lular, la prevenció de l'apoptosi i la inducció de citocines proinflamatòries i proangiogèniques [12], [13]. Tot i aquestes dades, els estudis realitzats en pacients amb EHNA han estat incapaços de demostrar clarament una associació entre els nivells de leptina en plasma i el grau de fibrosi hepàtica. L'adiponectina, per contra, té un paper antifibrogènic directe, induint l'apoptosi de les CEH [14] tot i que encara no es coneix en profunditat el mecanisme molecular pel qual actua. Finalment, la resistina, que contribueix a la resistència a la insulina en ratolins, s'ha vist que pot modular les CEH humanes induint un fenotip proinflamatori [15].

El context d'excés de reparació que es dona en els processos típics de fibrosi és acompanyat moltes vegades d'una neoangiogènesi alterada o aberrant. La formació de nous vasos presenta diferents característiques en les malalties hepàtiques cròniques i en els últims temps s'ha vist que pot ser un factor clau en determinades patologies que progressen a cirrosi. Les CEH representen una diana per a múltiples accions del VEGF i de

l'angiopoïetina-1 entre els que s'inclouen l'estimulació de la síntesi de col·lagen de tipus 1 i el reclutament de les CEH [16]. Per altra banda i al mateix temps, les CEH/MFs, sota condicions d'hipòxia o dany hepàtic agut o crònic, són una font de citocines angiogèniques.

1.1.4.2. Estrès oxidatiu: ERO i altres intermediaris reactius

La implicació de l'estrès oxidatiu s'ha documentat en la majoria de malalties hepàtiques cròniques i models experimentals de fibrogènesi hepàtica. Com ja hem mencionat, aquest és probablement el mecanisme profibrogènic predominant en les malalties de fetge gras que inclouen tant l'esteatohepatitis no alcohòlica (EHNA) com l'esteatohepatitis alcohòlica. L'estrès oxidatiu en les malalties hepàtiques cròniques resulta tant de l'augment de la generació d'ERO i altres intermediaris reactius com de la disminució de l'eficiència dels antioxidants. Aquesta disminució implica no solament un efecte tòxic causat pel dany hepàtic crònic, sinó també una contribució a l'excés de la remodelació del teixit i la fibrogènesi.

Les ERO i altres mediadors reactius com 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE) són alliberats tant per cèl·lules inflamatòries activades com per hepatòcits, directa o indirectament (hepatòcits danyats). A més, l'estrès oxidatiu és capaç de promoure la mort de l'hepatòcit (necròtica i/o apoptòtica) presumiblement afavorint la transició de la permeabilitat mitocondrial. En algunes patologies, la generació d'ERO dins l'hepatòcit pot representar una resposta a un estat metabòlic alterat (com malalties de fetge gras no-alcohòliques i EHNA) o del metabolisme de l'etanol. En aquestes patologies les ERO són generades per la cadena de transport d'electrons mitocondrial o a través de la participació d'isoformes específiques del Citocrom P450, com el CYP2E1. Els mediadors de l'estrès oxidatiu alliberats per dany o activació de les cèl·lules veïnes poden afectar directament al comportament de les CEH/MFs humanes. S'ha descrit que tant les ERO com el HNE poden incrementar l'expressió de gens relacionats amb la fibrogènesi, com el procol·lagen tipus I, la MCP-1, i el TIMP-1. Aquest augment es dona possiblement a través de l'activació de vies de transducció de senyal i factors de transcripció, que inclouen l'activació de JNKs, AP-1 i, només per les ERO, NFκB [5]. S'ha vist també que les ERO poden modular positivament la proliferació de les CEH/MFs. Tot i això, existeixen dades contradictòries, obtingudes en CEH humanes, on les ERO i el HNE són incapços d'estimular el creixement cel·lular a dosi profibrogèniques baixes. Més aviat inhibeixen la síntesi basal de DNA o l'estimulada per PDGF, i fins hi tot poden induir la mort cel·lular.

Per altra banda, nivells baixos extracel·lulars de generació d'anió superòxid (però no de H_2O_2 o HNE), són capaços d'estimular la migració de CEH/MFs humanes a través de l'activació de la via de senyalització Ras/Erk [10]. A més, les CEH/MFs humanes i de rata poden generar ERO en resposta a diferents mediadors profibrogènics com l'angiotensina II, PDGF i adipocines com la leptina [17]. La generació d'aquestes ERO depèn en aquest cas de l'activació d'una NADPH oxidasa no fagocítica que s'ha detectat tant en CEH/MFs humanes com de rata. En aquest context, les ERO generades a l'interior de les CEH/MFs podrien estar actuant com una senyal profibrogènica. De fet, s'ha vist que la inhibició selectiva de la NADPH oxidasa redueix l'activació d'aquest fenotip [17]. Finalment, s'ha descrit que la fagocitosi dels cossos apoptòtics per part de les CEH/MFs provoca una generació d'ERO a través de la NADPH oxidasa que resulta en un augment de l'expressió del procol·lagen de tipus I [18].

1.1.4.3. Trastorns de les interaccions epiteli-mesènquima i la transició epiteli-mesènquima en colangiopaties

Totes les colangiopaties comparteixen unes característiques comunes com la coexistència de colestasi, la pèrdua per necrosi o apoptosi de colangiòcits (cèl·lules del conducte biliar), la proliferació de colangiòcits, la inflamació portal/periportal i la fibrosi. La intensa proliferació dels colangiòcits està associada amb canvis significatius en les cèl·lules mesenquimals properes, fibroblasts portals i CEH, i la matriu extracel·lular.

Els colangiòcits contribueixen activament a aquestes condicions patològiques secretant quimiocines (IL-6, TNF- α , IL-8, MCP-1) i factors profibrogènics (PDGF BB, ET-1, CTGF, TGF β 2). Tots aquests factors poden ser produïts també per cèl·lules de l'infiltrat immune (cèl·lules inflamatòries o mesenquimals) i poden afectar tant als colangiòcits com a les cèl·lules mesenquimals, fibroblasts portals i CEH, cosa que manté la resposta fibrogènica. Recentment s'ha suggerit que la iniciació de les colangiopaties pot donar-se per una transició epiteli-mesènquima que involucra els colangiòcits i la senyalització per TGF β [19].

1.1.5. Reversió de la fibrosi hepàtica

Clàssicament sempre s'havia pensat que la fibrosi hepàtica era un procés irreversible. Tot i així, evidències recents indiquen que fins i tot les fibrosis avançades poden revertir. La

resolució espontània de la fibrosi hepàtica es pot donar després de tractar amb èxit la causa subjacent de la malaltia. Aquestes observacions han estat descrites en pacients amb sobrecàrrega de ferro o coure, dany hepàtic induït per alcohol, hepatitis crònica C, B i D, hemocromatosis, cirrosi biliar secundària, EHNA i hepatitis autoimmune [5]. Una reversió significativa pot trigar anys a donar-se i depèn molt de la causa subjacent que provoca la malaltia hepàtica i la seva severitat d'aquesta. La infecció crònica per VHC ha estat la més estudiada observant-se que una teràpia amb un aclariment viral resulta en una millora de la fibrosi hepàtica.

Durant la reversió de la fibrosi hepàtica el número de CEH activades disminueix i la integritat del teixit es restableix. Aquesta disminució de les CEH es pot donar per dos processos [20]:

1. La reversió de l'activació de les CEH: Encara es desconeix el mecanisme pel qual les CEH poden revertir *in vivo* a un estat quiescent. Tot i així, s'ha observat que les CEH que es fan créixer sobre una membrana basal (Matrigel) es mantenen en un estat quiescent, i al cultivar-hi en elles CEH altament activades, disminueix la seva activació.
2. L'eliminació selectiva de les CEH per apoptosi: L'apoptosi de les CEH es dona probablement per una disminució de la seva activació durant la resolució de la fibrosi [21]. S'ha descrit en CEH activades l'aparició de receptors de superfície com el Fas [22] o el receptor del factor de creixement nerviós (NGFR) [23], que al unir-se als seus lligands poden estimular l'apoptosi d'aquestes cèl·lules [1]. Per altra banda però, després d'un dany hepàtic, l'apoptosi pot ser inhibida per factors solubles i components de la matriu extracel·lular que es generen a causa d'aquest dany. Factors de supervivència com el factor de creixement de la insulina tipus -I (IGF-1) o el factor de necrosi tumoral- α (TNF- α) promouen la supervivència de les CEH via PI3K/c-Akt o via NF κ B, respectivament. A més, molècules que regulen la degradació de la matriu extracel·lular es troben estretament vinculades a la supervivència i l'apoptosi de les CEH. S'ha vist que l'activitat de la metal·loproteasa -2 (MMP-2) correlaciona estretament amb la de les CEH apoptosi [24]. Oposadament, la inhibició de la MMP-2 per l'acció de

l'inhibidor tissular de la metal·loproteasa 1 (TIMP-1) bloqueja l'apoptosi d'aquestes cèl·lules [25].

1.1.6. Aproximacions terapèutiques al tractament de la fibrosi hepàtica

Actualment no existeix un tractament estàndard per a la fibrosi hepàtica. Tot i que estudis experimentals han revelat dianes terapèutiques per prevenir la progressió de la fibrosi en models murins (Taula 2), l'eficàcia de molts d'aquests tractaments encara no ha estat provada en humans. Això és conseqüència de la necessitat de dur a terme estudis de llarga durada amb biòpsies hepàtiques en sèrie per determinar els canvis en la fibrosi de forma acurada. La teràpia antifibròtica ideal seria una teràpia fetge-específica, ben tolerada quan s'administra durant períodes llargs de temps i efectiva al atenuar l'excés en la deposició de col·lagen, sense que es doni una afectació en la síntesi de matriu extracel·lular normal. Actualment existeixen diverses estratègies terapèutiques possibles en fase d'estudi.

1.1.6.1. Eliminació de l'agent causal

L'eliminació de l'agent causal de la fibrosi és de moment la intervenció més efectiva en el seu tractament. Aquesta estratègia ha estat efectiva en moltes etiologies de malalties hepàtiques cròniques.

1.1.6.2. Agents anti-inflamatoris

Ja que la inflamació precedeix i promou la progressió de la fibrosi hepàtica, l'ús d'antiinflamatoris s'ha estudiat intensament. Els corticosteroides només estan recomanats pel tractament de la fibrosi en pacients amb hepatitis autoimmune i hepatitis aguda per alcohol [26].

1.1.6.3. Antioxidants

Els antioxidants com la vitamina E [27], silimarina [28], fosfatidilcolina [29], i S-adenosil-L-metionina [30] inhibeixen l'activació de les CEH, protegint els hepatòcits de l'apoptosi i atenuant la fibrosi hepàtica experimental. Els antioxidants exerceixen efectes beneficiosos en pacients amb malalties hepàtiques induïdes per l'alcohol o en EHNA.

1.1.6.4. Teràpies basades en citocines i transducció de senyal

La disrupció de la síntesi de TGF β i/o la seva ruta de senyalització prevé la formació de fibra en fibrosis hepàtiques experimentals [31]. Actualment també estan sent estudiats fàrmacs que poden inhibir vies de transducció de senyal implicades en la fibrogènesi hepàtica. Entre ells s'inclouen la pentoxifilina (inhibidor de la fosfodiesterasa), amilorida (inhibidor de la bomba Na⁺/K⁺) i l'àcid S-farnesiltiosalicílic (antagonista Ras). Lligands de PPAR α i /o PPAR γ com les tiazolindiones tenen efectes beneficiosos en fibrosis hepàtiques experimentals i en pacients amb EHNA [32]. La inhibició del sistema renina-angiotensina s'ha demostrat segura al ser administrada durant períodes llargs de temps. El bloqueig del receptor de la endotelina 1 tipus A i l'administració de vasodilatadors (prostaglandina E2 i donadors de l'òxid nítric) exerceixen una activitat antifibròtica en models murins, tot i que l'efecte sobre els humans encara és desconegut [33].

1.1.6.5. Teràpies dirigides contra la matriu extracel·lular

Una aproximació alternativa és la inhibició de la producció de col·lagen i/o l'estimulació de la seva degradació. Inhibidors de la prolil-4-hidroxilasa i l'halofungizona prevenen el desenvolupament de la cirrosi hepàtica experimental al inhibir la síntesi de col·lagen [34], [35].

1.1.6.6. Herbes medicinals

Diferents compostos d'herbes tradicionalment utilitzats en països asiàtics pel tractament de malalties hepàtiques han demostrat la seva eficàcia com a tractaments antifibròtics [2]. Entre ells s'inclouen *Sbo-saiko-to* [36], Glicirizina [37] i *Salvia miltiorrhiza* [38].

Agent	Principal mecanisme	Efectes antifibròtics sobre les CEH	Efectes antifibròtics en fibrosi experimental	Efectes antifibròtics en humans
Inhibidors de l'angiotensina	Inhibició de l'activació de les CEH	Dades positives consistents	Dades positives consistents	Estudi retrospectiu
Colquicina	Inhibició de la resposta inflamatòria	Dades limitades	Dades limitades	Resultats discrepants
Corticosteroides	Inhibició de la resposta inflamatòria	Dades limitades	Dades limitades	Efectiu en hepatitis autoimmunc
Inhibidors de l'endotelina	Inhibició de la funció de les CEH	Dades limitades	Dades limitades	Sense testar
Interferó- α	Inhibició de l'activació de les CEH	Dades positives consistents	Dades positives consistents	Efectiu en hepatitis C crònica
Interleucina 10	Inhibició de la resposta inflamatòria	Dades limitades	Dades positives consistents	Descripció aïllada en hepatitis C crònica.
Pentoxifilina	Inhibició de l'activació de les CEH	Dades positives consistents	Dades positives consistents	Sense testar
Fosfatidilcolina	Disminueix l'estrès oxidatiu	Dades limitades	Dades positives consistents	No hi ha proves en fibrosi induïda per alcohol
Antagonistes PPAR	Inhibició de l'activació de les CEH	Dades positives consistents	Dades positives consistents	Descripció aïllada en EHNA
S-adenosil-L-metionina	Antioxidant	Dades limitades	Sense testar	Efectiu en fibrosi induïda per alcohol
<i>Sbo-saikoto</i>	Antioxidant	Dades positives consistents	Dades positives consistents	Descripció aïllada en hepatitis C crònica
Inhibidors del TGF β 1	Inhibició de l'activació i la funció de les CEH	Dades positives consistents	Dades positives consistents	Sense testar
Tocoferol	Antioxidant	Dades positives consistents	Dades limitades	Descripció aïllada en EHNA

Taula 2: Principals fàrmacs en desenvolupament pel tractament de la fibrosi hepàtica [5].

1.2. La cèl·lula estelada hepàtica

1.2.1. Història i nomenclatura

Al llarg de la història les cèl·lules estelades hepàtiques han tingut una nomenclatura ben diversa. Van ser descrites per primer cop el 1876 per Carl von Kupffer com a *Sternzellen*. Von Kupffer va observar, durant estudis sobre el sistema nerviós hepàtic, cèl·lules intralobulars en forma d'estel que es tenyien de negre amb clorur àuric, mètode utilitzat per revelar nervis. Més tard, el 1951, Toshio Ito va observar per microscòpia de transmissió cèl·lules perisinusoidals que contenien vesícules lipídiques en fetges humans. Posteriorment, el 1958, Suzuki va observar cèl·lules en forma d'estel a l'espai de Disse i les va anomenar cèl·lules intersticials. Finalment el 1971, Kenjiro Wake va concloure que les cèl·lules originalment descrites com a *Sternzellen* per von Kupffer eren idèntiques a les descrites posteriorment per Ito i per Suzuki. Wake també va demostrar que tant l'autofluorescència de les vesícules lipídiques com la reactivitat al clorur àuric eren causades de la presència de vitamina A. Ben aviat van aparèixer els primers articles que relacionaven les cèl·lules estelades amb la fibrosi hepàtica. Degut a la seva història, durant anys aquestes cèl·lules van ser anomenades amb més de 20 noms diferents, els més coneguts dels quals van ser cèl·lules perisinusoidals, cèl·lules de Ito, lipòcits, cèl·lules parasinusoidals o cèl·lules emmagatzemadores de greix. Va ser el 1995, quan la comunitat internacional d'investigadors que treballaven amb aquest tipus cel·lular van recomanar unificar la nomenclatura i anomenar-les cèl·lules estelades hepàtiques (CEH).

1.2.2. Descripció

1.2.2.1. Localització

Les CEH representen del 5-8% de les cèl·lules hepàtiques en un fetge normal. En un fetge de rata hi ha 13 CEH per 100 cèl·lules parenquimals, mentre que en un humà n'hi ha aproximadament 10 cèl·lules per cada 100 hepatòcits. Les CEH es troben localitzades en l'espai subendotelial, entre la superfície basolateral de l'hepatòcit i la banda anti-luminal de les cèl·lules endotelials sinusoidals (Figura 1).

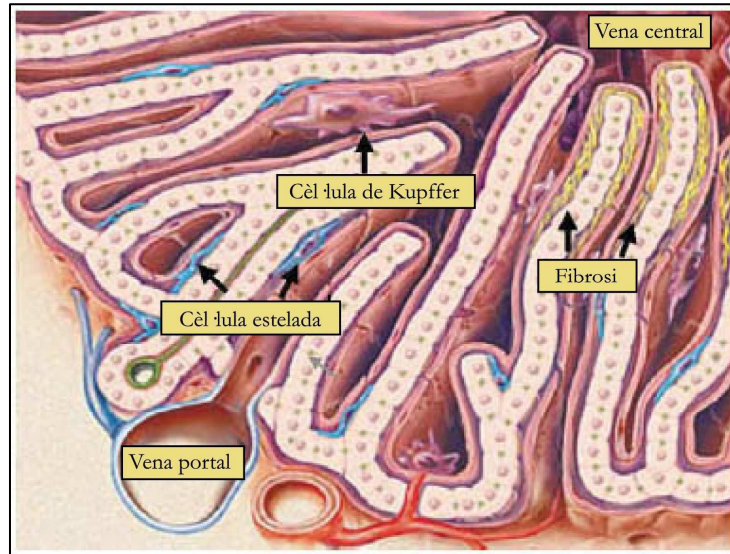


Figura 1: Arquitectura sinusoidal i localització de les CEH. En un fetge normal els cordons d'hepatòcits estan envoltats per la paret endotelial fenestrada. A l'espai de Disse es troben les CEH (blau). Les cèl·lules de Kupffer (porpra) són típicament intrasinusoidals. L'activació de les CEH condueix a una acumulació de matriu extracel·lular (bandes grogues). Figura modificada de [1].

1.2.2.2. Morfologia i ultraestructura

La CEH es distribueix de forma discreta a dins del fetge amb una distància mitjana entre cèl·lules de 40 nm [39]. Ultraestructuralment, les CEH tenen un reticle endoplasmàtic rugós moderat, un petit complex de Golgi i un sistema d'extensions dendrítiques citoplasmàtiques prominent. Aquestes extensions citoplasmàtiques mostren nombrosos filaments i microtúbuls. Ocasionalment, s'hi observen vesícules pinocítiques. Gràcies a aquestes prolongacions citoplasmàtiques les CEH estableixen contactes amb un gran nombre d'hepatòcits, CEH adjacents, cèl·lules endotelials i terminacions nervioses. Recentment s'ha descrit que aquestes projeccions juguen un paper essencial en la transmissió d'estímuls quimiotàctics a l'aparell mecànic de la cèl·lula que genera la força contràctil. Una CEH normalment es troba envoltada de més de dues cèl·lules endotelials properes. A la banda antiluminal de la cèl·lula s'extenen múltiples processos a través de l'espai de Disse que contacta amb els hepatòcits. Aquest contacte íntim entre les CEH i les cèl·lules veïnes facilita el transport de mediadors solubles i citocines. A més, les CEH es troben adjacents a terminacions nervioses, la qual cosa és consistent amb la trobada de receptors de neurotrofina en aquestes cèl·lules [40] i amb els estudis funcionals que confirmen la seva resposta neurohumoral [41], [42].

El citoplasma perinuclear conté vesícules lipídiques de vitamina A o retinoids, el nombre i diàmetre de les quals varia entre espècies i condicions fisiològiques. Aquestes vesícules lipídiques emeten fluorescència en el rang del verd quan són excitées amb una longitud d'ona de 328 nm. La fluorescència per vitamina A és més concentrada en les regions periportals del fetge que en les pericentrals [43], [44]. S'han descrit dos tipus de vesícules de vitamina A. Les vesícules de tipus I són vesícules electrodenses delimitades per una membrana i de mida variable, normalment inferior a 2 µm de diàmetre. Aquestes vesícules probablement deriven dels cossos multivesiculars, que són considerats un tipus de lisosomes. Les vesícules de tipus II no estan embolcallades de membrana i són més grans, poden arribar fins a les 8 µm. La relació entre les vesícules de tipus I i de tipus II i les seves diferències funcionals encara no són clares.

1.2.2.3. Cicle cel·lular de les CEH

La CEH té la capacitat de dividir-se tant *in vivo* com *in vitro*. Tot i així, en un fetge de rata normal, la proliferació cel·lular testada tant per timidina tritiada com per incorporació de bromodeoxiuridina és rara, cosa que indica que la majoria de CEH són cèl·lules de vida llarga en estat G₀. La vida mitja de les CEH quiescents *in situ* és desconeguda. Després d'una hepatectomia parcial, lesions hepàtiques focals, desenvolupament de granulomes o sota diverses condicions que condueixen a la fibrosi, s'ha detectat *in vivo* una considerable activitat proliferativa de les CEH.

1.2.2.4. Origen embriològic de les CEH

L'origen embriològic de les CEH és controvertit. Actualment la majoria d'evidències coincideixen en un origen a partir de l'endoderm o del *septum transversum* [45]. En suport a l'origen a partir del *septum transversum*, les CEH expressen un factor de transcripció del mesoderm Foxf1, el qual es localitza típicament en el mesènquima del *septum transversum* durant el desenvolupament del fetge. Per altra banda, en suport a l'origen a partir de l'endoderm, es suggereix que les CEH i els hepatoblasts comparteixen un origen comú basat en la coexpressió de citoqueratines en ambdós tipus cel·lulars. En la passada dècada també es va hipotetitzar sobre un origen a partir de la cresta neural basat en l'expressió de diversos marcadors de la cresta neural entre els quals s'inclouen, la proteïna àcida fibril·lar de la glia (GFAP), la nestina, les neurotrofines i els seus receptors, la N-CAM, la sinaptofisina i el factor de creixement nerviós (NGF) entre d'altres. Tot i així, un estudi de

mapatge de cèl·lules derivades de la cresta neural en fetges de ratolí va desmentir aquesta hipòtesi al no localitzar CEH en aquests fetges durant la gestació tardana [46].

1.2.2.5. Heterogeneïtat i plasticitat de les CEH

Les CEH tenen una gran heterogeneïtat i plasticitat en el fetge adult a nivell de fenotip i característiques morfològiques. La desmina, un filament intermedi típic de cèl·lules contràctils, ha estat un dels marcadors principals per identificar CEH en fetges murins. Tot i així, s'ha descrit que en zones pericentrals el 50% de les CEH no expressen desmina, mentre que si l'expressen en les zones periportals. L' α -SMA és una de les sis isoformes d'actines que s'expressen en els teixits dels mamífers. La seva presència és típica de cèl·lules vasculares del múscul llis i miofibroblasts. La inducció de l' α -SMA, és un dels marcadors més fiables d'activació de les CEH, ja que aquest marcador no es troba en altres cèl·lules residents del fetge, excepte en les cèl·lules del múscul llis que envolten els vasos grans. També s'han observat diferències a nivell de les característiques morfològiques de les CEH, ja que una fracció significant de CEH podrien no emmagatzemar vitamina A.

Aquestes observacions sobre la plasticitat de les CEH han portat a la conclusió que, més que un únic tipus cel·lular amb idèntica composició a nivell de retinoids i citoesquelet, les CEH contenen una quantitat variable de vitamina A i una combinació diferent de filaments intracel·lulars. Aquest fet depèn de factors com la localització lobular, les espècies estudiades, si el fetge es troba en un estat normal o ha patit un dany i la natura mateixa del dany (biliar *versus* parenquimal). A més, es donen canvis continus en l'expressió de gens durant l'activació de les CEH, ja que de cèl·lules quiescents passen a ser cèl·lules activades i després continuen evolucionant a cèl·lules similars als miofibroblasts. Tot i així, les CEH activades són diferents dels miofibroblasts en el seu contingut en vitamina A, l'activitat contràctil i la capacitat de resposta enfront citocines, particularment el TGF β . Fins i tot quan les CEH entren en senescència, el patró de la seva expressió genètica continua evolucionant amb l'adquisició d'un fenotip més inflamatori i menys fibrogènic.

1.2.3. Funcions de la CEH al fetge normal

1.2.3.1. Paper en el desenvolupament del fetge i la seva regeneració

Les CEH es poden trobar dins del nínxol de cèl·lules progenitores en fetges normals i regenerants, el qual es troba situat prop dels canals de Hering [47]. La importància funcional d'aquestes cèl·lules es basa en l'evidència que cèl·lules Thy 1⁺ derivades de fetge fetal de ratolí, les quals expressen marcadors clàssics de CEH (α -SMA, desmina i vimentina), promouen la maduració dels progenitors hepàtics a través del contacte cèl·lula-cèl·lula en cultiu. A més, les CEH també poden ser vitals per a la generació dels conductes biliars intrahepàtics durant el desenvolupament [48]. Per altra banda, també existeixen evidències creixents que les CEH són fonamentals en la resposta regenerativa hepàtica en el fetge adult. Recentment s'ha identificat la senyalització per neurotrofina com una via paracrina de les CEH, que contribueix al creixement hepatocel·lular seguit del dany. Aquesta contribució es dona en part a través de la secreció del factor de creixement hepatocel·lular (HGF) per les CEH [45]. Existeix un número de mitògens potencials dels hepatòcits secretats per les CEH, entre els que s'inclouen HGF, factor de creixement epidèrmic (EGF), epimorfina i pleiotropina. Tot i així, la contribució relativa i les formes de regulació durant la regeneració hepàtica encara no estan ben definits.

1.2.3.2. Metabolisme dels retinoids

En fetges normals, les CEH juguen un paper fonamental en el magatzem i transport dels retinoids (compostos de vitamina A). En condicions fisiològiques normals, aproximadament del 50 al 80% dels retinoids totals del cos són emmagatzemats al fetge, dels quals del 80 al 90% s'emmagatzemen a les CEH. La majoria de la vitamina A s'emmagatzema en vesícules citoplasmàtiques en forma de retinil ésters, predominantment retinil palmitat. La composició d'aquestes vesícules depèn de la ingesta per la dieta. Aquestes vesícules no només contenen retinoids, sinó que també tenen una quantitat significativa de triglicèrids, fosfolípids, colesterol i àcids grassos lliures. El retinol procedent de la dieta és esterificat amb àcids grassos lliures de cadena llarga a l'epiteli intestinal, i empaquetat en quilomicrons pel seu transport en la circulació a través de sistema limfàtic. En el fetge, el retinol contingut en els quilomicrons és captat pels hepatòcits i després transferit a les CEH pel seu emmagatzemament. Només una petita quantitat d'aquest retinol es manté dins de l'hepatòcit. Dins dels hepatòcits, els retinil ésters són hidrolitzats a retinol lliure abans de ser transferits a les CEH. Aquest procés es dona gràcies a la proteïna

d'unió al retinol (RBP). Les CEH poden captar els retinoids d'unió a RBP directament de la circulació sanguínia i també es pot donar un alliberament directe de retinoids d'unió a RBP des de les CEH al plasma. L'emmagatzematge i el transport dels retinoids es troba influenciat pel nivell de vitamina A de l'animal.

El paper biològic dels retinoids en la regulació de l'activació de les CEH encara no està del tot clar. Tot i que la pèrdua de retinoids és una de les característiques més importants que acompanyen a l'activació de les CEH tant *in vivo* com *in vitro*, encara es desconeix si aquest procés és un prerequisite perquè es doni aquesta activació. Les dades sobre els efectes dels retinoids sobre les CEH i la fibrogènesi són contradictoris [45]. En cultiu s'ha vist que tant el retinol com l'àcid retinoic (RA) inhibeixen la proliferació de CEH, sent l'RA 1000 vegades més potent que el retinol. Per contra, el 9-cis-RA i el 9,13-di-cis-RA, dos metabòlits secundaris de l'RA, promouen la fibrosi per un augment de l'activador del plasminògen, el qual indueix l'activació i la producció de TGF β [49].

1.2.3.3 Immunoregulació

Les CEH poden amplificar la resposta inflamatòria induint la infiltració de leucòcits mono i polimorfonuclears. Les CEH activades produeixen quimiocines entre les quals s'inclouen MCP-1, CCL21, RANTES i CCR5. També expressen *toll-like* receptors (TLRs), la qual cosa indica la seva capacitat per interactuar amb el lipopolisacàrid bacterià (LPS). Finalment, les CEH poden funcionar com a cèl·lules presentadores d'antigen professional estimulants la proliferació de limfòcits o l'apoptosi [50], [51].

1.2.4. Activació de les CEH

Després d'un dany hepàtic de qualsevol etiologia les CEH pateixen una resposta anomenada activació, la qual implica la transició d'un fenotip quiescent a un fenotip similar al miofibroblast proliferatiu, profibrogènic i contràctil (Figura 2). L'activació de les CEH es dona en una seqüència reproducible. L'organització de l'activació de les CEH en una seqüència temporal ens dona un marc on els esdeveniments cel·lulars poden donar-se en un context biològic diferenciat. Les fases de l'activació es poden dividir en iniciació, perpetuació i resolució.

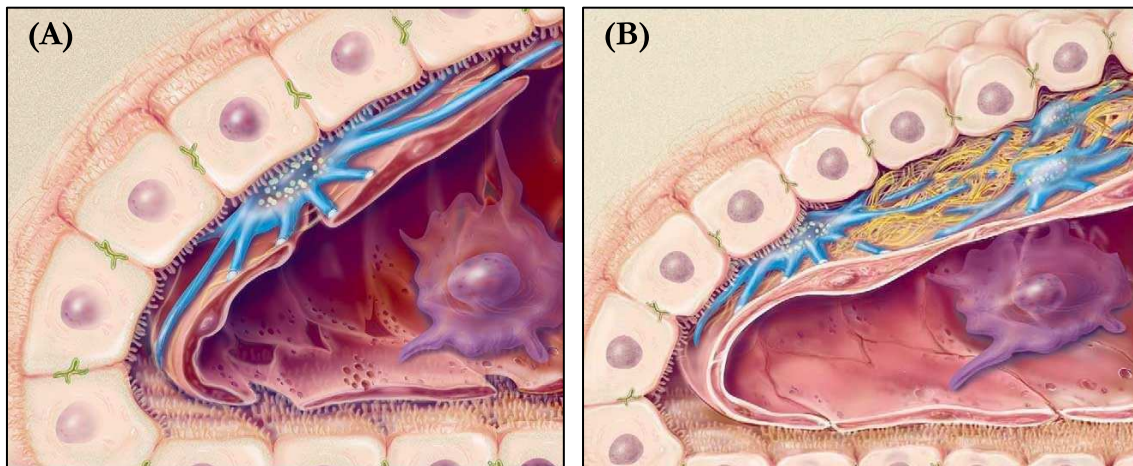


Figura 2: Canvis subendotelials que acompanyen al dany hepàtic durant l'activació de les CEH. (A) Arquitectura sinusoïdal normal amb una CEH (en blau). Només la matriu de baixa densitat es present en aquest estat. (B) Durant el dany hepàtic, les CEH es multipliquen i són envoltades per l'acumulació de matriu extracel·lular fibril·lar. Figura modificada de [1].

1.2.4.1. Iniciació

La iniciació, també referida com estat pre-inflamatori, engloba canvis ràpids a nivells transcripcional i la inducció immediata de gens primerencs. Això resulta en una estimulació paracrina a causa dels canvis primerencs en la matriu extracel·lular i dels efectes perjudicials que el dany hepàtic causa en l'homeostasi de les cèl·lules veïnes, principalment hepatòcits danyats, cèl·lules endotelials i cèl·lules de Kupffer. Les cèl·lules de Kupffer estimulen la síntesi de matriu extracel·lular, la proliferació cel·lular i l'alliberament de retinoids en les CEH a través de l'acció de citocines (especialment el $TGF\beta$) i d'espècies reactives de l'oxigen (ERO) i lípids peroxidats. Al igual que les cèl·lules de Kupffer, els hepatòcits també són una font potent d'ERO i lípids peroxidats, que exerceixen una estimulació paracrina sobre les CEH. L'activitat de les ERO és amplificada *in vivo* per la disminució d'antioxidants que es dona típicament en malalties hepàtiques. S'ha descrit que CEH en cultiu amb medi condicionat procedent d'hepatòcits sotmesos a estrès oxidatiu augmenten la seva proliferació i la síntesi de col·lagen. A més, l'apoptosi dels hepatòcits contribueix també a l'activació de les CEH a través de Fas. Les cèl·lules endotelials juguen un paper dual en els estats primerencs de l'activació de les CEH. El dany sobre les cèl·lules endotelials estimula la producció de fibronectina (isoforma EIIIA), que té un efecte activador sobre les CEH i transformen el $TGF\beta_1$ latent en actiu, forma profibrogènica, a través de l'activació de la plasmina.

1.2.4.2. Perpetuació

La perpetuació de l'activació de les CEH implica respostes fenotípiques causades per l'efecte de l'augment de citocines i la remodelació de la matriu extracel·lular. La matriu extracel·lular de baixa densitat és progressivament substituïda per una matriu rica en fibres de col·lagen (Figura 2). Aquest fet afecta tant el comportament dels hepatòcits com el de les cèl·lules endotelials i accelera l'activació de les CEH. Aquest efecte es dona gràcies a les interaccions amb les integrines (receptors clàssics de la matriu extracel·lular) i els receptors tirosin cinases (RTKs) com el DDR-2 [52], [53].

Les CEH activades adopten un fenotip diferenciat similar al miofibroblast que es caracteritza per (Figura 3):

- a) Capacitat proliferativa: L'augment del número de CEH en un fetge danyat es dona en part per la proliferació local en resposta a factors de creixement. El factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF) és un dels factors proliferatius més potents i millor descrits en la fibrosi hepàtica [54]. El dany es troba associat a l'augment autocrí tant del PDGF com del seu receptor. L'activació del receptor de PDGF recluta la molècula senyalitzadora Ras, que seguidament activa la via de senyalització ERK/MAPK. L'activació de la fosfoinositol-3-cinasa, que és independentment de la via d'activació de ERK, també és necessària per la mitogènesi i la quimiotaxi. La resposta proliferativa de PDGF requereix també una entrada sostinguda de Ca^{2+} i un augment del pH intracel·lular [55]. Existeixen altres compostos amb activitat mitogènica en CEH com VEGF, EGF, TGF- α , trombina i el seu receptor, entre d'altres [56].

- b) Contractilitat: L'adquisició de la contractilitat per part de les CEH és responsable en part de l'augment de la resistència portal durant la fibrosi hepàtica. L'endotelina-1 (ET-1) és un estímul fonamental en la contractilitat de les CEH que també regula la seva proliferació. L'augment de l'ET-1 es dona en part de forma autocrina. A l'hora que augmenta la producció d'ET-1 també es dona un augment de l'enzim convertidor d'endotelina, el qual activa l'ET-1 latent. Els receptors d'ET tipus A i tipus B s'expressen tant en CEH quiescents com en CEH activades. L'efecte proliferatiu d'ET-1 en CEH quiescents correlaciona amb un augment de l'activitat Ras/ERK, que pot ser bloquejat per agonistes del receptor ET-A. Per contra,

l'efecte d'inhibició del creixement generat per ET-1 en les CEH activades es dona a través del receptor ET-B per la via prostaglandina/cAMP que condueix a una regulació a la baixa de ERK i c-Jun cinasa (JNK). Existeixen altres estímuls que controlen la contractilitat, entre els que trobem: òxid nítric, angiotensinògen II, eicosanoids, pèptid natriurètic atrial, somatostatina i monòxid de carboni entre d'altres [45].

- c) Fibrogènesi: Les CEH generen fibrosi no només incrementant el número de cèl·lules sinó també augmentant la producció de matriu extracel·lular per cèl·lula. TGF β és l'estímul dominant en la producció de matriu extracel·lular per les CEH. Existeixen moltes fonts de generació per a aquesta citocina, però l'expressió autocrina és la més important. La senyalització per sota del TGF β inclou una família bifuncional de molècules conegudes com Smads [57]. L'activitat del TGF β en CEH activades també augmenta a causa de la proteòlisi del TGF β latent per l'activador del plasminògen tipus urocinasa. L'augment de la síntesi de col·lagen però, no es pot atribuir íntegrament a l'acció del TGF β , sinó que també hi intervenen mecanismes transcripcionals i post-transcripcionals. El factor de creixement del teixit connectiu (CTGF/CCN2) és també un potent factor fibrogènic per les CEH i s'ha descrit un augment de la seva expressió en casos de hipertriglicèridèmia i hiperinsulinèmia [58].
- d) Degradació de la matriu extracel·lular: La fibrosi reflexa un desequilibri entre la producció de matriu extracel·lular (ME) i la seva degradació. Un element fonamental en la remodelació de la matriu extracel·lular són les matriu-metal·loproteases, enzims dependents de calci que degraden específicament substrats col·lagenats i no-col·lagenats. En termes generals, les matriu-metal·loproteases es poden dividir en 5 categories basades en la seva especificitat de substrat:
1. Col·lagenases intersticials: MMP-1, -8, -13.
 2. Gelatinases: MMP-2, -9 i proteïna activadora del fibroblast.
 3. Estromielisines: MMP-3, -7, -10, -11.
 4. Tipus membrana: MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25.
 5. Metal·loelastases: MMP-12.

Les CEH són la font principal de MMP-2, MMP-9, MMP-13 (equivalent en ratolins a MMP-1) i estromielisina. Aquestes metal·loproteases degraden la ME subendotelial normal. A mida que es dona la degradació de la ME normal, aquesta és reemplaçada per fibres de col·lagen, principalment de tipus I, les quals activen el creixement de les CEH activades i la producció de MMP-2 en un bucle de retroalimentació positiu. En tot aquest escenari també juguen un paper fonamental els inhibidors tissulars de metal·loproteases-1 i -2 (TIMP-1 i -2) produïts per les CEH. Gràcies a aquests inhibidors, les CEH activades poden inhibir l'activitat de les col·lagenases intersticials que degraden el col·lagen de tipus I, cosa que afavoreix l'acumulació de fibra.

- e) Quimiotaxi: La migració dirigida de les CEH activades afavoreix la seva acumulació en àrees de dany. PDGF i MCP-1 han estat identificades com quimioatracients per a CEH activades, però no quiescents [59].
- f) Pèrdua de retinoids: Com ja s'ha indicant anteriorment, la pèrdua intracel·lular de vitamina A és una característica important de l'activació de les CEH. Encara no està clar si la pèrdua de retinoids és necessària per l'activació de les CEH i quins retinoids poden accelerar o prevenir l'activació *in vivo*. Els metabòlits secundaris com l'àcid retinònic (RA), 9-cis RA i 9,13-di-cis RA poden estimular l'activació del TGF β latent, estimulants així l'activitat fibrogènica.
- g) Alliberació de citocines i quimioatracció de leucòcits: L'augment en la producció i/o activitat de les citocines és fonamental per a la perpetuació de l'activació de les CEH. Les CEH poden amplificar també la resposta inflamatòria alliberant quimioatracients de neutròfils i monòcits com la MCP-1 [60].
- h) Resistència a l'apoptosi: la resistència a l'apoptosi és una de les característiques principals de les CEH activades. S'ha descrit com les CEH humanes activades són resistents als estímuls apoptòtics a causa de la sobreexpressió de Bcl-2 [61]. Per altra banda, també s'ha vist com l'expressió de TIMP-1 pot inhibir l'apoptosi d'aquestes cèl·lules [25].

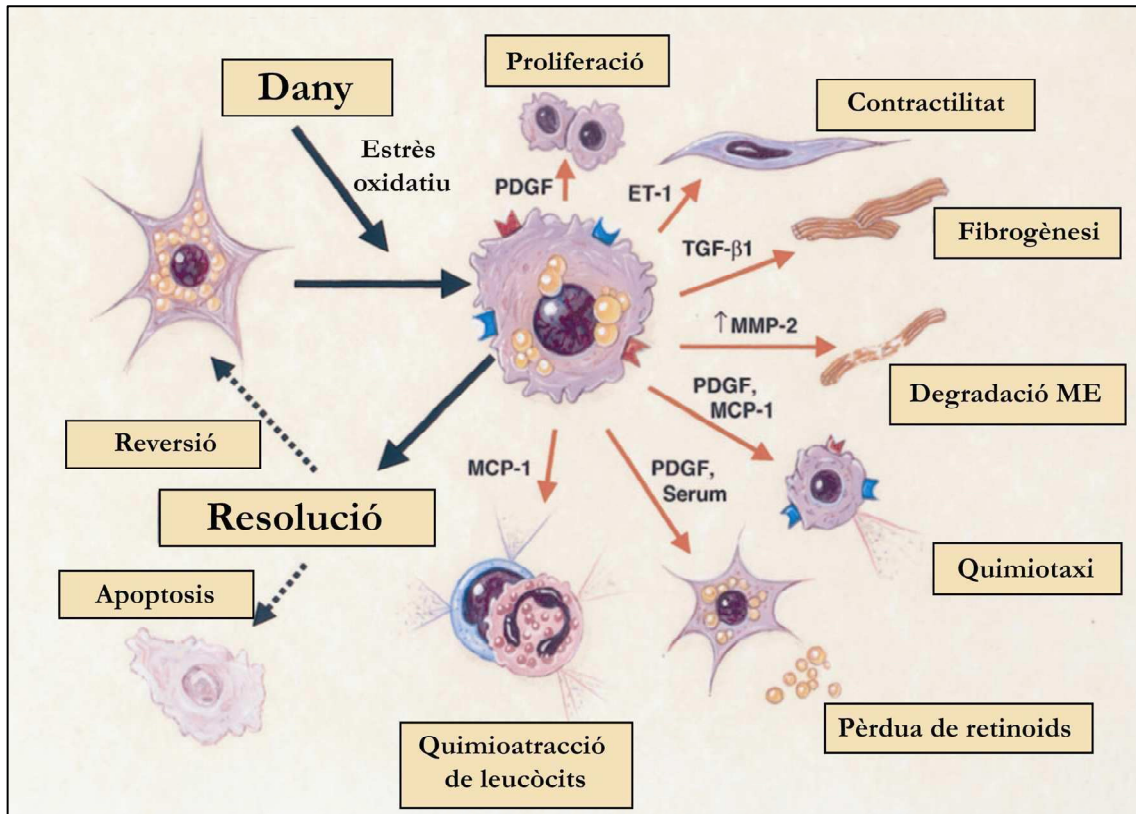


Figura 3: Característiques fenotípiques de l'activació de les CEH durant el dany hepàtic i la resolució. Figura modificada de [55].

1.2.4.3. Resolució

Durant la recuperació d'un dany agut en fetges humans o a nivell experimental, el número de CEH activades disminueix i la integritat del teixit es restableix. Existeixen dos vies per a la reducció de les CEH activades, la reversió al fenotip quiescent o l'apoptosi de les CEH activades. Tot i que la reversió del fenotip es pot aconseguir *in vitro*, no ha estat validada *in vivo*. Pel que fa a l'apoptosi de les CEH, existeixen moltes evidències que donen suport a la seva importància durant la regressió de la fibrosi. En cultiu, les CEH són sensibles a CD95-L i a l'apoptosi induïda per TRAIL. Les cèl·lules NK poden induir l'apoptosi de les CEH a través de l'expressió de TRAIL. El NGF derivat dels hepatòcits també té un efecte apoptòtic sobre les CEH. L'apoptosi requereix d'una degradació proteasomal intacta, ja que la seva inhibició prevé l'apoptosi [45].

1.3. Catepsines

Les catepsines són enzims proteolítics. Existeixen 5 tipus catalítics d'enzims proteolítics en mamífers (aspartat, cistein, metal·lo, serina i treonin proteases) que regulen diversos processos biològics normals com la mort cel·lular, la proliferació, la migració, la invasió i el recanvi de proteïnes. Les catepsines s'expressen de forma abundant i en totes les cèl·lules de mamífer. Tradicionalment s'han considerat mediadors lisosomals en el recanvi de proteïnes. De fet, les catepsines són un dels grups d'enzims proteolítics lisosomals més nombrosos. La família de les catepsines comprèn tres grups: serin catepsines (catepsina G), cistein catepsines, compostat per onze enzims (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W i X), i les aspartil proteases com les catepsines D i E. Les catepsines exhibeixen activitat endo i exopeptidasa. Es sintetitzen com a pro-enzims inactius, són glicosilades post-transcripcionalment i dirigides cap al compartiment lisosomal pel reconeixement del receptor manosa 6-P. El processament des de la proforma inactiva a la forma catalíticament activa de l'enzim es dona normalment dins del lisosoma. L'activitat de les catepsines es regula per diferents mecanismes com la regulació de la síntesi, el processat del zimògen, la inhibició per inhibidors endògens i l'estabilitat del pH [62]. Les catepsines són actives als pH baixos que es troben als lisosomes, però s'ha vist que es mantenen actives a pH neutre durant temps limitats. L'acidificació del citosol durant l'apoptosi pot perllongar la vida de les catepsines alliberades procedents dels lisosomes [63].

A més del seu paper en el recanvi de proteïnes dins del lisosoma, s'ha vist que les catepsines també regulen altres processos com la remodelació de la matriu extracel·lular, la remodelació de l'ós, l'apoptosi [64] i el càncer. Actualment també s'ha descrit que les catepsines poden desenvolupar les seves funcions tant intra com extracel·lularment. Aquesta introducció abordarà concretament la cistein catepsina B i l'aspartil catepsina D, proteases expressades ubiquament i sobre les que es centrarà part d'aquesta tesi.

1.3.1. Cistein catepsines

Les cistein catepsines són peptidases que pertanyen a la família de les papaïnes i tenen una llarga història que data del 1940, any en que la catepsina C va ser descoberta. Algunes cistein catepsines com la catepsina B s'expressen constitutivament, mentre que d'altres com la K i la S, s'expressen en tipus cel·lulars altament específics, com els osteoclasts i les

cèl·lules immunitàries respectivament. Col·lectivament, les cisteïna catèpsines participen en nombrosos processos fisiològics i patològics. Moltes d'aquestes funcions específiques han estat confirmades i/o descrites gràcies a estudis amb ratolins modificats genèticament, deficientes en aquestes proteïnes o *knock-out*. Les cisteïna catèpsines s'han implicat en l'activació de proteïnes precursors (proenzims i prohormones), presentació d'antigen pel complex d'histocompatibilitat de tipus II (MHC-II) [65], remodelació de l'ós, diferenciació dels queratinòcits, cicle del cabell, reproducció i apoptosi. També s'ha vist que participen en la progressió dels tumors i la metastasi, malalties inflamatòries, aterosclerosi [66] i la periodontitis. Així doncs, mutacions en els gens de les catèpsines resulten en malalties hereditàries en humans, com per exemple la picnodisostosi a causa de mutacions en el gen de la catèpsina K, o els síndromes de Papillon-Lefevre i Haim-Munk per defectes en el gen de la catèpsina C.

1.3.1.1. Catèpsina B

Estructura:

La catèpsina B (catB, E.C.3.4.22.1.) és una proteïna de 30 kDa bilobular que conté dos dominis, esquerre i dret. El centre actiu i l'esqueleta del lloc d'unió del substrat es troben localitzats en la interfície entre aquests dominis. El tall en el pèptid és catalitzat pel residu cisteïna (Cys 29) que es troba en el domini esquerre, el qual interacciona amb un residu histidina (His 199) localitzat en el domini dret (Figura 4).

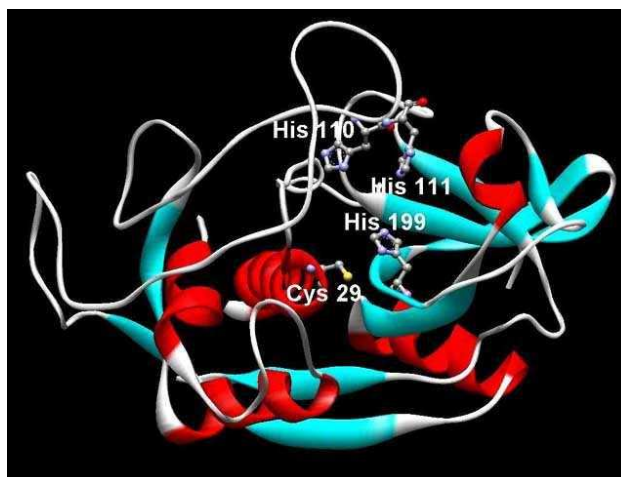


Figura 4: Estructura de raigs X de la catèpsina B humana [67].

L'accés del substrat al centre actiu està controlat per una inserció de 18 residus (Pro 107-Asp124) que és coneguda com a bucle oclusiu. Aquest proveeix de dos residus His

(His110 i His 111) per a la unió dels grups carboxílics C-terminals del substrat. Això explica la preferència per l'activitat carboxipeptidasa de l'enzim. Tot i això, la catepsina B també pot actuar com a endopeptidasa, ja que el bucle oclusiu és flexible i pot separar-se de l'esclatxa del lloc actiu quan se l'hi uneix un substrat. Sembla que l'estabilitat del bucle oclusiu és dependent del pH, amb activitat endopeptidasa a pH neutre (típicament en llocs d'unió de membrana o catepsina B extracel·lular) i exopeptidasa a pH àcid (interior dels lisosomes) [68], [69]. Això suggereix que els substrats de la catepsina B difereixen dependent de la localització de l'enzim.

Funció i implicacions patològiques:

La catepsina B és activa a nivell intracel·lular i extracel·lular en quasi tots els teixits dels organismes superiors [70]. Intracel·lularment la catepsina B es localitza als lisosomes, mentre que extracel·lularment es pot trobar en forma soluble o bé unida a la membrana o a proteïnes de la matriu extracel·lular, on pot desenvolupar importants funcions fisiològiques. Per exemple, la catepsina B s'ha implicat en la síntesi de tiroxina, en el processament selectiu de la prorenina humana i d'antígens (preferencialment en cèl·lules Th2 activades) i l'autoprotecció dels limfòcits T durant la degranulació.

A més de les seves funcions fisiològiques, la catepsina B s'ha implicat en una varietat de malalties que impliquen estats de remodelació del teixit, com poden ser la inflamació, infeccions parasitàries o víriques, Alzheimer [71], mort neuronal per isquèmia i tumors metastàtics [72]. En lesions malignes i premalignes, l'expressió de la catepsina B es veu molt augmentada. Aquest fet s'ha descrit en una gran varietat de càncers com pròstata [73], colorectal, mama [74], colon [75], esofàgic [76], oral [77], gàstric, pulmó [78], ovari [79] i tiroides, així com en una gran varietat de carcinomes, gliomes i melanomes. A més, els nivells elevats de catepsina B en sèrum han estat associats amb estats avançats del tumor i la progressió de la malaltia, mentre que la taxa de supervivència ha estat inversament correlacionada amb el ratio d'activitat de la catepsina B [80], [81]. L'augment en l'expressió de la catepsina B es dona a molts nivells, que inclouen l'amplificació del gen, l'augment de la transcripció, la utilització de promotors alternatius i l'ús de *splicing* alternatiu per incrementar els nivells i l'estabilitat de l'ARNm i de la catepsina B en si mateixa [82].

L'activitat de la catepsina B és controlada per uns inhibidors endògens específics (estefines i cistatines) [83]. En condicions fisiològiques normals existeix un balanç entre les

proteases i els seus inhibidors, la pèrdua del qual es creu que promou la progressió del tumor i pot ser un índex de la seva capacitat invasiva [84]. Per altra banda, nivells elevats de catepsina B s'han relacionat directament amb la degradació de proteïnes de la matriu extracel·lular, entre les quals s'inclouen la fibronectina, la laminina i el col·lagen de tipus IV [85]. Indirectament, aquests nivells elevats activen altres enzims que formen una cascada proteolítica, contribuint així a la metàstasi i a la progressió del tumor.

La catepsina B també s'ha vist implicada en la mort cel·lular per apoptosi a través de la senyalització per TNF- α dins de l'hepatòcit [86]. Dins d'aquesta ruta de senyalització, la catepsina B s'alliberaria al citosol de l'hepatòcit, on activaria l'alliberament del Citocrom C del mitocondri [87]. El mecanisme de permeabilització del lisosoma encara no està clar i s'ha atribuït tant a l'acció de l'esfingosina, que augmenta en fetge per TNF- α [88], [89] com a l'acció dels àcids grassos lliures [90], [91], que estimulen l'expressió del TNF- α . En el primer model de permeabilització proposat, l'esfingosina indueix canvis conformacionals i d'activitat al unir-se a la catepsina B. Aquests canvis promouen la proteòlisi de la membrana intralisosomal i causen la desestabilització del lisosoma [88]. Per altra banda, el segon model, desenvolupat en models murins de malalties de fetge gras no alcohòliques, proposa els àcids grassos lliures com a l'estímul desencadenant de la translocació de Bax des del citosol a la membrana lisosomal, on causa la permeabilització del lisosoma [92], [93], [94]. La permeabilització d'altres orgànuls, com el mitocondri, per part de Bax ja ha estat àmpliament estudiada [91].

A més del paper que la catepsina B pot desenvolupar en les malalties de fetge gras no alcohòliques, també s'ha descrit la seva implicació en altres malalties hepàtiques com la fibrosi, concretament en el model experimental de lligadura del conducte biliar en rata [95] i ratolí [96], [97]. Canbay *et al.* van descriure una disminució de la fibrosi hepàtica induïda per lligadura del conducte biliar en ratolins deficients en catepsina B i ratolins salvatges tractats amb un inhibidor per aquesta proteïna, en front a ratolins salvatges no tractats. Aquest efecte sobre la fibrosi hepàtica va ser atribuït a l'atenuació del dany de l'hepatòcit [98], [97] que pot activar les CEH indirecta o directament. Indirectament, l'apoptosi de l'hepatòcit genera una resposta inflamatòria que causa l'activació de les CEH [99], mentre que la captació de cossos apoptòtics directament per part de les CEH també pot induir la seva activació [18], [100].

1.3.2. Aspartil peptidases

Les aspartil peptidases són un grup d'enzims proteolítics que formen part de la família de les pepsines. Concretament, les catepsines D i E formen part de la família A1 d'aspartil peptidases. Aquesta família comprèn la majoria d'aspartil endopeptidases que es troben al cos humà. De les 6 aspartil peptidases documentades en el cos humà, tres (pepsina A, gastricina i renina) són secretades i tenen ben definits els seus papers fisiològics. Els sucus gàstrics contenen pepsina A i gastricina, mentre que la renina es troba als ronyons i a la sang. La quarta peptidasa, la catepsina D, es troba ubiqüament als lisosomes, mentre que la cinquena, la catepsina E, es troba al reticle endoplasmàtic/Golgi i a compartiments endosomals de les cèl·lules. La última aspartil peptidasa de la família és la beta secretasa, localitzada al cervell. Les aspartil peptidases s'han vist implicades en processos com l'apoptosi, la progressió dels tumors [101], la metastasi, l'angiogènesi, l'hemostasia, les malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer [102] i l'aterosclerosi.

1.3.2.1. Catepsina D

Estructura

La catepsina D (catD, E.C.3.4.23.5) consta de dos lòbuls separats per una escaleta que conté el lloc catalític compost per dos residus aspartat. La catepsina D pot allotjar més de 8 residus aminoacídics en l'escaleta del lloc catalític i té preferència pels residus hidrofòbics. És sintetitzada al reticle endoplasmàtic com a procatepsina D. Després de l'eliminació del pèptid senyalitzador, la procatepsina D (52 KDa) és dirigida cap a estructures vesiculars intracel·lulars (lisosomes, endosomes i fagosomes). La procatepsina D és una glicoproteïna amb dos oligosacàrids units a manosa-6-P (M6P) en els residus asparagina 70 i 199 que faciliten el seu direccionament cap als lisosomes. Existeix una altra via de direccionament de la procatepsina D als lisosomes independent de M6P, que implica a una proteïna precursora de l'activació dels esfingolípid, la prosaponina [103]. Aquesta última via encara no es comprèn completament. Dins dels compartiments endosomals i lisosomals es dona un tall d'un propèptid de 44 aminoàcids N-terminal que resulta en una cadena única o *single chain* de 46 KDa, la forma activa de l'enzim. Més talls proteolítics que no produeixen la dissociació de l'estructura globular de la catepsina D donen lloc a la proteasa activa

madura lisosomal, composta per una cadena pesada (32 KDa) i una lleugera (14 KDa), unides per interaccions no covalents (Figura 5).

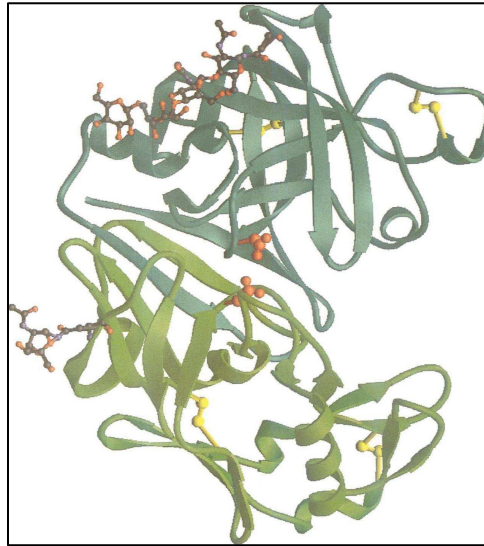


Figura 5: Representació de la catepsina D [104].

Les cistein proteases [105] i l'activitat autocatalítica [106] de la catepsina D poden provocar el processament de la procatepsina D a catepsina D. Tot i això, cal mencionar que recentment ha estat descrita la independència de la maduració de la catepsina D de la seva activitat autocatalítica [105]. Existeixen altres factors que poden afectar el processament de la catepsina D, entre els quals s'inclouen segons missatgers lipídics com la ceramida i la prosaposina [107]. En condicions normals, la procatepsina D es localitza als lisosomes. En canvi, sota certes condicions patològiques o fisiològiques la procatepsina D/catepsina D pot eludir el seu mecanisme de direccionament i ser secretada a l'exterior cel·lular. La procatepsina D és una de les proteïnes secretades més nombroses en molts tipus de càncer. També s'ha vist que la procatepsina D secretada pot ser endocitada via receptors M6P o altres receptors encara desconeguts, tant en cèl·lules canceroses com en fibroblasts. L'endocitosi de la procatepsina D comporta una maduració en un intermediari de 46 KDa i dues formes de 32 i 14 KDa [108], [109]. L'expressió i l'activitat de la catepsina D també s'ha detectat en la matriu extracel·lular [110].

Funció i implicacions patològiques

La funció principal de la catepsina D és el catabolisme intracel·lular de proteïnes dins del compartiment lisosomal. Tot i això, la catepsina D s'ha implicat en altres processos com el processament d'antígens, hormones i neuropèptids. A més, s'ha vist relacionada amb

patologies com malalties del teixit connectiu, distrofia muscular [111], canvis degeneratius del cervell i Alzheimer [71], càncer i metàstasi [112], aterosclerosi [113] i apoptosi [114], [107], [115].

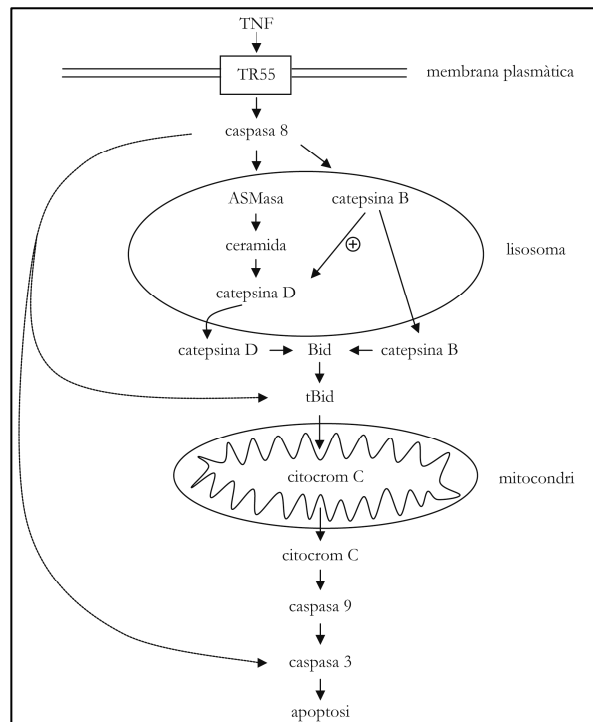


Figura 6: Implicació de la catepsina B i D en l'apoptosi. Figura modificada de [114], [87].

El paper de la catepsina D en l'apoptosi encara no es coneix totalment. S'ha postulat que la catepsina D pot actuar tant prevenint [116] com promovent l'apoptosi induïda per agents citotòxics [112]. La catepsina D pot estar implicada en l'apoptosi induïda per estrès oxidatiu [89] on l'esfingosina podria estar permeabilitzant la membrana intralisosomal, desestabilitzant així el lisosoma i promovent l'alliberació de la catepsina D al citosol, al igual que s'ha vist amb la catepsina B. Heinrich *et al.* van descriure la participació de la ceramida, producte derivat de l'activitat de l'esfingomielinasa àcida, com a un activador de la catepsina D i promotor de l'apoptosi, seguint l'esquema de la Figura 6 [107], [114]. Així doncs, l'alliberament de la forma madura de la catepsina D al citosol comporta un alliberament del Citocrom C del mitocondri dependent de Bid. Durant l'apoptosi es dona l'acidificació del citosol a pH 6.7-7 [63], la qual cosa pot facilitar l'activació de la CtsD. S'ha descrit la capacitat de la CtsD de promoure l'apoptosi en el citosol a pH 7.0 [117]. Per altra banda, es pensa que els substrats amb elevada afinitat per la CtsD poden estabilitzar la conformació activa de la CtsD a pH neutre [118] de forma similar a com ho fa la Pepstatina A, inhibidor de la CtsD [119]. Per últim, Heinrich *et al.* van descriure la colocalització de Bid amb CtsD en vesícules similars a endosomes, suggerint així que el tall de Bid provocat per la CtsD podria donar-se en compartiment específics dins del citosol [114].

1.4. Esfingomielinases

1.4.1. Els esfingolípids

Els esfingolípids de membrana contenen una cadena llarga de base esfingoide, com l'esfingosina, un grup amida unit a una cadena llarga d'àcids grassos i un cap amb un grup polar. Depenent d'aquest grup polar es defineixen diverses classes d'esfingolípids, ceramides si es tracta d'un grup hidroxil, esfingomielina si és una fosforilcolina i glicoesfingolípids si són carbohidrats. Els esfingolípids desenvolupen importants funcions estructurals en el manteniment de la fluïdesa i la integritat de les membranes cel·lulars. En els darrers anys però, s'ha vist que els esfingolípids no són únicament components de la membrana, sinó que esfingolípids com la ceramida, l'esfingosina i l'esfingosina-1P també poden actuar com a segons missatgers en el creixement, la supervivència i la mort cel·lular [120], [121]. De forma similar, el metabolisme dels esfingolípids també s'ha vist implicat en el càncer. Concretament la generació de ceramida i el seu catabolisme estan sent analitzats com a noves dianes terapèutiques en quimoteràpia [122], [123], [124].

1.4.2. Els metabolisme dels esfingolípids

La ceramida intracel·lular es pot formar per dues rutes, la via de síntesi *de novo* al reticle endoplasmàtic i pel catabolisme de l'esfingomielina depenent de l'enzim esfingomielinasa (Figura 7). La síntesi *de novo* de la ceramida requereix l'acció coordinada de la serin palmitoil transferasa i la ceramida sintasa. Aquest procés comença amb la condensació de la serina i la palmitoil-CoA per formar 3-cetoesfinganina, la qual és després reduïda a la base esfingoide esfinganina per l'enzim 3-cetoesfinganina reductasa i posteriorment acetilada per la ceramida sintasa per generar dihidroceramida. Paral·lelament a aquesta via, l'esfingosina alliberada per la degradació seqüencial d'altres complexos esfingolipídics pot ser reutilitzada per a la síntesi de ceramida. La segona ruta de síntesi de la ceramida és la que implica a les esfingomielinases. Les esfingomielinases, amb la seva activitat fosfolipasa C, poden hidrolitzar l'enllaç fosfodiéster de l'esfingomielina generant així ceramida.

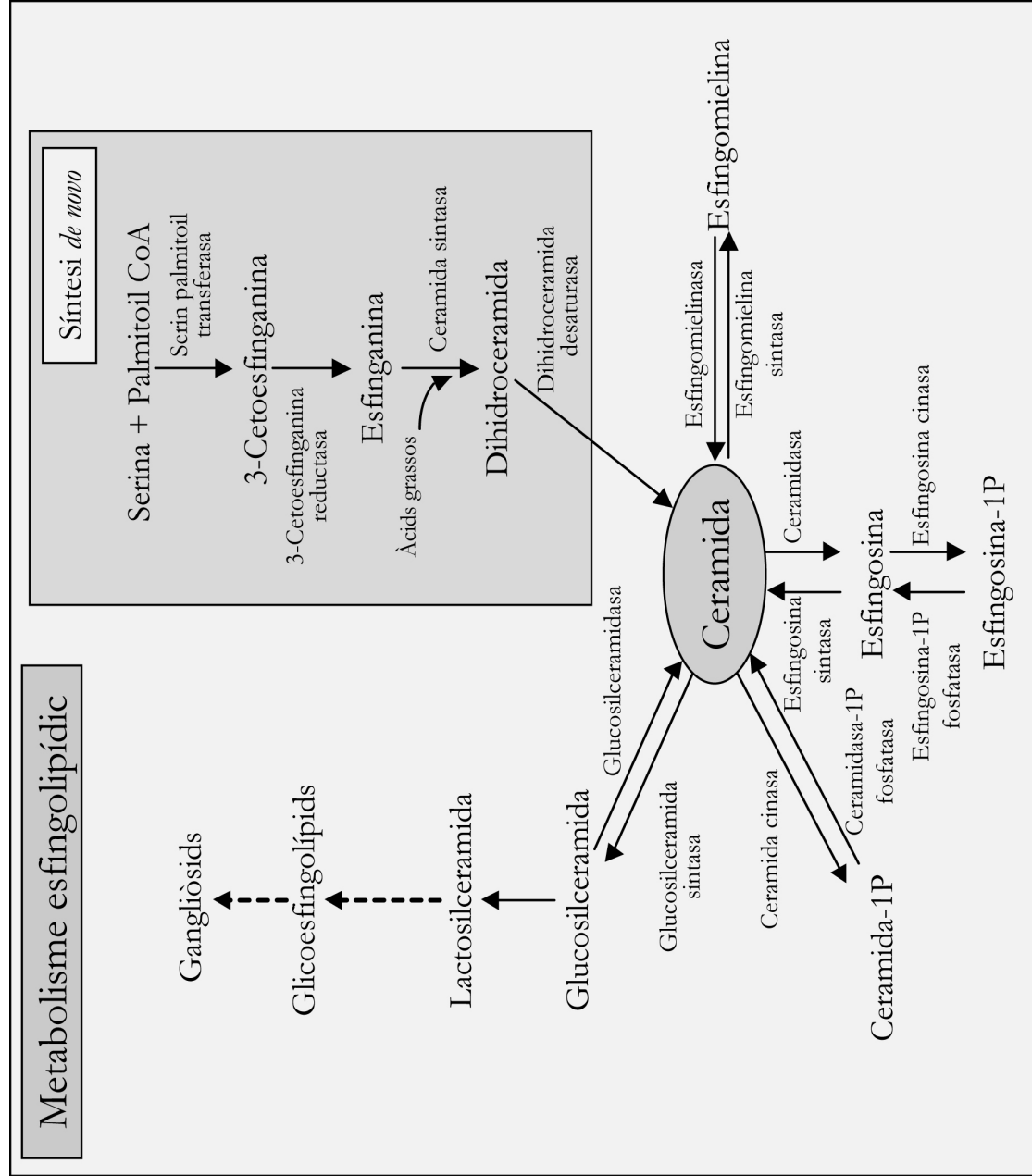


Figura 7: Representació esquemàtica del metabolisme dels esfingolípids. Figura modificada de [125].

1.4.3. Aspectes generals de les esfingomielinases

Han estat caracteritzades vàries isoformes d'esfingomielinases (SMasas, E.C.3.1.4.12) que poden ser classificades en funció del seu pH òptim d'actuació. L'SMasa neutra (NSMasa) es localitza a les membranes i el seu pH òptim d'actuació és 7.4 [126]. Per altra banda, l'SMasa àcida (ASMasa) es va considerar originalment un enzim estrictament lisosomal ja que el seu pH òptim d'actuació és 4.5-5.0. Malgrat això, isoformes d'ASMasa han estat identificades en vesícules a prop de la membrana plasmàtica, i s'ha descrit la seva secreció extracel·lular. També s'ha descrit una forma d'ASMasa de membrana en microdominis rics en esfingomielina (cavèoles), on la interleucina 1 β estimula l'activitat de l'ASMasa. Així doncs, existeixen tres localitzacions d'ASMasa: l'ASMasa lisosomal, responsable del metabolisme de l'esfingomielina, l'ASMasa secretada, associada a la inflamació i resposta a l'estrès i l'ASMasa activada per receptor. Recentment s'ha descrit que l'ASMasa es transloca a la membrana plasmàtica després de l'activació de diversos receptors de la superfície cel·lular, com CD95 (Fas) i CD40. Un cop a la membrana hidrolitza esfingomielina generant ceramida [127].

1.4.4. Esfingomielinasa Neutra (NSMasa)

Estructura

S'han descrit tres formes d'esfingomielinasa neutra (NSMasa) en mamífers (Figura 8) l'NSMasa1 [128], l'NSMasa2 [129] i l'NSMasa3 [130], totes tres dependents de Mg²⁺. L'NSMasa1 és una proteïna que té una massa molecular de 47.5 KDa en ratolins i 47.6 KDa en humans, i presenta dos dominis transmembrana en el lloc C-terminal. S'ha descrit la seva localització a nivell de reticle endoplasmàtic [131] i nucli [132]. L'NSMasa2 és una proteïna específica de cervell amb una massa molecular predita de 71 KDa amb dos dominis transmembrana a la part N-terminal i el lloc catalític a la regió C-terminal [129]. L'NSMasa3 té una massa molecular predita de 97.8 KDa, i presenta una absència del pèptid senyal N-terminal i una regió hidrofòbica en la part C-terminal que constitueix el domini transmembrana [130]. L'NSMasa3 s'expressa de forma abundant en múscul estriat i cardíac.

```

nSMase3 (1) MTTFGAVAEWRLPSLRRATLWIQWFQAKKAI FNSPLEAAMAFPHLQQPSFLLASLKADSINKPFAQOQODLYKVI EDFFPAKELITTFPWVESIFGSLDG
nSMase2 (1) MVLYTTFFPNSLSALHCVSWALIFPCWAVDRFAASFIPTYE
nSMase1 (1)

nSMase3 (101) -VLVGNLRLCLGRVNFVEYSIVVEFLDPGGEEMKIVMKLQVEDYKDFDFVSLPGPVKASIQECILPDSPLYHNKVOITPTGGGLGNLALNFEYITTF
nSMase2 (45) KRQRDDPCCLLLCTAIFTFYIALLVASLFAFAFGLFWPLQSARRFVYLSRLEDKGLAGGAALLS-----EKKGLG-----GKSGCEA
nSMase1 (1)

nSMase3 (200) FALSLLTQKFLPVSLHVRTDCAYFIVDRYLSWFLPTEGSPPLSLSPGGLSPPPPTPAIPFASYGLHTSLLVKSHIQHTSVNADPSSHIIWRSE
nSMase2 (128) TAVNCLLPDSLARVNNIFNIOARAKEIGQIRNGAARPKIKIYIDSPINTSIAASFSSIVSPCGGDGVAVAVPGSIRRTASVEYKGDGGRHPGDAANG
nSMase1 (1) MKLNFSLRLRIFNINCVIPIYLSKFRADRMRLGDFLNQESFLLILLLEVVSS

nSMase3 (300) TLLVIVFEMWLHHYSLEMYCKMOSPHAKLEVLHYRLSVSSALYSPAOESLCAIHAYQESFTPTEEHVLVVRLLKHHAFANSKPIQASPSAHSHITSP
nSMase2 (228) PASGDPVSSSEEDACIIRIGGEEGRPPEADDPVEGGQRNCGGGERGCTPNINQDGDGSLGSPASRESLTKGRAEPTDSAGGEPGNSKLLKKA
nSMase1 (54) QDFVYLRQKLSFTVPAAHFPGSGIIESGICVFSKHEIQELTCHIIYTLNGYPYIHHGGWESGKAVGLLVHISCHVNLNAYVTHHAEYNRQKDIYLAHRV

nSMase3 (400) LEEFRRAVVPFRVQOKLIVFVQHCGRHWPLDASFRVLEMLLSYLQPVRYAPKORPGSDSQPRCVSEKAWPFVQENLLMYTKLFGVFLNRAVTRDVLSP
nSMase2 (328) SVVKKAAARRRRHPDEADHEVSAFFPANLDFICLQEVFDKRAATKLKEQLHGYFEYLIDVVG-----V-----YGCQGCCFKCINSGLLIFA
nSMase1 (54) KQAELEAQPFIHHTSKKADVILCCDLNMHPDIDGCCLLKERTGLHDVLETRDEKCSSEGN-----T-----MVPKNCVVSQQLKFFPEFV

nSMase3 (500) KHALVVERVAKVAPFNLAEMTQKGEQLELSEFVIHRCRLRFTPTPTGSLSPWFPAVLDSEFKKSHYSLGQDCKYTPFCFPEATLVLRLLAQ
nSMase2 (411) SRYPTMDVYHCPFKKNDAAASKGALFTKVMGSPQDQRTMGYIACHLHAPCEDSATRCQQLDILQDWLDFPKTSSSAAAPDE-----LVAFD
nSMase1 (236) RIDYVLYKAVSGEYISLCKSFETTS----FDHSGTFLSDEHAAVMTLVRHSPDQNPESRHPAERSPLMCIYK-EAWTELGLGMAQARWWATFASVY

nSMase3 (600) ITQAKHTAKSLDQCEESPAGHSFISVNLGFSMDTNGSYTANDLDEMGQDSYRKTDEYFELKAEYLBQIFRSEAQRQFTIALCTTQDEN----GKKK
nSMase2 (506) VVCEDFNFDNCSDDKLEQOHSLETHYRDRCRGPGEKPAAGTLLDTNGLYDEIVCTPDNCKVLESEGRREYLAFTSKSSGKGRKELLKGNCR
nSMase1 (331) IGLLELLLLALQVLAAGGGAGEAAILLWTPSIVGLVLRWAGAYVPHVQEVNGLYRAQAEIQHVLSRAREQDVGFPQ--SAILLIGQESDR----TKED

nSMase3 (695) IPDCIVGEDGLILTPLRYQIINGRRFEIEYQGDDELQPRSYEIASLVRTLFRLLSSAINHRFAGQMAALCSRDDFLGSCFRYHLTEPGLASRHLLSPV
nSMase2 (606) IDYMHAEELGCPDWKEVEEFSFTQLSGLTDHLLVAMRMVSSGEEEE
nSMase1 (424)

nSMase3 (795) GRRQVAGHTRGPRLSLRLFLGYSYRTLVSLLLAFFVASLFCVGPLPCTLLTLGYVLYASAMTLLTERGKHLQP
nSMase2 (656)
nSMase1 (424)

```

Figura 8: Comparació de la seqüència predita de l'NSMasa3 amb les seqüències de l'NSMasa1 i l'NSMasa2 (número d'accés del GenBank™ NP_003071 i NP_0061137, respectivament). La posició dels aminoàcids es troba numerada a l'esquerra. L'ombrejat gris indica els aminoàcids idèntics o similars i el negre els altament conservats [130].

Implicacions patològiques

La implicació de l'NSMasa1 en possibles rutes de senyalització és encara confusa. Tot i que l'NSMasa1 posseeix activitat esfingomielinasa *in vitro*, les cèl·lules que sobreexpressen la proteïna no pateixen canvis en el metabolisme de la esfingomielina. A més, l'estimulació de l'expressió de l'NSMasa1 amb TNF- α o H₂O₂ no provoca un augment dels nivells de ceramida ni induïx apoptosi [128]. Per altra banda, s'ha descrit que l'NSMasa1 actua *in vivo* com una fosfolipasa C, amb preferència pel substrat liso-factor activador plaquetari [133]. L'NSMasa2, en canvi, s'ha implicat en processos com l'apoptosi, la inflamació, la proliferació i la diferenciació cel·lular [126]. Per últim, l'NSMasa3 es distribueix principalment al reticle endoplasmàtic i a l'aparell de Golgi i s'activa ràpidament en resposta a TNF- α [120].

1.4.5. Esfingomielinasa Àcida (ASMasa)

Estructura

L'ASMasa és una glicoproteïna monomèrica de 72 KDa. L'ASMasa és sintetitzada com una preproproteïna de 75 KDa que és transformada al RE/Golgi a la forma precursora de 72 KDa. Aquest precursor és processat a la forma madura lisosomal, 70 KDa, en els compartiments endo/lisomals [134], cap a on migra gràcies als residus M6P. Tot i això, una petita i variable proporció del precursor de l'ASMasa és processada als compartiments RE/Golgi, donant lloc a una forma secretable enzimàticament activa de 57 KDa [135].

Implicacions patològiques

La deficiència d'ASMasa en humans és la causa de dos malalties autosòmiques recessives anomenades malaltia de Niemann-Pick (NPD) tipus A i tipus B. Aquestes malalties es donen a causa d'alteracions en el magatzem lipídic dels lisosomes i són generades per mutacions en el gen SMPD1, que codifica l'ASMasa. La NPD de tipus A és una forma infantil de deficiència d'ASMasa que es caracteritza per una ràpida neurodegeneració que causa la mort als 2-3 anys d'edat. Per contra, la NPD de tipus B és una forma de manifestació clínica més tardana, on els pacients exhibeixen pocs o cap símptoma neurològic, però pateixen greus i progressives anormalitats dels òrgans viscerals que inclouen hepatoesplenomegalia, insuficiència pulmonar i malalties cardiovasculars [136]. Els diferents graus de severitat de la NPD tipus A i B depenen de la quantitat d'activitat residual d'ASMasa.

El 1990 es van generar ratolins deficients en ASMasa ($ASMasa^{-/-}$) [137] i es va observar que eren resistents a la radiació i altres formes d'apoptosi induïdes per diversos estímuls entre els quals s'inclouen Fas/CD95 [138], isquèmia [139], quimioteràpia [140] i $TNF-\alpha$ [141]. A més de la patologia causada per la seva pròpia deficiència, l'ASMasa s'ha vist implicada en molts altres processos patològics com la mort cel·lular, el càncer, la diabetis, malalties pulmonars, cardiovasculars, neurològiques, hepàtiques i processos infecciosos [142].

L'ASMas i el producte generat per la seva activitat, la ceramida, s'han vist implicats en processos tant de mort com de proliferació cel·lular en funció de l'estímul [143], [120]. La generació de ceramida a través de l'activació de l'ASMas induïda per estímuls apoptòtics com TNF [144], Fas [145], NGF, radiació γ , IFN- γ (Interferó- γ), estrès (radiació ultraviolada, radicals lliures) i agents quimioterapèutics és responsable de la senyalització cel·lular que condueix a la mort cel·lular. Degut a la rellevància del TNF en aquest procés, la relació entre el TNF i l'activació de l'ASMas s'ha estudiat en detall. Concretament s'ha observat com la internalització del receptor 1 del TNF en el receptosoma provocaria l'activació de l'ASMas, la caspasa 8 desenvoluparia un paper fonamental en aquest procés [146]. En aquest context, la ceramida activa mediadors de mort com Bad/Bax, Apaf-1, Citocrom C i la via de senyalització SAPK/JNK [147], [120], [148]. Concretament en fetge, s'ha vist com la ceramida regula la mort cel·lular induïda per TNF a través del reclutament del mitocondri [149], [141]. També s'ha descrit com la utilització d'agents lisomòrfics, que eviten l'acidificació de les vesícules intracel·lulars, prevenen la generació de ceramida per l'ASMas, ja sigui per la inducció per TNF o per l'aport d'ASMas exògena, evitant també així el conseqüent dany hepatocel·lular [150], [151]. En funció de l'estímul que iniciï la cascada de senyalització, la mort cel·lular induïda per l'ASMas pot ser dependent o independent de les caspases. Així doncs, a diferència del que succeeix amb la radiació ultraviolada, Fas provocaria una mort cel·lular dependent de caspases [145].

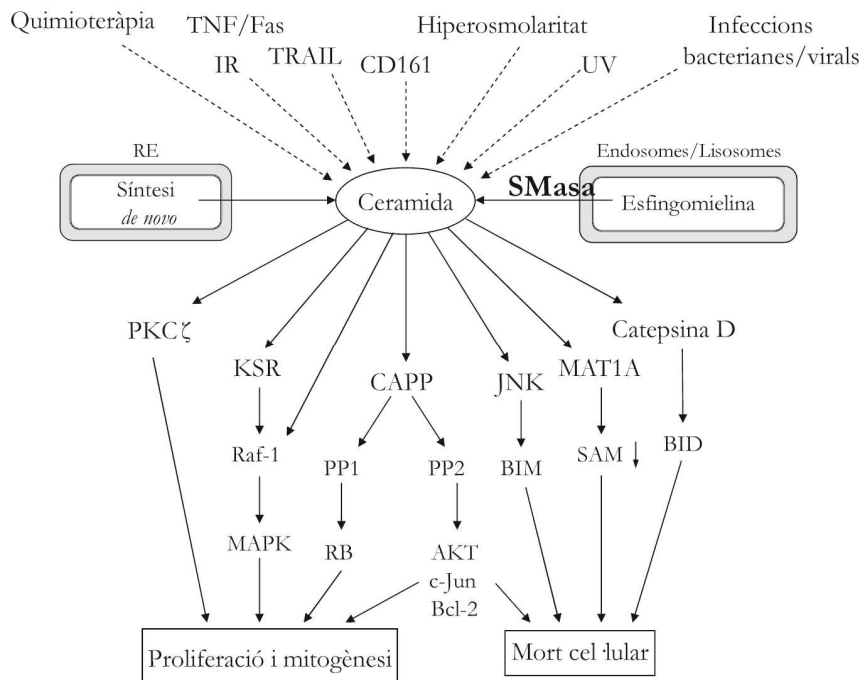


Figura 9: Accions de la ceramida com a segon missatger. En funció de l'estímul que causi l'augment dels nivells intracel·lulars de ceramida es donarà una cascada de senyalització que conduirà cap a la proliferació o la mort cel·lular. Figura modificada de [120].

Per altra banda, l'ASMasa pot ser activada per altres senyals com PDGF, interleucina 1 [152], CD28 i LDL oxidades resultant en la transcripció de gens relacionats amb el creixement cel·lular, a través de l'activació de les MAPK. Aquesta via d'activació de l'ASMasa provocaria la regulació positiva de processos cel·lulars essencials com la proliferació, la diferenciació i la reparació [153]. Específicament s'ha descrit com l'addició d'SMasa o ceramida pot potenciar l'efecte de PDGF sobre fibroblast quiescents, induint la seva proliferació [154], [155]. Per altra banda, productes secundaris derivats de l'acció l'SMasa com l'esfingosina-1P (S1P) i el seu receptor S1P₂, s'han vist implicats en la resposta de *wound healing* per dany hepàtic agut, al induir l'augment de la proliferació dels miofibroblast hepàtics [156]. En un escenari similar, s'ha descrit com PDGF i S1P actuarien a través de la formació de complexos PDGFβ receptor-S1P receptor contribuint així a la mitogènesi de cèl·lules de múscul llis [157]. Per últim, cal destacar el paper que l'ASMasa podria estar jugant en la secreció al medi extracel·lular de metal·loproteases en processos de metastasi [158], [159].

◦◦● 2. Objectius

Antecedents

S'ha vist que les catepsines estan implicades en el dany hepàtic. Diferents estudis han observat elevats nivells sèrics de CtsB, CtsD i CtsL en pacients amb cirrosi i hepatocarcinoma [84], [101], [85]. Lee *et al.* han confirmat la CtsB com un dels sis biomarcadors que composarien l'empremta d'expressió proteòmica que distingiria l'hepatocarcinoma cel·lular del teixit sa [81]. Aquests biomarcadors van demostrar una correlació clínica amb l'índex de Ishak [160], mètode diagnòstic de la fibrosi hepàtica. A nivell experimental, també existeixen evidències de la contribució de les catepsines a la fibrosi hepàtica. Concretament s'ha descrit l'augment de la catepsina T i D en models de fibrogènesi experimental induïda per CCl₄ [161]. Canbay *et al.* també van descriure una contribució de la CtsB en la mort hepatocel·lular en el model de fibrosi induïda per lligadura del conducte biliar [97]. A nivell de CEH, Kristensen *et al.* van realitzar una anàlisi proteòmica de CEH de rata, en la qual van confirmar la CtsD com una de les proteïnes que s'indueixen durant l'activació de les CEH [162]. Recentment, l'activitat nuclear de la catepsina F també s'ha vist implicada en el procés d'activació de les CEH [163]. Malgrat l'evidència que les catepsines podrien tenir un paper en el procés d'activació de les CEH i la fibrogènesi, no existeix cap estudi que ho analitzi en profunditat.

Objectiu del primer bloc de resultats

Tenint en compte els antecedents previs, l'objectiu del primer bloc de resultats va ser caracteritzar la contribució de la CtsB i la CtsD al procés d'activació de les CEH i al model de fibrogènesi hepàtica per CCl₄ en ratolí.

Antecedents

Existeix una relació entre les catepsines i l'esfingomielinasa àcida (ASMasa) descrita sobretot en el context de l'apoptosi [88], [89], [114], [107]. L'ASMasa a més, s'ha implicat tant en processos de mort [147] com de proliferació cel·lular [153]. Ambdós processos són crucials en el desenvolupament de la fibrosi hepàtica. Per una banda, l'apoptosi de les CEH activades és un procés fonamental per a la reversió de la fibrosi hepàtica. Per l'altra,

l'activació de les CEH comporta un augment de la proliferació cel·lular que és responsable en gran mesura de la progressió de la malaltia. Concretament en el context de la fibrosi hepàtica s'ha vist com la inhibició de l'ASMas en CEH de rata podia prevenir la disminució del col·lagen 1A1 pel TNF- α [164]. Molt recentment, Myung *et al.* han descrit el procés pel qual un inhibidor de la *Heat shock protein 90* (HSP 90) indueix l'apoptosi de les CEH activades via ASMas i NF κ B [165]. Malgrat aquests antecedents, no s'ha caracteritzat en detall l'aportació que l'ASMas pot estar realitzant al procés d'activació de les CEH i la fibrogènesi, ni la seva relació amb les catepsines en aquest context.

Objectiu del segon bloc de resultats

Tenint en compte els antecedents previs, l'objectiu del segon bloc de resultats va ser caracteritzar la contribució de l'ASMas al procés d'activació de les CEH i la seva relació amb les catepsines dins d'aquest context.

◦◦● 3. Material i mètodes

3.1. Model de fibrosi hepàtica per Tetraclorur de carboni

3.1.1. Metabolisme del Tetraclorur de carboni

Existeixen diferents models de fibrosi hepàtica experimental. En aquesta tesi es va dur a terme el model del Tetraclorur de carboni (CCl_4), un model àmpliament acceptat i estudiat. Concretament es sap que el CCl_4 es metabolitza al radical lliure triclorometil ($\bullet\text{CCl}_3$) pel sistema enzimàtic del Citocrom P450, principalment per la isoforma 2E1 (Figura 10). Els radicals lliures produïts es poden unir directament als lípids microsomals i altres estructures macromoleculares contribuint així al trencament de les membranes i la disrupció dels processos energètics dins la cèl·lula.

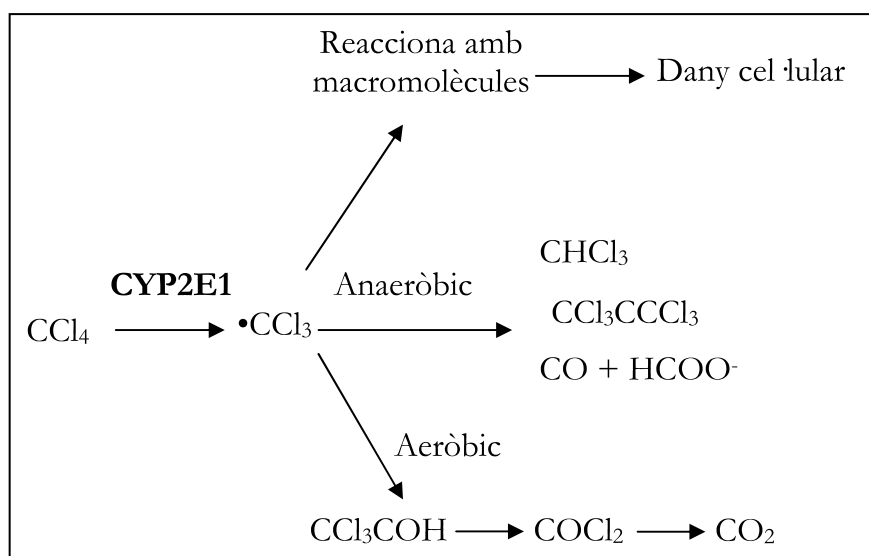


Figura 10: Metabolisme del Tetraclorur de carboni.

3.1.2. Model experimental *in vivo*

Es van utilitzar ratolins mascles de la soca C57BL/6 (*Charles River*) d'entre 8-10 setmanes d'edat. Van ser estabulats a l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. Els animals es van mantenir a un cicle constant de 12 hores de llum i 12 hores de foscor. La temperatura es va mantenir en $23 \pm 2^\circ\text{C}$, amb una humitat que oscil·lava entre el 45 i el 55%. L'aigua i el menjar se'ls hi va subministrar *ad libitum*.

Es va utilitzar oli de blat de moro (*Sigma-Aldrich*) com a vehicle del CCl_4 (*Sigma-Aldrich*) que es va administrar intraperitonealment a una dosi de $0.5\mu\text{L/g}$ ratolí dos cops per setmana durant 4 o 6 setmanes. Tots els protocols animals utilitzats van ser aprovats pel Comitè Ètic i de Benestar Animal de la Universitat de Barcelona.

3.2. Aïllament de cèl·lules estelades hepàtiques [166]

Abans de començar tant el material quirúrgic com els tampons han d'estar en condicions estèrils per evitar contaminacions.

Tampons i reactius

Tampó Krebs-Henseleit (*Sigma-Aldrich*)

- 11.1mM D-Glucosa
- 1.2mM MgSO₄
- 1.2mM KH₂PO₄
- 4.7mM KCl
- 118mM NaCl
- 24mM NaHCO₃ (*Sigma- Aldrich*)
- 16.8mM Hepes (*Sigma- Aldrich*)

Després de carbogenar (95 % O₂ i 5 % CO₂) durant 20 minuts s'afegeix 2.42mM CaCl₂ · 2 H₂O

Tampó Hanks 10X

- 1.4M NaCl (*Riedel-de Haën*)
- 4mM KCl (*Sigma- Aldrich*)
- 8mM MgSO₄ · 7 H₂O (*Fluka*)
- 6.74mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O (*Fluka*)
- 8.8mM KH₂PO₄ (*Fluka*)

Tampó Hanks 1X

50mL del Hanks 10X + 450mL H₂O, als quals s'afegeix:

- 25mM NaHCO₃ (*Sigma- Aldrich*)
- 12.6mM Hepes (*Sigma- Aldrich*)

Es carbogena (95 % O₂ i 5 % CO₂) durant 20 minuts.

Tampó Hanks I

- 200mL del Hanks 1X carbogenat, als quals s'afegeix::
 - 0.5% BSA Fracció V (*Sigma-Aldrich*)
 - 0.6mM EGTA (*Sigma-Aldrich*)

Tampó Hanks II

- 200mL del Hanks 1X carbogenat, als quals s'afegeix:
 - 4mM CaCl₂ · 2 H₂O (*Sigma-Aldrich*)
 - 20U/mL Col·lagenasa (*Sigma-Aldrich*)
- Nycodenz 17.2% (*Sigma-Aldrich*) en tampó Krebs.
- PBS 1X (*Sigma-Aldrich*)

Animals

Es van utilitzar de 2 a 3 ratolins mascles C57BL/6 de 8-12 setmanes (*Charles River*).

Protocol

1. Digestió del fetge i extracció de cèl·lules hepàtiques

- 1.1 Anestesiari l'animal amb Pentobarbital sòdic al 5%. Dosi: 1µL/g animal.
- 1.2. Realitzar una laparatomia, retirar el paquet abdominal deixant a la vista la vena porta i la vena cava.
- 1.3. Posar una sutura per sota de la vena porta i una altra sota de la vena cava.
- 1.4. Introduir el catèter en la vena cava i tancar la sutura.
- 1.5. Connectar el catèter a la bomba peristàltica, tallar la vena cava per sota de la sutura i engegar la bomba a un flux de 8-10 mL/minut amb Hanks I.
- 1.6. Als 5 minuts, obrir el diafragma, tallar la vena cava-arteria aorta i tancar la sutura de la vena cava.
- 1.7. Als 5 minuts canviar el tampó al Hanks II.
- 1.8. Digerir el fetge aproximadament 5 minuts o fins que sembli pàlid i inflat.
- 1.9. Extreure el fetge i col·locar-lo en una placa de Petri de 100mm amb 20 mL de Krebs-Henseleit. Extreure, amb l'ajuda d'unes pinces, les cèl·lules hepàtiques.
- 1.10. Filtrar el contingut de la placa de Petri a través d'una gasa estèril a un Erlenmeyer petit de 100 mL que conté ja 20 mL de Krebs, amb l'ajuda d'un embut.

2. Aïllament de cèl·lules estelades hepàtiques

- 2.1. Portar el volum filtrat fins a 50 mL i traspasar-los a un falcon de 50 mL. Centrifugar a 60g a 4 °C durant 4 minuts per separar els hepatòcits (precipitat o pellet) de les cèl·lules no parenquimals (sobrenedant).

- 2.2. Recollir el sobrenedant i centrifugar-lo a 450g a 4°C durant 10 minuts. El pellet conté les cèl·lules no parenquimals.
- 2.3. Ajuntar els 2 o 3 pellets de cèl·lules no parenquimals (2 o 3 ratolins) en una solució de Nycodenz al 17.2% en Krebs portant el volum fins a 30 mL. Centrifugar a 1400g a 4°C durant 20 minuts.
- 2.5. Recollir la banda tèrbola superior on es troben les cèl·lules estelades hepàtiques. Passar-la a un falcon de 50 mL i pujar el volum fins a 50 mL amb Krebs-Henseleit. Centrifugar 10 minuts a 450g a 4°C.
- 2.6. Resuspendre el pellet obtingut en DMEM al 10% FBS en les condicions que es detallen en l'apartat 3.3.1.
- 2.7. Després de 4-6 hores, un cop les cèl·lules ja estan adherides, rentar-les amb PBS 1X i canviar el medi.

La puresa del cultiu va ser determinada per l'autofluorescència dels retinoids, obtenint una puresa mitjana del cultiu del 90-95%.

3.3. Cultius

3.3.1. Condicions de cultiu

Les condicions de cultiu per totes les cèl·lules van ser 5% CO₂ i 37°C en medi DMEM (*Gibco*) suplementat amb 100 U/mL de penicil·lina (*Gibco*) i 100 µg/mL d'estreptomicina (*Gibco*) al 10% FBS (*Gibco*). En el cas de les CEH primàries el medi va ser complementat amb 0.1% Fungizona (*Gibco*).

3.3.2. Línia cel·lular

La línia cel·lular de cèl·lules estelades humanes, LX2 [167], va ser cedida pel Dr. Ramon Bataller de l'Hospital Clínic de Barcelona.

3.3.3. Tractaments cel·lulars

Els estudis cel·lulars de senyalització es van realitzar al 0.5% FBS. En la resta d'estudis les cèl·lules van estar al 10% FBS. Els productes i les dosis van ser les següents:

- Ca074-Me (*Sigma-Aldrich*) 10µM
- Imipramina (*Sigma-Aldrich*) 25µM

- Pepstatina A (*Sigma-Aldrich*) 10µg/mL
- PDGF BB (*Preprotech*) 10ng/mL o 20ng/mL
- LY294002 (Inhibidor de la PI3K) (*Sigma-Aldrich*) 10µM
- LPS (serotip 0128:B12) (*Sigma-Aldrich*) 1µg/mL

3.3.4. Assajos de migració cel·lular o *Wound healing*[168]

Fonament de la tècnica

L'assaig de migració per *Wound healing* es tracta d'un mètode senzill per estudiar la migració direccional de les cèl·lules *in vitro*. Es crea una ferida en una monocapa de cèl·lules i es capturen imatges des del principi de la ferida a intervals regulars, fins que la ferida es tanca. Comparant les imatges es pot quantificar la taxa de migració de les cèl·lules.

Protocol

1. Cultivar les cèl·lules estelades hepàtiques de ratolí durant 5 dies i transfectar-les amb ARNi com es detalla en l'apartat 3.17. de Material i mètodes.
2. Després de 24 hores de transfecció realitzar una ferida en la monocapa de cèl·lules amb la punta d'una pipeta de 100 µL per generar una zona lineal de 2 mm lliure de cèl·lules.
3. Rentar les cèl·lules amb PBS i afegir medi DMEM al 10% FBS.
4. Visualitzar la migració a les 24 i 48 hores amb un microscopi de contrast de fase *Olympus T041*.

3.4. Determinació de transaminases en sèrum

L'alanina i l'aspartat aminotransferases (ALT i AST respectivament) són marcadors serològics indirectes de l'estat del fetge. Un augment d'aquests marcadors en sang és indicatiu d'un dany hepàtic.

Els sèrums obtinguts dels ratolins tractats han estat processats en un analitzador bioquímic del Centre de Diagnòstic Mèdic (Hospital Clínic, Barcelona).

3.5. Obtenció de lisats totals

Tampons i reactius

Homobuffer (HB) pH 7.4

- 220mM Manitol (*Sigma-Aldrich*)
- 70mM Sacarosa (*Sigma-Aldrich*)
- 0.1mM EDTA (*Sigma-Aldrich*)
- 3 mM Tris-HCl (*Fluka*)
- 0.1% BSA (lliure d'àcids grassos) (*Sigma-Aldrich*)

S'afegeix 1 pastilla d'antiproteases (Complete (*Roche*)) a 30 mL de HB.

RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay) Buffer pH 7.4

- 50mM Tris-HCl (*Fluka*)
- 1% Igepal (*Sigma-Aldrich*)
- 0.25% Na-deoxicolat (*Sigma-Aldrich*)
- 150mM NaCl (*Riedel-de Haën*)
- 1mM EDTA (*Sigma-Aldrich*)
- 1mM Na₃VO₄ (*Sigma-Aldrich*) a partir d'una solució de 200mM prèviament activat.

S'afegeix mitja pastilla d'antiproteases (Complete (*Roche*)) a 5 mL de RIPA.

3.5.1. Protocol per l'obtenció d'un lisat total de fetge

1. Homogeneïtzar entre 150-200 mg fetge amb 1.5-2.0 mL d'HB-antiproteases manualment 4 vegades i es traspassa a un eppendorf.
2. Fer una relació 1:1 (v:v) d'homogenat amb RIPA-antiproteases i vortejar.
3. Deixar 15 minuts amb gel i anar vortejant durant aquest temps.
4. Centrifugar a 13000 rpm 15 minuts a 4°C.
5. Recollir el sobrenedant i guardar alíquotes per quantificar proteïnes pel mètode Bradford. Congelar la resta d'alíquotes a -20°C.

3.5.2. Protocol per l'obtenció d'un lisat total de CEH

1. Treure el medi de les plaques de cultiu.
2. Rentar dos cops amb PBS 1X i aspirar bé el PBS 1X.
3. Afegir entre 100-150 µL de RIPA-antiproteases per pou de placa de 6 i fer saltar les cèl·lules amb un rascador de placa o *scraper*.

4. Recollir l'extracte i traspasar-lo a un eppendorf.
5. Deixar 15 minuts amb gel i anar vortejant durant aquest temps.
6. Centrifugar a 13000 rpm 15 minuts a 4°C.
7. Recollir el sobrenedant i guardar alíquotes per quantificar proteïnes pel mètode Bradford. Congelar la resta d'alíquotes a -20°C.

3.6. Quantificació de proteïnes [169]

Fonament de la tècnica

L'assaig es basa en l'observació de l'absorbància d'una solució àcida de Comassie Brilliant Blue G-250 que canvia de 465nm a 595nm quan es dona la unió de proteïnes. Tant les interaccions hidrofòbiques com aniòniques estableixen la forma aniònica del tint i causen un canvi visible de color.

Protocol

Es determina l'absorbància de les proteïnes a 595nm en microcubeta i es calcula la concentració respecte a un estàndard de concentració coneguda. L'estàndard es va preparar de 0 a 0.5 µg/µL amb albúmina bovina sèrica i el reactiu Bradford es va obtenir de *Bio-Rad*.

3.7. Determinació de proteïnes per *Western blot*

3.7.1. Electroforesi en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) [170]

Fonament de la tècnica

Es tracta d'una electroforesi desnaturalitzant, en la que les mostres es desnaturalitzen per calor en presència d'agents desnaturalitzants com el β-mercaptoetanol, agent reductor que trenca els ponts disulfur i el Sodi Dodecil Sulfat (SDS), detergent aniònic que envolta les proteïnes de càrregues negatives. La separació dels complexos SDS-proteïna és proporcional a la seva massa, ja que totes les proteïnes tenen la mateixa càrrega per unitat de proteïna. Així doncs, les proteïnes es separen com cadenes polipeptídiques aïllades i, dins d'un camp elèctric, migren cap al pol positiu (ànode) a través d'una matriu porosa, constituïda bàsicament per polímers d'acrilamida. Per tant, es pot determinar el pes molecular aparent de qualsevol proteïna per comparació amb un patró de proteïnes de pesos moleculars coneguts. Les mobilitats de les proteïnes en els gels de SDS-PAGE són funcions lineals del logaritme del seu pes molecular.

Tampons i reactius

- Solucions 1

0.75M Tris-HCl pH 8.8 (*Fluka*)

0.2% SDS (*Sigma-Aldrich*)

- Solucions 3

0.25M Tris-HCl pH 6.8 (*Fluka*)

0.2% SDS (*Sigma-Aldrich*)

- Tampó de càrrega 2X (*Sigma-Aldrich*)

0.125M Tris-HCl pH 6.8

4% SDS

20% Glicerol

10% 2-mercaptoetanol.

0.004% Blau de bromofenol.

- Persulfat d'amoni (APS) 13% (*Sigma-Aldrich*)

- TEMED (*Fluka*)

- Marcador de pes molecular Novex (*Invitrogen*)

- Solucions 2

30% acrilamida/bis-acrilamida

(*Sigma-Aldrich*)

- Tampó d'electroforesi

25mM Tris (*Fluka*)

192mM Glicina (*Sigma-Aldrich*)

0.1% SDS (*Sigma-Aldrich*)

Protocol

1. Muntatge del gel separador o resolutiu: Barrejar les solucions seguint les indicacions de la següent taula, per un gel de 1.5mm:

% Acrilamida	Volum de Solució 1	Volum de Solució 2	Volum de H ₂ O	Volum de APS 13%	Volum de TEMED
8%	5 mL	2.8 mL	2.2 mL	50 µL	14 µL
10%	5 mL	3.4 mL	1.6 mL	50 µL	14 µL
12%	5 mL	4.08 mL	1 mL	50 µL	14 µL

La quantitat d'acrilamida triada va variar en funció de la mida de la proteïna a anàlisi.

2. Muntatge del gel concentrador o *stacking* al 10% de poli-acrilamida: per un gel de 1.5 mm barrejar 2.25 mL de solució 3; 0.54 mL de solució 2; 1.8 mL d'aigua destil·lada; 11.25 µL de TEMED; 45 µL d'APS.

3. Diluir els extractes proteics amb tampó de càrrega 2X i bullir-los a 100°C durant 5 minuts.
4. Carregar de 20 a 30 µL per pou, que suposen de 20 a 40 µg de proteïna de lisat de teixit o de cèl·lules, i connectar la font a 80 mV. Un cop les mostres han travessat el gel concentrador, pujar el voltatge fins a 120 mV i posar a la cubeta d'electroforesi en gel.

3.7.2. Western-blot [171]

Fonament de la tècnica

Aquesta tècnica consisteix en una detecció indirecta de proteïnes utilitzant anticossos contra les proteïnes sobre una membrana de nitrocel·lulosa, obtinguda per transferència d'un gel de poliacrilamida. El complex antigen-anticòs format pot ser detectat gràcies a un segon anticòs portador de l'enzim peroxidasa que reacciona amb el seu substrat produint una reacció quimioluminiscent.

Tampons i reactius

- Tampó de transferència

25mM Tris-HCl pH 8.3 (*Fluka*)

192mM Glicina (*Sigma-Aldrich*)

20% Metanol (*Panreac*)

- Tampó TBS-T

20mM Tris-HCl pH 7.4

500mM NaCl (*Riedel-de Haën*)

1% Tween 20 (*Bio-Rad*)

- Solució de bloqueig

8% de llet desnatada o 5% BSA lliure de àcids grassos (FFA) (*Sigma-Aldrich*) amb TBS-T

- Solució de ECL

Reactiu de ECL (*Pierce*)

Protocol

1. Transferir les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa a 290mA a 4°C durant 1 hora.
2. Bloquejar la membrana durant 1 hora amb la solució de bloqueig.
3. Treure el bloqueig i incubar la membrana amb l'anticòs primari a temperatura ambient durant 2 hores o 12 hores a 4°C.
4. Realitzar 4 rentats de 15 minuts amb TBS-T i incubar la membrana amb l'anticòs secundari durant 1 hora.

5. Realitzar 4 rentats de 15 minuts amb TBS-T. En el cas que l'anticòs secundari sigui de cabra fer 8 rentats.
6. Revelar amb quimioluminiscència, incubar la membrana amb el reactiu ECL durant 1 minut i posar en contacte amb un film d'autoradiografia CL-XPosure™ Film (*Thermo Scientific*) el temps necessari. Un cop exposat el film, revelar amb una reveladorar CURIX 60 (*AGFA*).

Relació d'anticossos primaris utilitzats:

Antigen	Dilució	Hoste	Casa comercial
Catepsina B	1:2000 al 8% llet amb TBS-T	Conill	Update
Catepsina D	1:250 al 8% llet amb TBS-T	Cabra	St. Cruz Biotechnology
α -SMA	1:1000 al 8% llet amb TBS-T	Ratolí	Sigma-Aldrich
β actina	1:1000 al 8% llet amb TBS-T	Ratolí	Sigma-Aldrich
p-AKT	1:250 al 5% BSA FFA amb TBS-T	Conill	St. Cruz Biotechnology
AKT	1:250 al 5% BSA FFA amb TBS-T	Cabra	St. Cruz Biotechnology
PDGFR β	1:5000 al 5% BSA FFA amb TBS-T	Conill	Abcam

La dilució de l'anticòs secundari sempre és 1:5000, excepte en el secundari de cabra que és 1:80000.

3.7.3. Eliminació d'anticossos de la membrana (*Stripping*)

Tampons i reactius

- Solució de *Stripping*

Solució de *Stripping* (*Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific*).

Protocol

1. Incubar la membrana amb solució de *Stripping* durant 10 minuts a temperatura ambient i agitació vigorosa.
2. Realitzar dos rentats de 15 minuts amb TBS-T.
3. Continuar el protocol de l'apartat 3.7.2. a partir del punt 3.

3.8. Determinació de l'activitat CtsB i CtsD [172]

Fonament de la tècnica

Tant l'activitat de la catepsina B com de la catepsina D es van mesurar fluorimètricament mitjançant substrats específics per a cada enzim. L'hidròlisi d'aquests

substrats per les catepsines produeix fluorescència a una longitud d'ona (λ) determinada que va ser mesurada fluorimètricament. Les condicions de l'assaig van ser les mateixes exceptuant els substrats respectius i les λ d'excitació i d'emissió.

Tampons i reactius

- 20mM Hepes pH:7.4 (*Sigma-Aldrich*)
- 0.1% CHAPS (*Sigma-Aldrich*)
- 2mM EDTA (*Sigma-Aldrich*)
- 5% Sucrosa (*Sigma-Aldrich*)

En fresc s'afegeix:

- 2mM L-cisteïna (*Sigma-Aldrich*) (només en el cas de la catepsina B)
- 5mM DTT (*Fluka*)

Substrats

Catepsina B: Z-Arg-Arg-7-amido-4-metilcoumarina hidrocloreata (*Sigma-Aldrich*).

Concentració d'assaig 60 μ M.

Catepsina D: N-Acetyl-Arg-Gly-Phe-Phe-Pro-7-amido-4-trifluorometilcoumarina (*Sigma-Aldrich*). Concentració d'assaig 60 μ M.

Protocol

1. Escalfar a 37°C en un bany el tampó d'assaig amb el substrat a concentració 60 μ M.
2. Posar 20 μ g de proteïna per pou en una placa de 96 pous.
3. Pujar el volum fins a 150 μ l amb el tampó d'assaig temperat.
4. Llegir a intervals de 45 segons durant 40 minuts a 37°C en un Fluorímetre (*SpectraMAX GeminiXS, Molecular Devices*).

	Catepsina B	Catepsina D
λ excitació	355 nm	400 nm
λ emissió	460 nm	505 nm

5. L'activitat es va expressar com a unitats de fluorescència relatives per mg de proteïna.

3.9. Zimografia àcida de gelatina [173]

Fonament de la tècnica

Es tracta d'una electroforesi en condicions no desnaturalitzants on s'afegeix gelatina al gel d'electroforesi. S'utilitza el Liti Dodecil Sulfat (LDS), detergent aniònic que envolta les proteïnes de càrregues negatives. Les proteïnes es separen com en una electroforesi SDS-PAGE però mantenint la seva conformació. En rentar el gel amb Tritó X-100, el LDS s'elimina i les proteïnes tornen a ser actives sota certes condicions, es a dir, tenen capacitat per degradar el contingut de gelatina del gel. La tinció amb Comassie i el revelat amb les solucions de destinció mostra l'activitat gelatinasa de la proteïna d'interès.

Tampons i reactius

Preparació dels gels

Gel separador (volum final 10 mL)	Gel concentrador (volum final 5 mL)
10% acrilamida	5.85% acrilamida
0.3M BisTris	0.3M BisTris
0.3M Acetat sòdic Trihidrat	0.3M Acetat sòdic Trihidrat
5% glicerol	H ₂ O
gelatina 1mg/mL (0.1%)	
APS 13%	APS 13%
TEMED	TEMED

Tampó de càrrega

- 25mM BisTris (*Sigma-Aldrich*)
- 25mM Acetat sòdic Trihidrat (*Sigma-Aldrich*)
- 2% LDS (*Sigma-Aldrich*)
- 15% Glicerol (*Sigma-Aldrich*)
- 0.05% Bromofenol blue (*Sigma-Aldrich*)

Tampons d'electroforesi

Tampó del ànode

- 0.1M BisTris (*Sigma-Aldrich*)
- 0.1M Mes (*Sigma-Aldrich*)

Tampó del càtode pH 5.8

- 0.14M Mes (*Sigma-Aldrich*)

- 56mM BisTris (*Sigma-Aldrich*)
- 0.1% LDS (*Sigma-Aldrich*)

Tampó de rentat

- 2.5% Tritó X-100 (*Sigma-Aldrich*)

Tampó d'incubació per a proteases àcides pH 5.5

- 50mM de Acetat sòdic Trihidrat (*Sigma-Aldrich*)
- 100mM de Clorur sòdic (*Riedel-de Haën*)
- 5mM EDTA (*Sigma-Aldrich*)
- 10mM L-cisteïna (*Sigma-Aldrich*) afegir en fresc

Tampó de tinció

- 0.25% Comassie Blau Brillant R-250 (*Fluka*)
- 10% Àcid acètic (*Panreac*)
- 45% Metanol (*Panreac*)

Tampons de destinció

Tampó de destinció suau

- 10% Àcid acètic (*Panreac*)
- 10% Metanol (*Panreac*)

Tampó de destinció fort

- 7% Àcid acètic (*Panreac*)
- 40% Metanol (*Panreac*)

Protocol

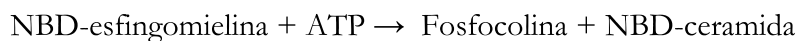
1. Polimeritzar un gel de 1.5mm seguint el primer apartat dels Tampons i reactius.
2. Barrejar la quantitat de proteïna desitjada de cada mostra (a partir de 3 µg de proteïna de lisats cel·lulars) amb el tampó de càrrega (volum màxim a carregar 30 µL).
3. Incubar la mostra 10 minuts a temperatura ambient.
4. Carregar els tampons d'electroforesi a seu lloc de la cubeta.

5. Carregar les mostres i posar la font a 80V a 4°C fins que les mostres passin el gel concentrador.
6. Un cop les mostres entren en el gel separador es pot pujar el voltatge a 100V.
7. Treure el gel amb l'ajut d'un paper *Whatman* i la solució de rentat.
8. Fer dos rentats amb Tritó X-100 2.5% durant 15 minuts en agitació.
9. Equilibrar el gel amb solució d'incubació durant 30 minuts en agitació.
10. Canviar la solució d'incubació, tancar i deixar tota la nit a 37°C dins l'estufa.
11. L'endemà, treure el tampó d'incubació i posar en agitació a tenyir durant 1 hora amb solució de tinció.
12. Canviar al tampó de destinció fort durant 20 minuts.
13. Canviar a la solució de destinció suau i anar fent rentats fins a obtenir el contrast desitjat.

3.10. Determinació de l'activitat Esfingomielinasa

Fonament de la tècnica

L'activitat esfingomielinasa es va determinar utilitzant el substrat fluorescent esfingomielina N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino (SM-NBD). La reacció produïda per l'activitat esfingomielinasa és la següent:



Els esfingolípid de la reacció, NBD-esfingomielina i NBD-ceramida, s'extreuen amb cloroform-metanol i es separen mitjançant cromatografia de capa fina (TLC). La TLC es va visualitzar amb llum ultraviolada.

3.10.1. Activitat Esfingomielinasa àcida (ASMasa) en CEH o teixit hepàtic

Tampons i reactius

- Metanol (*Sigma-Aldrich*)
- Cloroform (*Sigma-Aldrich*)

Tampó d'assaig ASMasa

- 250mM Acetat sòdic pH 5.0 (*Sigma-Aldrich*)
- 0.1% Tritó X-100 (*Sigma-Aldrich*)
- 10µM SM-NBD (*Molecular Probes*)

Tampó de la fase mòbil o eluent

- Cloroform, Metanol i Hidròxid d'amoni 20% (70:30:5, v:v:v)

Protocol

1. Portar entre 20-40 µg de proteïna fins a 250 µL amb tampó d'assaig ASMasa.
2. Incubar 2 hores a 37°C i 900 rpm en un Termomixer (*Eppendorf*).
3. Aturar la reacció afegint 250 µL de Metanol i 500 µL de Cloroform.
4. Realitzar un vòrtex a totes les mostres.
5. Centrifugar les mostres a 5000 rpm durant 5 minuts.
6. Extreure 400 µL de la fase orgànica.
7. Assecar la fase orgànica en un Speed-vac (*Savant, Pacisa*).
8. Resuspendre el pellet en 50 µL de Cloroform:Metanol (1:1, v:v) i realitzar un vòrtex.
9. Carregar 40 µL per mostra en una placa de TLC (*Whatman*).
10. Córrer la placa dins d'una cambra de TLC prèviament equilibrada amb la fase mòbil.
11. Visualitzar i quantificar les bandes de NBD-ceramida amb un Versadoc (*BioRad*) amb llum ultraviolada.

3.10.2. Activitat Esfingomielinasa neutra (NSMasa) en CEH o teixit hepàtic

Tampons i reactius

L'únic tampó que canvia respecte l'assaig de l'ASMasa és el següent:

Tampó d'assaig NSMasa

- 20mM Hepes pH 7.4 (*Sigma-Aldrich*)
- 0.1% Tritó X-100 (*Sigma-Aldrich*)
- 1mM MgCl₂ (*Sigma-Aldrich*)
- 10µM SM-NBD (*Molecular Probes*)

El protocol per l'NSMasa és exactament el mateix que per l'ASMasa exceptuant el tampó d'assaig i la quantitat de proteïna necessària, que en el cas de l'NSMasa ha de ser d'un mínim de 75 µg.

3.11. Quantificació de la Hidroxiprolina [174]

Fonament de la tècnica

La Hidroxiprolina és un dels aminoàcids més característics del col·lagen juntament amb la Hidroxilisina. Així doncs, al quantificar la Hidroxiprolina en teixit es quantifica indirectament el contingut de col·lagen d'aquest. La detecció de la Hidroxiprolina es va realitzar per una tècnica que quantifica els nivells de 4-Hidroxiprolina en hidrolisats de teixit. Gràcies a una hidròlisi àcida s'aconsegueix alliberar la Hidroxiprolina dels teixits homogenats. La Hidroxiprolina lliure és oxidada per la T-Cloramida produint un compost del tipus pirrole. Finalment, l'addició de l'agent Ehrlich resulta en la formació d'un cromòfor amb una longitud d'ona màxima de 558nm que és quantificable per espectrofotometria.

Tampons i reactius

- Hidroxiprolina (*Sigma-Aldrich*)
- 6N HCl (*Sigma-Aldrich*)
- 2N NaOH (*Sigma-Aldrich*)

- Tampó acetat-citrat pH 6.5 (Volum final: 100 mL)
 - 0.88M Acetat sòdic trihidratat (*Sigma-Aldrich*)
 - 0.23M Àcid cítric anhidre (*Fluka*)
 - 0.85M NaOH (*Sigma-Aldrich*)
 - 1.2 mL Àcid acètic glacial (*Panreac*)

- Solució de T-Cloramida 56mM (Volum final: 50 mL)
 - 0.64 g T-Cloramida (*Sigma-Aldrich*)
 - 10 mL 50% 2-Propanol (*Sigma-Aldrich*)
 - 40 mL tampó acetat-citrat pH 6.5

- Solució Ehrlich 1M (Volum final: 30 mL)
 - 20 mL de 2-Propanol (*Sigma-Aldrich*)
 - 10 mL de 70% Àcid Perclòric (*Merck*)
 - 4.5 g de 4-Dimetilaminobenzaldehid (*Sigma-Aldrich*)

Protocol

a) Tractament de les mostres

1. Pesar el fetge (20-50 mg) i afegim HCl 6N en la proporció (500 µL de HCl 6N per 50 mg de fetge).
2. Homogeneïtzar el fetge amb el HCl 6N en eppendorfs amb èmbols (*Sigma-Aldrich*) a temperatura ambient.
3. Recollir l'homogenat i passar a criotubs.
4. Incubar a 100°C a l'estufa tota la nit.
5. L'endemà treure els criotubs de l'estufa i esperar que es refredin.
6. Passar el contingut dels criotubs a eppendorfs i centrifugar-los 10 minuts a 13000 rpm a 4°C.
7. Agafar 50 µL de sobrenedant (intentant no agafar la fase de sobre més fosca) i passar-los a un eppendorf.

b) Determinació de la Hidroxiprolina (HP) en teixit hepàtic

8. Els estàndards d'hidroxiprolina (0-10 µg) són preparats a partir d'un stock de hidroxiprolina 1 mg/mL. Els estàndards es realitzen amb NaOH 2N en un volum total de 50 µL.

Estàndards	0 µg	2.5 µg	5 µg	7.5 µg	10 µg
De l'stock de 1 mg/mL HP	0 µL	2.5 µL	5 µL	7.5 µL	10 µL
De NaOH 2N	50 µL	47.5 µL	45 µL	42.5 µL	40 µL
Volum final	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

9. Incubar els estàndards en criotubs 20 minuts a l'estufa a 120°C.
10. Afegir 450 µL de la solució T-Cloramida tant als estàndards com a les mostres i barrejar amb un vòrtex suau. Incubar 25 minuts a temperatura ambient.
11. Afegir 500 µL de solució Ehrlich i barrejar amb un vòrtex suau. Incubar 20 minuts a 65°C en un bany.
12. Deixar refredar els eppendorfs i llegir l'absorbància en un espectrofotòmetre a 550 nm (*DU 640 Spectrophotometer, Beckman*).

3.12. Aïllament de microsomes i determinació de l'activitat enzimàtica del Citocrom P450 (CYP2E1)

El Citocrom P450 (CYP) és una família d'oxidases de funció mixta, que metabolitzen xenobiòtics, compostos endògens, àcids grassos, etc. El CYP es troba principalment en fetge. Com ja s'ha comentat al capítol 3.1.1. de Material i mètodes, la isoforma 2E1 de la família CYP és l'encarregada de metabolitzar el CCl₄. El CYP2E1 es localitza als microsomes que són formacions vesiculars submicroscòpiques del reticle endoplasmàtic.

3.12.1. Aïllament de microsomes

Tampons i reactius

- Solució de fosfats 1M pH 7.4

Solució K₂HPO₄ 1M (*Fluka*) 8.7 g en 50 mL H₂O

Solució KH₂PO₄ 1M (*Fluka*) 6.8 g en 50 mL H₂O

Per fer la solució de fosfats 1M pH 7.4 es van barrejar les dos solucions de fosfats fins arribar al pH desitjat.

- Solució de fosfats 0.1M pH 7.4 1 mL de stock 1M en 9 mL H₂O

Protocol

1. Fer un homogenat de fetge seguint l'apartat 3.5.1. de Material i mètodes.
2. Passar l'homogenat a tubs de la ultracentrifuga pel rotor 70.1 Ti (*L-60 Ultracentrifuge, Beckman*)
3. Centrifugar 10.000 g 15 minuts a 4°C.
4. Recollir el sobrenedant i repetir el pas 3.
5. Recollir el sobrenedant i centrifugar 100.000 g 60 minuts a 4°C.
6. Resuspendre el pellet (microsomes) en 200 µL de solució de fosfats 0.1M.
7. Llegir la proteïna dels microsomes.

3.12.2. Determinació de l'activitat enzimàtica del Citocrom P450 2E1, assaig del p-nitrofenol [175]

Fonament de la tècnica

L'activitat del CYP2E1 es va analitzar quantificant la hidroxilació del p-nitrofenol (PNPH) a 4-nitrocatecol mitjançant espectrofotometria.

Tampons i reactius

- Solució de fosfats pH 7.4 (veure apartat 3.12.1.)
- Solució de fosfats 0.1M pH 7.4 (veure apartat 3.12.1.)
- 1M p-nitrofenol (*Sigma-Aldrich*)
- 10mM NADPH (*Sigma-Aldrich*)
- TCA 30% (*Sigma-Aldrich*)
- 10M NaOH (*Sigma-Aldrich*)

Protocol

1. Posar 300 µg de proteïna microsomal en un eppendorf i pujar el volum amb solució de fosfats 0.1M pH 7.4 fins a 76 µL. El blanc seran 76 µL de H₂O.
2. Afegir per a cada mostra:

a) Fosfat potàssic 1M, pH 7.4	10 µL
b) 10mM p-nitrofenol	4 µL
c) 10mM NADPH	10 µL

El volum final de l'assaig ha de sumar 100 µL.
3. Fer un forat a la tapa dels eppendorfs amb una agulla calenta per permetre l'intercanvi d'oxigen.
4. Incubar a un Termomixer (*Eppendorf*) durant 1 hora a 900 rpm i 37°C.
5. Aturar la reacció afegint 20 µL de TCA 30%.
6. Vortejar i centrifugar a 13000 rpm durant 5 minuts.
7. Recollir el sobrenedant i passar-lo a un eppendorf.
8. Neutralitzar afegint 10 µL de NaOH 10M i vortejar ràpidament.
9. Llegir a l'absorbància a 510 nm en un espectrofotòmetre (*DU 640 Spectrophotometer, Beckman*).

3.13. Tincions histològiques

Preparació dels teixits

1. Fixar els teixits hepàtics amb Formalina neutra al 10% (*Sigma-Aldrich*) durant 48h.
2. Posteriorment incloure'ls en parafina en un inclusor tipus *Citadel 1000, Shandon*.
3. Realitzar els blocs de parafina.
4. Fer talls a 7 µm amb un micròtom *Leica RM2155* i dipositar-los en portes tractats prèviament amb Histogrip (*Zymed*).

3.13.1. Hematoxilina & Eosina

Fonament de la tècnica

La tinció hematoxilina i eosina és una tinció doble basada en l'afinitat de les estructures per un o altre colorant. L'hematoxilina, colorant bàsic tenyeix de color blavós les estructures predominantment àcides com ara el nucli cel·lular. En canvi, l'eosina és una tetrabromofluoresceïna de caràcter àcid i basòfila que tenyeix el citoplasma de la cèl·lula d'un color rosat.

Tampons i reactius

- Xilol (*Sigma-Aldrich*)
- EtOH absolut (*Panreac*)
- EtOH/HCl al 96% (480 mL EtOH absolut + 20 mL HCl (*Sigma-Aldrich*))
- Aigua amoniacal (200 mL d'aigua destil·lada amb 2-3 gotes d'amoniac al 25% (*Merck*))
- Hematoxilina (*Sigma-Aldrich*)
- Eosina alcohòlica (*Sigma-Aldrich*)
- DPX (*Fluka*)
- Banc d'alcohols: EtOH absolut, EtOH 70%, EtOH 30%

Protocol

1. Desparafinar amb Xilol i hidratar amb banc d'alcohols fins a H₂O corrent.
2. Tenyir amb Hematoxilina 4 minuts.
3. Treure l'excés d'Hematoxilina rentant amb H₂O corrent abundant.
4. Posar les mostres amb EtOH/HCl 96% fins que aparegui una coloració vermellova.
5. Traspasar les mostres a aigua amoniacal fins que torni a aparèixer el color blau.
6. Rentar amb aigua corrent durant 2 minuts.
7. Rentar amb aigua destil·lada durant 2 minuts.
8. Tenyir durant 1.5 minuts amb Eosina alcohòlica.
9. Deshidratar amb un banc d'alcohols des de EtOH 70% fins a Xilol.
10. Muntar amb DPX.
11. Observar les mostres amb llum transmesa en un microscopi *Olympus BX41*.

3.13.2. Sirius Red

Fonament de la tècnica

És una de les tincions més utilitzades per detectar col·lagen. El Sirius red tenyeix les fibres de col·lagen de color vermell mentre el Píctic (mordent) deixa una coloració groga en el parènquima hepàtic.

Tampons i reactius

- Xilol (*Sigma-Aldrich*)
- EtOH absolut (*Panreac*)
- Aigua acidificada: 0.005% àcid acètic glacial (*Panreac*)
- DPX (*Fluka*)
- Banc d'alcohols: EtOH absolut, EtOH 70%, EtOH 30%
- Solució Sirius-Píctic 0.1%:
0.1% Direct red 80 (*Fluka*) en àcid Píctic saturat (*Fluka*)

Protocol

1. Desparafinar amb Xilol i hidratar amb banc d'alcohols fins a H₂O destil·lada.
2. Tenyir amb solució de Sirius-Píctic al 0.1% durant 1 hora.
3. Rentar 2 cops amb solució d'aigua acidificada.
4. Deshidratar ràpidament amb un banc d'alcohols des de EtOH 70% fins a Xilol.
5. Muntar amb DPX.
6. Observar les mostres amb llum transmesa en un microscopi *Olympus BX41*.

3.14. Immunohistoquímica

Fonament de la tècnica

La immunohistoquímica és un mètode pel qual es poden localitzar proteïnes en cèl·lules de talls histològics per a la seva observació. La tinció immunohistoquímica es realitza mitjançant anticossos altament específics que reconeixen la proteïna diana. La interacció anticòs-antigen es pot visualitzar per diferents vies:

- **Cromogènica**: L'anticòs es troba conjugat amb un enzim que al tallar el substrat produeix un precipitat colorejat.
- **Fluorescent**: L'anticòs es troba conjugat amb un fluoròfor que es visualitza utilitzant microscòpia de fluorescència.

Preparació dels teixits

Els teixits es van preparar d'igual forma que per a les tincions histològiques, però els talls es van realitzar a 5 µm.

3.14.1. Immunohistoquímica cromogènica revelada amb DAB

Fonament de la tècnica

Es tracta d'una immunohistoquímica enzimàtica cromogènica basada en la reacció del complex Avidina-Biotina. L'Avidina té una gran afinitat per la Biotina i forma complexos on cada Avidina té 4 llocs d'unió per Biotina. Durant la immunohistoquímica l'anticòs primari s'uneix a la proteïna d'interès a detectar. Posteriorment, l'anticòs secundari biotinitat s'uneix a l'anticòs primari. Al afegir les molècules d'Avidina conjugades amb l'enzim HRP (Peroxidasa), aquestes s'uniran amb elevada afinitat amb la Biotina amplificant la senyal. Per últim, al afegir el substrat de la peroxidasa, el DAB (3,3' Diaminobenzidina), aquest serà tallat per l'enzim HRP donant lloc a una coloració marró permanent.

Tampons i reactius

- Xilol (*Sigma-Aldrich*)
- Banc d'alcohols: EtOH absolut, EtOH 70%, EtOH 30%
- Citrat sòdic dihidratat 10mM (*Sigma-Aldrich*)
- Tris-HCl 50mM (*Fluka*)
- Metanol al 3% H₂O₂ (*Sigma-Aldrich*)
- PBS (*Sigma-Aldrich*)
- *Dako Biotin Blocking System* (*Dako*)
- Sèrum antigoat (*Zymed*)
- AB Complex/HRP (*Dako*)
- Tampó peroxidasa (*Dako*)
- Hematoxilina ChemoHematox (*Dako*)
- *Dako Antibody Diluent Background Reducing Components* (*Dako*)
- Aquatex (*Merck*)

Protocol

1. Posar els talls histològics 10 minuts a l'estufa a 120°C fins que la parafina es desfaci.

2. Desparafinar amb Xilol 10 minuts.
3. Hidratar amb banc d'alcohols des de EtOH absolut fins a H₂O destil·lada.
4. Exposar els epítops del teixit o desemmascarar posant les mostres 10 minuts al l'estufa a 120°C en tampó citrat sòdic dihidratat 10mM.
5. Deixar refredar.
6. Bloquejar la peroxidasa endògena del teixit amb Metanol al 3% d'H₂O₂ durant 20 minuts.
7. A partir d'aquí i fins al punt 13 després de cada pas es van realitzar 3 rentats amb PBS 1X.
8. Bloquejar l'Avidina-Biotina endògena amb *Dako Biotin Blocking System* seguint les instruccions del fabricant.
9. Bloquejar l'anticòs secundari amb sèrum antigoat.
10. Incubar l'anticòs primari tota la nit a 4°C en una cambra humida. Diluir l'anticòs primari si és necessari amb *Dako Antibody Diluent Background Reducing Components*.
11. Afegir l'anticòs secundari biotinilat de 30 a 45 minuts en una cambra humida a temperatura ambient. Diluir l'anticòs secundari si es necessari amb *Dako Antibody Diluent Background Reducing Components*.
12. Afegir AB Complex/HRP, tal i com indica la casa comercial. Preparar en la foscor i barrejar bé. Deixar 30 minuts a temperatura ambient a la cambra humida.
13. Revelar amb el DAB diluït 1/10 amb el tampó peroxidasa.
14. Quan puja la coloració rentar ràpidament amb aigua corrent i contratenyir amb Hematoxilina.
15. Muntar amb Aquatex.
16. Les immunohistoquímiques van ser observades amb llum transmesa en un microscopi *Olympus BX41*.

Relació d'anticossos i dilucions utilitzades:

Anticossos primaris	Dilució	Hoste	Casa comercial
MPO	1:1	Conill	Abcam
α-SMA	1:100	Conill	Abcam

Anticòs Secundari	Dilució	Casa comercial
Conill biotinilat	1:200	Abcam

3.14.2. Immunohistoquímica de fluorescència

Tampons (mirar apartat 3.14.1.)

Protocol

1. Seguir el protocol 3.14.1. fins al pas 5.
2. A partir d'aquí i fins al punt 6 després de cada pas es van realitzar 3 rentats amb PBS 1X.
3. Bloquejar l'anticòs secundari amb sèrum antigat.
4. Afegir l'anticòs primari durant tota la nit a 4°C en una cambra humida. Diluir l'anticòs primari si és necessari amb *Dako Antibody Diluent Background Reducing Components*.
5. Incubar anticòs secundari 1 hora a temperatura ambient en una cambra humida i fosca. Diluir l'anticòs secundari si és necessari amb *Dako Antibody Diluent Background Reducing Components*.
6. Muntar amb *Fluorescent Mounting Medium (Dako)*.
7. Deixar 2 hores assecant-se a temperatura ambient en la foscor.
8. Conservar les immunohistoquímiques per a la seva correcta conservació a 4°C a les fosques.
9. Les immunohistoquímiques van ser observades amb fluorescència en un microscopi *Olympus BX41*.

Anticossos primaris, dilucions per fluorescència:

Anticossos primaris	Dilució	Hoste	Casa comercial
α -SMA	1:100	Conill	Abcam
CtsB	1:50	Conill	Upstate
CtsD	1:50	Cabra	St. Cruz Biotechnology
GFAP	1:50	Rata	Abcam

Anticossos secundaris, dilucions per fluorescència:

Anticossos secundaris	Dilució	Hoste	Casa comercial
Alexa Fluor 594 (vermell)	1:500	Cabra	Molecular Probes
Alexa Fluor 594 (vermell)	1:100	Conill	Molecular Probes
IgG-FITC (verd)	1:800	Rata	Abcam
Alexa Fluor 488 (verd)	1:100	Conill	Molecular Probes

3.15. Immunocitoquímica

Fonament de la tècnica

La immunocitoquímica és un mètode pel qual es poden localitzar proteïnes en cèl·lules cultivades. El marcatge en la immunocitoquímica es realitza mitjançant anticossos altament específics que reconeixen la proteïna diana. Per a aquest propòsit, es fixen i permeabilitzen les cèl·lules per garantir una correcta penetrabilitat de l'anticòs dins la cèl·lula. La interacció anticòs-antigen es visualitza per fluorescència.

Tampons i reactius

- Formalina neutra 10% (*Sigma-Aldrich*)
- PBS (*Sigma-Aldrich*)
- Saponina (*Sigma-Aldrich*)
- BSA lliure d'àcids grassos (*Sigma-Aldrich*)
- *Fluorescent Mounting Medium* (*Dako*)

Protocol

1. Aïllar i plaquejar les CEH primàries en cubres estèrils de 10mm de diàmetre en pous d'una placa de 24. Deixar créixer el temps desitjat per fer la immunocitoquímica, en aquest cas entre 5-6 dies.
2. Als 5-6 dies aspirar bé el medi i realitzar un parell rentats amb PBS.
3. Fixar les cèl·lules afegint 0.5 mL/pou de formalina 10% durant 10 minuts a temperatura ambient.
4. Rentar un parell de cops amb PBS 1X.
5. Permeabilitzar amb 0.1% Saponina en 0.5% BSA/PBS durant 10 minuts a temperatura ambient.
6. Rentar un parell de cops amb PBS 1X.
7. Bloquejar amb 3% BSA /PBS de 45 a 60 minuts a temperatura ambient.
8. Afegir l'anticòs primari en 1% BSA/PBS durant 2 hores a temperatura ambient.
9. Rentar tres cops amb PBS 1X.
10. Afegir l'anticòs secundari en 1% BSA/PBS durant 1 hora a temperatura ambient a les fosques.
11. Rentar tres cops amb PBS 1X a les fosques.
12. Muntar amb *Fluorescent Mounting Medium* (*Dako*) a les fosques.
13. Deixar assecar a les fosques tota la nit a temperatura ambient.

14. Les immunocitoquímiques van ser observades en un Microscopi Confocal de *Leica SPE*. Les imatges de colocalització van ser adquirides de forma seqüencial i amb un Pinhole de 1.

Anticossos primaris, dilucions per immunocitoquímica:

Anticossos primaris	Dilució	Hoste	Casa comercial
CtsB	1:25	Conill	Upstate
CtsD	1:50	Cabra	St. Cruz Biotechnology
Rab 7	1:50	Cabra	St. Cruz Biotechnology
Rab 5A	1:100	Conill	St. Cruz Biotechnology

Anticossos secundaris, dilucions per immunocitoquímica:

Anticossos secundaris	Dilució	Hoste	Casa comercial
Alexa Fluor 594 (vermell)	1:100	Conill	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 (verd)	1:100	Cabra	Molecular Probes

3.16. Quantificació de la proliferació cel·lular per assaig Timidina Tritiada

Fonament de la tècnica

Durant la divisió cel·lular, les cèl·lules incorporen timidina per sintetitzar el nou ADN. Així doncs, al afegir al medi de cultiu timidina marcada radioactivament amb triti (^3H), les cèl·lules la incorporaran al sintetitzar l'ADN sent un bon indicador de la proliferació cel·lular.

Tampons i reactius

- 5% TCA a 4°C (*Sigma-Aldrich*)
- 0.5N NaOH (*Sigma-Aldrich*)
- PBS (*Sigma-Aldrich*)
- Timidina ^3H (*Perkin Elmer*)
- Líquid de centelleig Optiphase (*Perkin Elmer*)

Protocol

1. Afegir la timidina ^3H al medi de cultiu de les CEH a dosi 0.5 $\mu\text{Ci/pou}$. Deixar les cèl·lules incubant amb timidina ^3H un temps fixat sempre el mateix, en el nostre cas 20 hores.
2. Treure el medi de cultiu.
3. Fer dos rentats amb PBS.
4. Fixar les cèl·lules afegint 5% TCA fred i posar la placa a 4°C durant 30 minuts.
5. Descartar el TCA al 5% i fer dos rentats amb TCA al 5%.
6. Afegir 2.5 mL (en el cas de plaques de 6 pous) o 1.5 mL (en el cas de plaques de 12 pous) de NaOH 0.5N durant 5 minuts a temperatura ambient per solubilitzar les cèl·lules.
7. Transferir 2 mL del contingut dels pous (en el cas de plaques de 6 pous) o 1 mL (en el cas de plaques de 12 pous) a vials de centelleig i afegir 8 o 9 mL respectivament de líquid de centelleig.
8. Vortejar intensament i llegir en un comptador de centelleig (*Wallac*) durant 1 minut cada vial.
9. Els residus van ser descontaminats pel Servei de Medicina Nuclear de l'Hospital Clínic de Barcelona.

3.17. Transfecció amb ARNi de les CEH

Fonament de la tècnica

El silenciament de proteïnes per ARN d'interferència consisteix en la utilització d'ARN de pocs parells de bases (*Small Interfering RNA* o ARNi) que hidrida específicament amb l'ARN missatger (ARNm) diana. El producte de doble cadena resultant es degradat per les ARNases cel·lulars. D'aquesta manera s'aconsegueix disminuir els nivells d'expressió de la proteïna d'interès. Existeixen diverses tècniques de transfecció, concretament en aquesta tesi es va escollir el mètode de la lipofecció. Aquest mètode es basa en la formació de complexos entre lípids catiónics i l'ARNi. El complex té afinitat per la membrana i permet l'entrada de l'ARNi en el citosol de les cèl·lules.

Tampons i reactius

- Lipofectamina LTX Plus (*Invitrogen*)
- Plus Reagent (*Invitrogen*)

- Optimem (*Invitrogen*)
- ARNi CtsB, ARNi CtsD, ARNi ASMasa tant d'humà com de ratolí i els seves seqüències aleatòries corresponents van ser obtinguts de *St. Cruz Biotechnology*.

Protocol

1. Barrejar (per pou de placa de 6) 200 µL d'Optimem, 5 µL Plus Reagent i 100 nmol de ARNi i vortejar.
2. Incubar durant 15 minuts a temperatura ambient.
3. Afegir 6 µL de Lipofectamina LTX i vortejar.
4. Incubar 25 minuts a temperatura ambient.
5. Afegir la barreja per a cada pou d'una placa de 6 que conté 1 mL de DMEM al 10% FBS.
6. La transfecció es va portar fins a 24 hores quan es va voler obtenir ARN i 48 hores quan es va voler determinar proteïna.

3.18. Extracció d'ARN en CEH o teixit hepàtic [176]

Fonament de la tècnica

L'extracció de l'ARN es va fer mitjançant l'agent químic TRIzol que permet l'aïllament de l'ARN total de cèl·lules i teixits. El TRIzol és una solució monofàsica de fenol i isotiocianat de guanidina. Durant l'homogeneïtzació o la lisi el TRIzol manté la integritat de l'ARN, mentre que trenca les cèl·lules i dissol els components cel·lulars. L'addició de cloroform seguida d'una centrifugació, separa la solució en una fase aquosa i una orgànica. L'ARN es troba a la fase aquosa, de la qual es recuperat per precipitació amb 2-Propanol.

Tampons i reactius

- TRIzol (*Invitrogen*)
- Cloroform lliure d'ARNases (*Sigma-Aldrich*)
- 2-Propanol lliure d'ARNases (*Sigma-Aldrich*)
- Aigua lliure d'ARNases (*Sigma-Aldrich*)

Protocol

El protocol es va realitzar tant en CEH com en fetge total, així doncs el protocol és comú a partir del punt 3.

- Extracció de ARN de CEH

- 1.a. Afegir 750 µL de TRIzol per pou de 6 i esperar 5 minuts a temperatura ambient.
- 2.a. Recollir el TRIzol i passar-lo a un eppendorf.

- Extracció de ARN de fetge

- 1.b. Afegir 200 µL de TRIzol a 25-50 mg de fetge, deixar 5 minuts a temperatura ambient i homogeneïtzar amb èmbols estèrils (*Sigma-Aldrich*).
- 2.b. Afegir 500 µL de TRIzol i barrejar per inversió.
3. Afegir 200 µL de Cloroform i barrejar per inversió 15 vegades i deixar 3 minuts a temperatura ambient.
4. Centrifugar a 12000 rpm durant 15 minuts a 4°C.
5. Recuperar al voltant de 500 µL de la fase aquosa.
6. Afegir 500 µL de 2-Propanol i barrejar-ho bé.
7. Deixar 10 minuts a temperatura ambient.
8. Centrifugar a 12000 rpm durant 10 minuts a 4°C.
9. Rentar el pellet (ARN) amb 1 mL d'EtOH 70% i guardar-lo a -20°C durant tota nit.
10. L'endemà centrifugar a 12000 rpm durant 10 minuts a 4°C i resuspendre l'ARN en 50 µL d'aigua estèril en el cas de CEH i 100-150 µL en el cas de fetge.

L'ARN es va quantificar en un espectrofotòmetre (*NanoDrop*) mesurant l'absorbància a 260 nm i 280 nm. Tenint en compte que una solució d'ARN que tingui una absorbància a 260 igual a 1 conté aproximadament 40 µg d'ARN per µL, es va poder calcular la concentració. La puresa del ARN es va avaluar pel ratio $A_{260/280}$ que sempre es va trobar entre 1.6-1.9.

3.19. RT-PCR quantitativa a temps real

Fonament de la tècnica

La PCR quantitativa a temps real és idèntica a una PCR convencional exceptuant la monitorització de la progressió de la reacció gràcies a una càmera de detecció de fluorescència. Concretament es va fer servir un marcador fluorescent (SYBR green). Aquest marcador fluorescent només dona fluorescència quan s'uneix a la doble cadena d'ADN. Així doncs, a mida que el número de còpies augmenta també augmenta la fluorescència.

Tampons i reactius

- SensiMix One-Step Kit (*Quantance*)
- Fluoresceïna (*Quantance*)
- Encebadors 50 μ M (*Invitrogen*).

Protocol

Les reaccions es van dur a terme segons les especificacions del fabricant en un *MxQ single color real-time PCR Detection System de Biorad*. Per una reacció de 25 μ L es va afegir:

- 2X Sensi Mix \rightarrow 12.5 μ L
- 50X SYBR Green \rightarrow 0.5 μ L
- Inhibidor de les ARNases \rightarrow 0.5 μ L
- Aigua \rightarrow 2.5 μ L
- Encebador mix 5 μ M \rightarrow 3 μ L
- 25X Fluoresceïna \rightarrow 1 μ L
- RNA 8 ng/ μ L \rightarrow 5 μ L

Programa

1. 10 min a 50°C.
2. 5 minuts a 95°C.
3. 40 cicles:
 - a. 15 segons a 95°C.
 - b. 25 segons a 55°C.
 - c. 35 segons a 72°C.

Corba de fusió del producte de PCR

3. 80 repeticions de 1 minut a 95°C.
4. 10 segons a 55°C.

Cada reacció es va realitzar per duplicat, i el *Cross Thershold* (CT) de l'ARN d'anàlisi es va comparar amb l'ARNm constitutiu β actina per les CEH i GAPDH en el cas dels fetges. Els càlculs es van realitzar segons el mètode de la Delta-Delta CT [177]. Els encebadors utilitzats van ser els següents:

Encebadors per ratolí

α -SMA (NM_007392) sentit	5'ACTACTGCCGAGCGTGAGAT-3'
α -SMA (NM_007392) antisentit	5'-AAGGTAGACAGCGAAGCCAA -3'
Col·lagen1A1 (NM_007742) sentit	5'-ACTTCAGCTTCCTGCCTCAG-3'
Col·lagen1A1 (NM_007742) antisentit	5'-TGACTCAGGCTCTTGAGGGT-3'
TGF β (NM_011577) sentit	5'-GTCAGACATTCGGGAAGCAG-3'
TGF β (NM_011577) antisentit	5'-GCGTATCAGTGGGGGTCA-3'
OAS1 (AF 466822) sentit	5'-GACCTGCTGAAGGAGGTGAA-3'
OAS1 (AF 466822) antisentit	5'-GGTACGCCCACTGATGAGAT-3'
GAPDH (NM_008084) sentit	5'CGACCCCTTCATTGACCTCAA -3'
GAPDH (NM_008084) antisentit	5'-CCTTCTCCATGGTGGTGAAGA -3'
β actina (NM_007393) sentit	5'-GACGGCCAGGTCATCACTAT-3'
β actina (NM_007393) antisentit	5'-CGGATGTCAACGTCACACTT-3'

Encebadors per humana

α -SMA (NM_001613) sentit	5'-CCGACCGAATGCAGAAGG-3'
α -SMA (NM_001613) antisentit	5'-ACAGAGTATTGCGCTCCGGA-3'
TGF β (NM_000660) sentit	5'-GGACACCAACTATTGCTTCAG-3'
TGF β (NM_000660) antisentit	5'-TCCAGGCTCCAAATGTAGG-3'
GAPDH (NM_002046) sentit	5'-ACGGATTGTTGGTTCGTATTGGG-3'
GAPDH (NM_002046) antisentit	5'-GATTTTGGAGGGATCTCGC-3'
β actina (NM_001101) sentit	5'-GATGAGATTGGCATGGCTTT-3'
β actina (NM_001101) antisentit	5'-GAGAAGTGGGGTGGCTT-3'

3.20. Estadística

Tots els experiments mostrats són resultat de com a mínim tres observacions independents. Es mostren com a mitjana amb la seva desviació estàndard a menys que s'indiqui el contrari en el peu de figura. L'anàlisi estadístic es va realitzar amb el programa informàtic Microsoft Excel. La significació estadística entre grups experimentals es va realitzar utilitzant el test *t* de *Student* no paramètric per dades no aparellades.

◦ ◦ ● 4. Resultats

Bloc I: Caracterització de la contribució de la CtsB
i la CtsD al procés d'activació de les CEH i al model de
fibrogènesi per CCl_4

4.1. Expressió de les catepsines B i D durant l'activació de les CEH de ratolí

Es va fer servir el model de cultiu en plàstic de CEH per tal d'induir la seva activació (veure apartat 1.1.3. de la Introducció). Es van aïllar CEH de ratolí i es va estudiar l'expressió de catepsina B i D al llarg dels temps de cultiu. Com es mostra a la Figura 11A, l'expressió de les catepsines B i D és quasi imperceptible en CEH quiescents (dia 2). Malgrat això es veu un augment important d'ambdues catepsines al llarg del temps de cultiu, arribant al seu màxim entre 7 i 10 dies. A més, paral·lelament a l'augment de les catepsines, es va veure un augment de l' α -SMA (Figura 11A), indicador de la transformació fenotípica de les CEH a CEH/MFs.

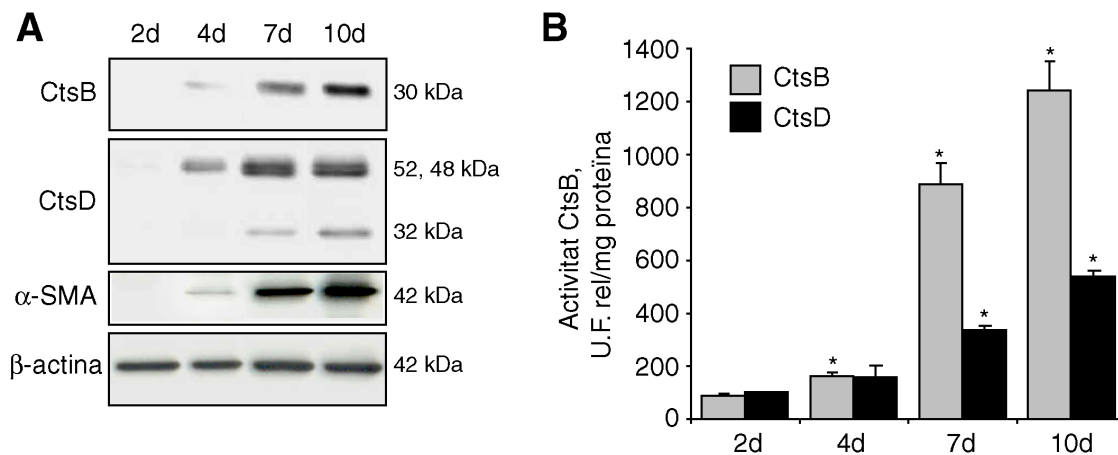


Figura 11: (A) Expressió de les proteïnes CtsB, CtsD i α -SMA per *Western blot* al llarg del temps d'activació de CEH de ratolí. (B) Activitat CtsB i CtsD. Les dades són mitjanes \pm D.E., * $P \leq 0.05$ vs CEH de 2d.

L'augment de l'expressió de proteïna observat en la Figura 11A es va veure acompanyat d'un increment en l'activitat funcional d'ambdues catepsines (Figura 11B). Encara més important va ser la presència de CtsB i CtsD en medis extracel·lulars procedents de CEH de 7 dies (Figura 12A). Aquest fet és consistent amb l'estudi de Kristensen *et al.* [162], on es va identificar la CtsD com una de les 8 proteïnes secretades que augmentava la seva expressió fins a 6 vegades en CEH activades respecte CEH quiescents, d'un total de 150 proteïnes descrites en CEH. Com es mostra en la Figura 12A, el pes molecular de les catepsines secretades al medi extracel·lular (ME) és menor que el que s'observa en el lisat total de cèl·lules (LC). Concretament, la forma secretada de la CtsB té un pes molecular de 25 KDa, mentre que la forma activa intracel·lular té un pes de 30 KDa, que correspon a la

forma activa de doble cadena de l'enzim [173]. Sorprenentment, la forma secretada de la CtsD correspon a una forma d'aproximadament 28 KDa. Aquesta forma, no descrita prèviament, és més petita que la forma madura de doble cadena observada intracel·lularment de 32 KDa.

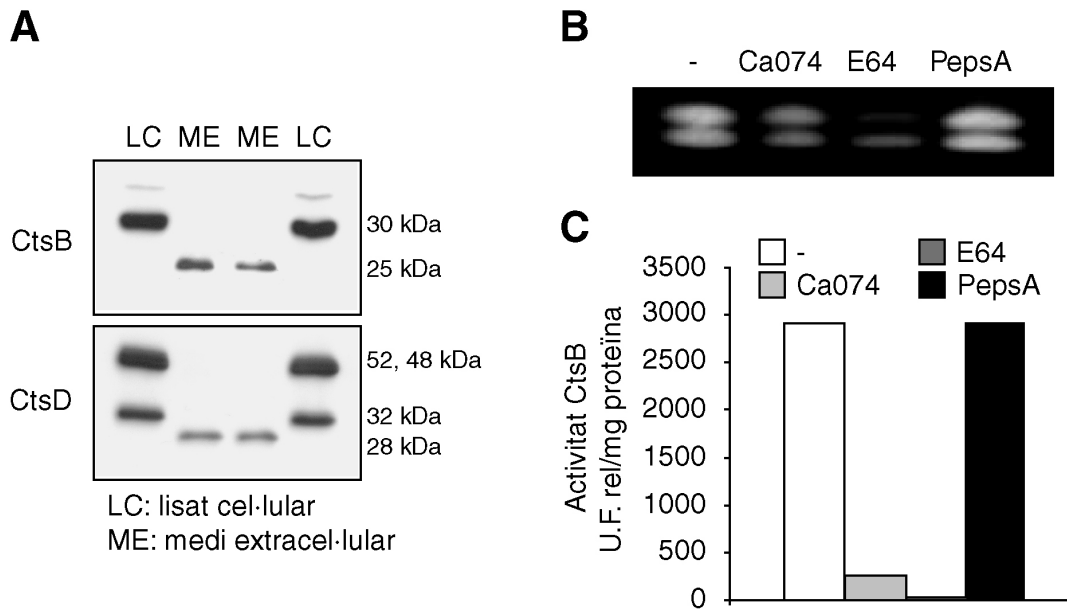


Figura 12: (A) L'expressió de la CtsB i la CtsD present en el ME difereix de la trobada en el LC. (B) Activitat col·lagenolítica de la CtsB per zimografia de gelatina, en condicions d'inhibició de les metal·loproteases. (C) Activitat de la CtsB enfront als inhibidors utilitzats en la zimografia.

A més, al realitzar una zimografia àcida de gelatina es va veure que en extractes de CEH activades hi havia capacitat per a degradar col·lagen desnaturalitzat (gelatina) (Figura 12B). Aquesta activitat col·lagenolítica podia ser parcialment bloquejada per Ca074 (10 μ M), inhibidor específic de la CtsB [178], o quasi completament per E64 (10 μ M), inhibidor de les cisteïn proteases [179], indicant que la CtsB era majoritàriament responsable d'aquesta degradació. D'altra banda es va utilitzar la Pesptatina A a dosi 100 μ M, inhibidor de les aspartil proteases [180], que no va ser capaç de disminuir la degradació del col·lagen, mostrant que la CtsD probablement no tenia activitat gelatinasa. L'eficiència dels inhibidors utilitzats en la zimografia sobre l'activitat de la CtsB es mostren en la Figura 12C. Així doncs, les cisteïn catèpsines incloent la CtsB podrien estar implicades en la remodelació de la matriu extracel·lular. Finalment, tant la catèpsina B com la catèpsina D es localitzen als lisosomes en CEH de 7 dies (Figura 13A). D'acord amb la seva localització lisosomal, ambdues catèpsines col·localitzen l'una amb l'altra en un patró puntejat (Figura 13B), sent l'expressió de CtsB més prominent (vermell) que la de CtsD (verd). A més, les dues catèpsines col·localitzen parcialment amb Rab 5A i Rab 7, marcadors d'endosomes

primerencs i tardans respectivament. Això indica una possible via d'internalització d'aquests enzims des de l'exterior cel·lular cap al lisosoma (Figura 13C).

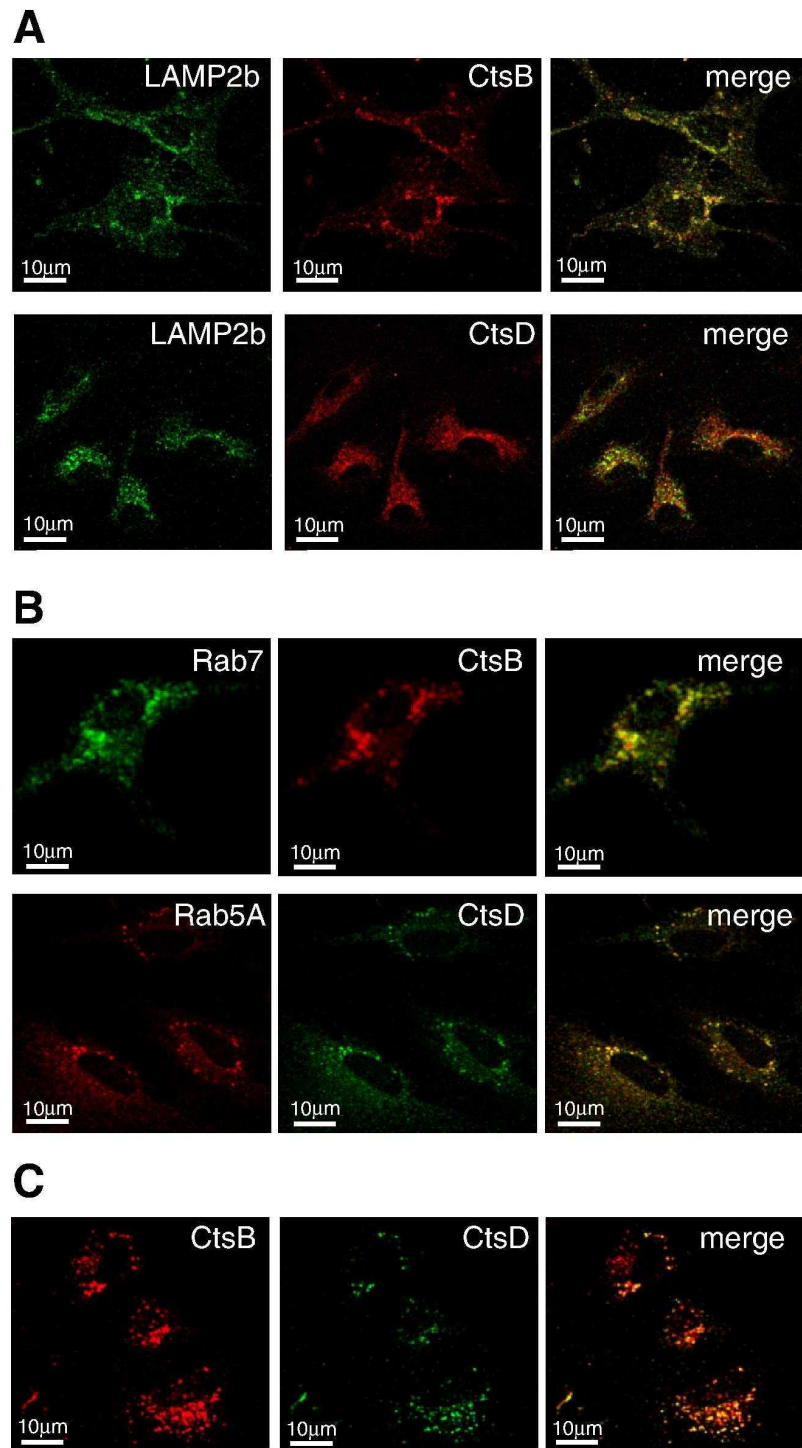


Figura 13: Imatges de microscòpia confocal de CEH de 7 dies. (A) Colocalització de la CtsB o la CtsD amb LAMP2b (marcador lisosomal). (B) Colocalització de la CtsB o la CtsD amb Rab7 o Rab5A respectivament. Rab 7 es va utilitzar com a marcador d'endosomes tardans i Rab 5A com a marcador d'endosomes primerencs. (C) Colocalització de la CtsB amb la CtsD.

4.2. El silenciament gènic de la CtsB i/o la CtsD disminueix la proliferació i l'expressió de gens fibrogènics en CEH de ratolí

Es va voler determinar la contribució de la CtsB i la CtsD al procés d'activació de les CEH, silenciant l'expressió d'aquestes proteases amb ARNi. CEH de 5 dies van ser transfectades amb ARNi control, de CtsB i/o de CtsD. La transfecció va disminuir en més d'un 80% els nivells proteics de CtsB i CtsD, tant en lisats cel·lulars (LC) com en medi extracel·lular (ME) (Figura 14A). El silenciament tant de la CtsB com de la CtsD va donar lloc a una disminució de la proliferació cel·lular (Figura 14B), respecte les CEH transfectades amb l'ARNi control. El silenciament de la CtsD va causar un efecte més acusat sobre la proliferació que el silenciament de la CtsB. El bloqueig simultani d'ambdues catèpsines va resultar en una potenciació sinèrgica de l'efecte d'inhibició sobre la proliferació (Figura 14B).

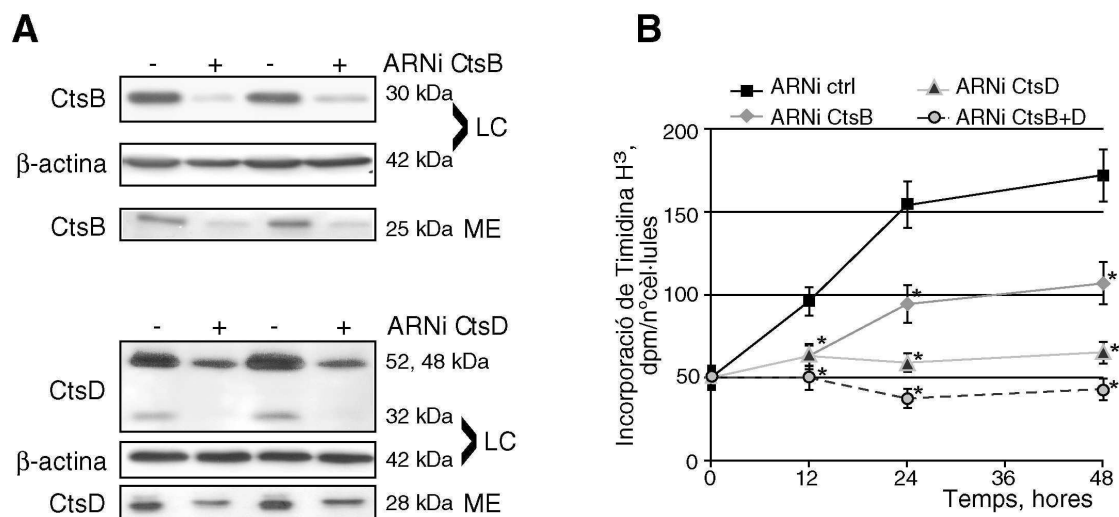


Figura 14: (A) Expressió de la CtsB i la CtsD davant del silenciament amb els seus respectius ARNi tant en lisat cel·lular (LC) com en medi extracel·lular (ME). (B) Proliferació de les CEH transfectades amb ARNi control (ctrl), ARNi CtsB, ARNi CtsD o ARNi CtsB+D durant 48 hores. Les dades són mitjanes \pm D.E., * $P \leq 0.05$ vs CEH transfectades amb ARNi ctrl.

A més, a les 24 hores de transfecció amb els ARNi de la CtsB i/o de la CtsD també es van veure afectats els nivells de marcadors d'activació de les CEH com α -SMA i TGF β , sense afectació del gen de resposta a interferó OAS1 (2'-5' Oligoadenilat sintetasa 1) [181], indicant que la transfecció no induïx la resposta a interferó (Figura 15A). Com a control positiu de la resposta a interferó es va utilitzar lipopolisacàrid (1 μ g/mL, 24 hores) que va induir un augment de 6 a 7 vegades en l'expressió de l'ARNm del gen OAS1.

Per altra banda, es va observar una disminució molt acusada de la migració de les CEH transfectades amb ARNi CtsB, però no en les transfectades amb ARNi CtsD. Així doncs, la CtsB podria tenir un paper en la regulació de la migració de les CEH (Figura 15B).

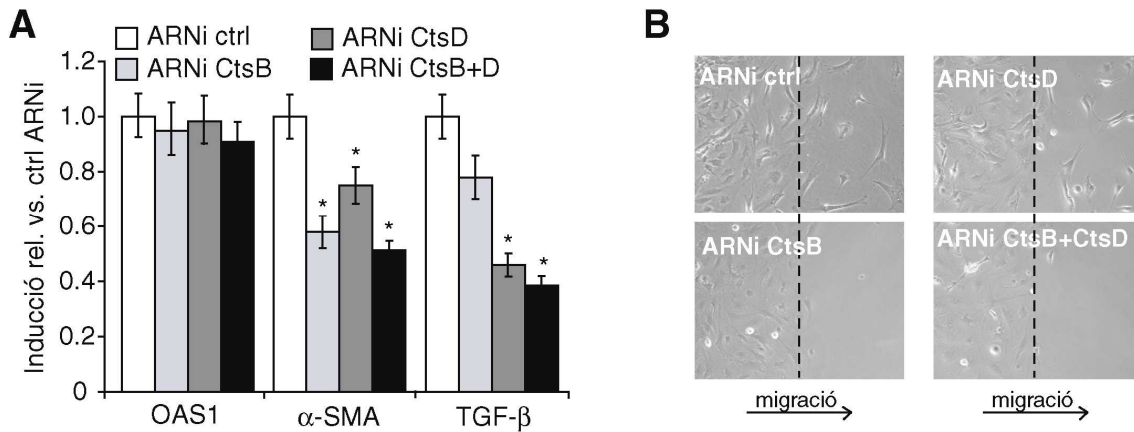


Figura 15: (A) Expressió de OAS1, α -SMA i TGF β davant la transfecció amb ARNi (B) Migració per *wound healing* en CEH de 7 dies transfectades 48 hores amb ARNi per CtsB i/o CtsD. Les dades són mitjanes \pm D.E., *P \leq 0.05 vs CEH tranfectades amb ARNi ctrl.

Paral·lelament a l'efecte observat amb ARNi, la inhibició farmacològica de l'activitat de la CtsB amb Ca074-Me [182] (Figura 16A) va donar lloc a una regulació negativa de la proteïna α -SMA i del seu ARNm, així com del de TGF β (Figura 16B i C).

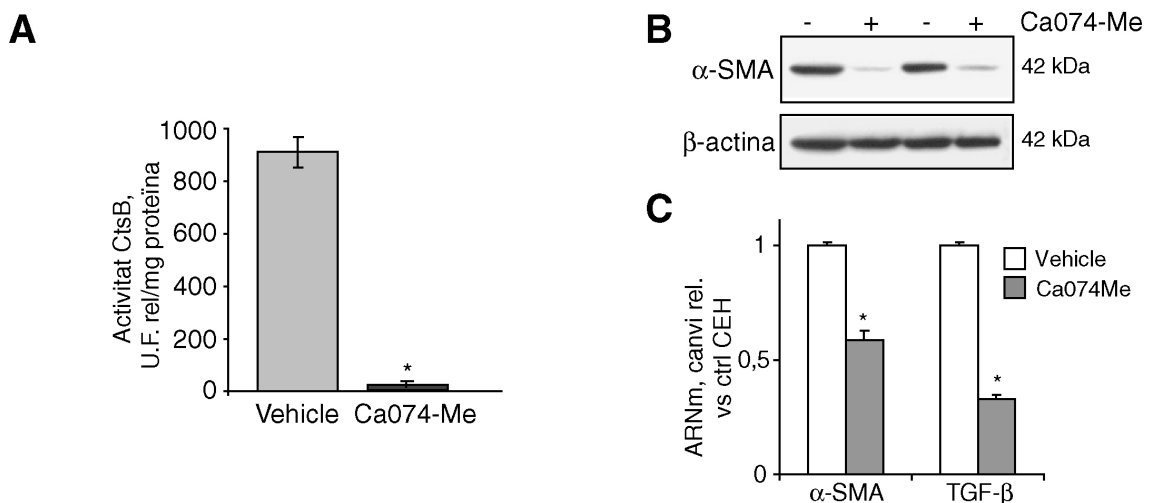


Figura 16: (A) Activitat de la CtsB davant de l'inhibidor Ca074-Me a dosi 10 μ M (B) Expressió de l' α -SMA en CEH de 7 dies després de 48 hores de tractament amb Ca074-Me. (C) Expressió dels ARNm d' α -SMA i TGF β amb i sense Ca074-Me. Les dades són mitjanes \pm D.E., *P \leq 0.01 vs CEH tractades amb vehicle.

4.3. Paper de la CtsB i la CtsD en la línia cel·lular de CEH humanes LX2

Per tal d'examinar la rellevància dels resultats en CEH primàries de ratolí en la fibrogènesi humana, es va analitzar l'expressió de la CtsB i la CtsD en les cèl·lules LX2, línia cel·lular de CEH humanes similar a les CEH/MFs [167]. Com s'aprecia en la Figura 17, les LX2 expressen tant la CtsB com la CtsD, no només en lisats cel·lulars sinó també en el medi extracel·lular (Figura 17A i B). A més, l'activitat CtsB de les LX2 va ser similar a la trobada en CEH de ratolí a 10 dies de cultiu (Figura 18A).

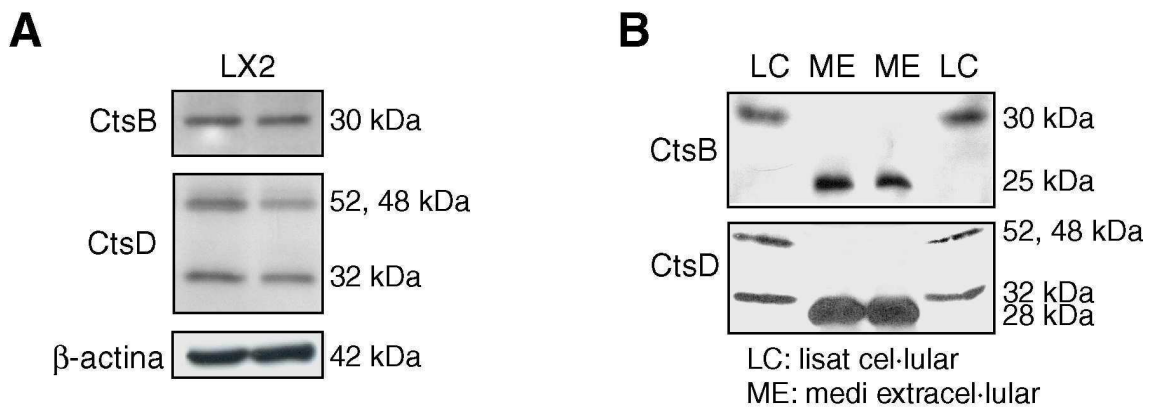


Figura 17: (A) Expressió de la CtsB i la CtsD en LX2 (B) Expressió de la CtsB i la CtsD en lisats cel·lulars (LC) i medi extracel·lular (ME) de LX2.

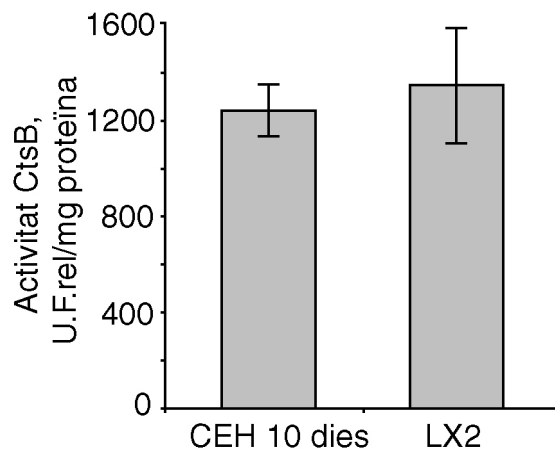


Figura 18: Activitat de la CtsB en LX2 i CEH de ratolí cultivades 10 dies.

El silenciament de la CtsB amb ARNi o la seva inhibició farmacològica amb Ca074-Me va resultar en una disminució d' α -SMA tant a nivell de proteïna com d'ARNm (Figura 19A i B). Aquest efecte no es va observar al silenciar la CtsD.

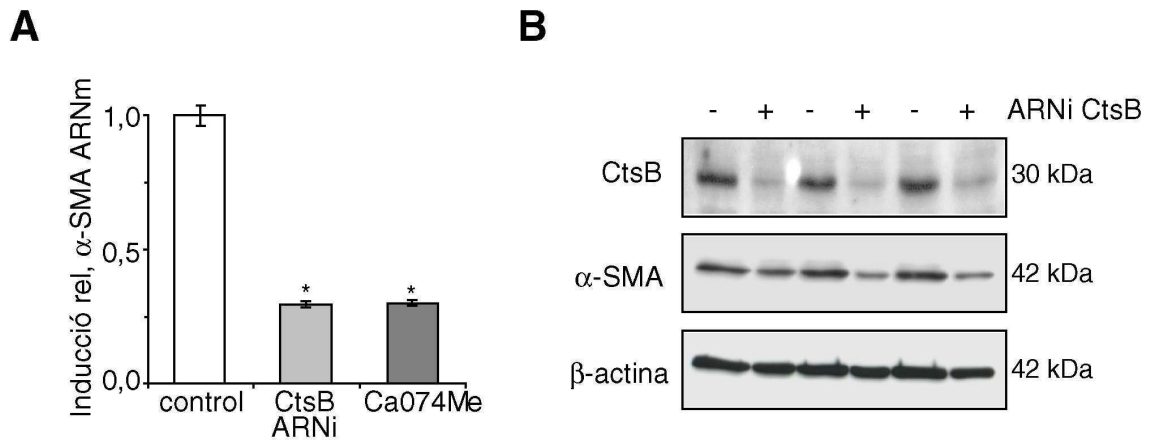


Figura 19: (A) Expressió relativa de l'ARNm de l' α -SMA en LX2 després del silenciament de la CtsB durant 48 hores o la seva inhibició amb Ca074-Me. (B) Expressió de la proteïna α -SMA després del silenciament amb ARNi CtsB. Les dades són mitjanes \pm D.E., * $P \leq 0.01$ vs LX2 ctrl.

Malgrat això, la reducció dels nivells de CtsB i/o D amb ARNi van disminuir la proliferació respecte els controls transfectats amb ARNi control (Figura 20). Contràriament al que s'havia vist amb CEH primàries de ratolí, la inhibició de la CtsB amb Ca074-Me no va afectar l'expressió de l'ARNm de TGF β ni la migració de les LX2. Probablement, això és degut al fet que les LX2 representen un model de CEH activades, cosa que pot comportar diferències en la senyalització per TGF β en les LX2 respecte les CEH en la fase inicial del procés de transdiferenciació [167], [183].

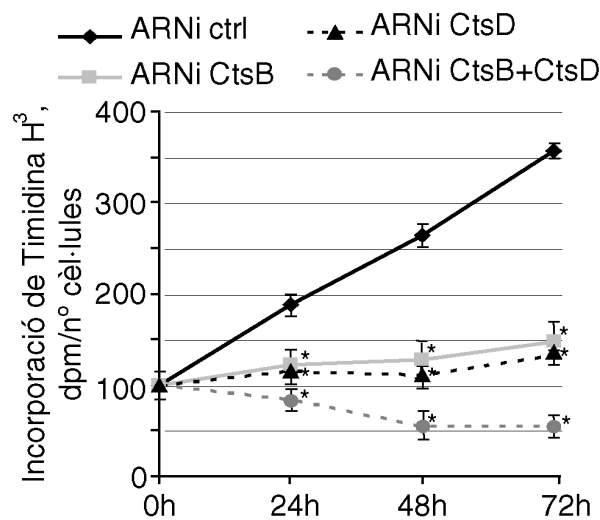


Figura 20: Proliferació de les LX2 després del silenciament de CtsB i/o CtsD amb ARNi. Les dades són mitjanes \pm D.E., * $P \leq 0.05$ vs LX2 transfectades amb ARNi ctrl.

4.4. Processament de la CtsB i la CtsD en CEH de ratolí

Com ja s'ha comentat prèviament en la introducció, les catèpsines són sintetitzades com a precursors inactius, que són posteriorment processats, tant autocatalíticament [184], [106] com per altres enzims. En aquest sentit, s'ha descrit tant la participació de la CtsB en el processament de la CtsD [105] com el paper que la CtsD juga en el processament del precursor de la CtsB [185].

Tenint en compte aquests antecedents es va examinar l'efecte de la inhibició o el silenciament de la CtsB i la CtsD en el seu processament recíproc en CEH de ratolí. Com s'observa en la Figura 21A, la inhibició de la CtsB amb Ca074-Me augmenta la proforma de la CtsD (52-48 KDa), mentre que disminueix la forma madura lisosomal (32 KDa). De forma similar, la inhibició de la CtsD amb Pepstatina A, inhidor de les aspartil proteases, provoca una disminució de la forma madura de 30 KDa de la CtsB (Figura 21B).

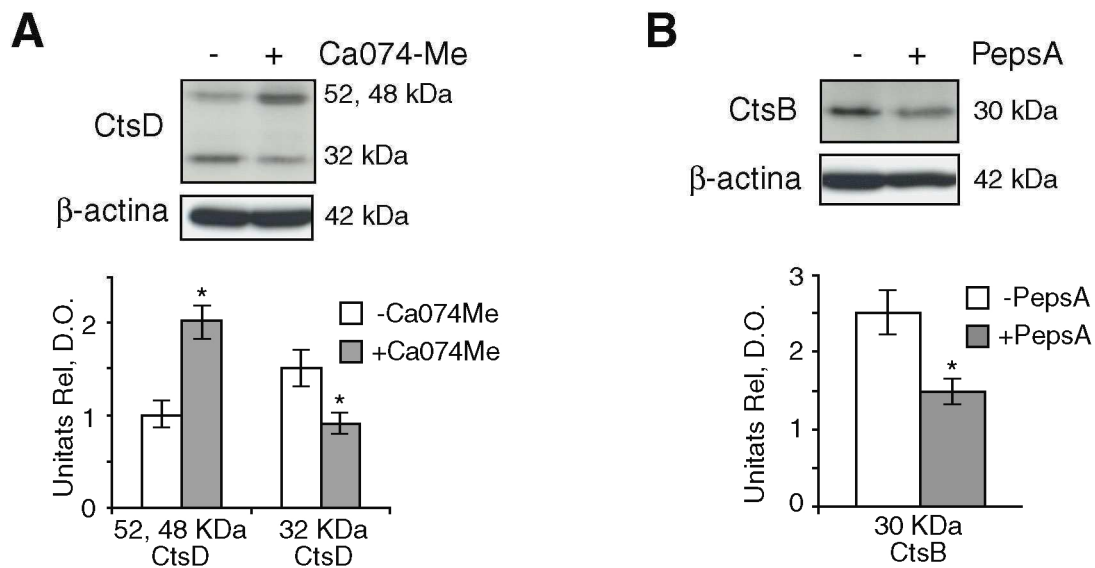


Figura 21: (A) La inhibició de la CtsB en CEH de 5 dies amb Ca074-Me 10 μ M durant 24 hores afecta el processament de la CtsD. (B) La inhibició de la CtsD amb Pepstatina A 10 μ g/mL durant 24 hores provoca una disminució de la forma activa de la CtsB. Les dades són mitjanes \pm D.E., *P \leq 0.05 vs CEH no tractades.

Es van obtenir resultats comparables al silenciar la CtsB (Figura 22A) i la CtsD (Figura 22B) amb ARNi. A la llum d'aquests resultats, sembla que tant la CtsB com la CtsD contribueixen mútuament al seu processament proteolític en CEH de ratolí.

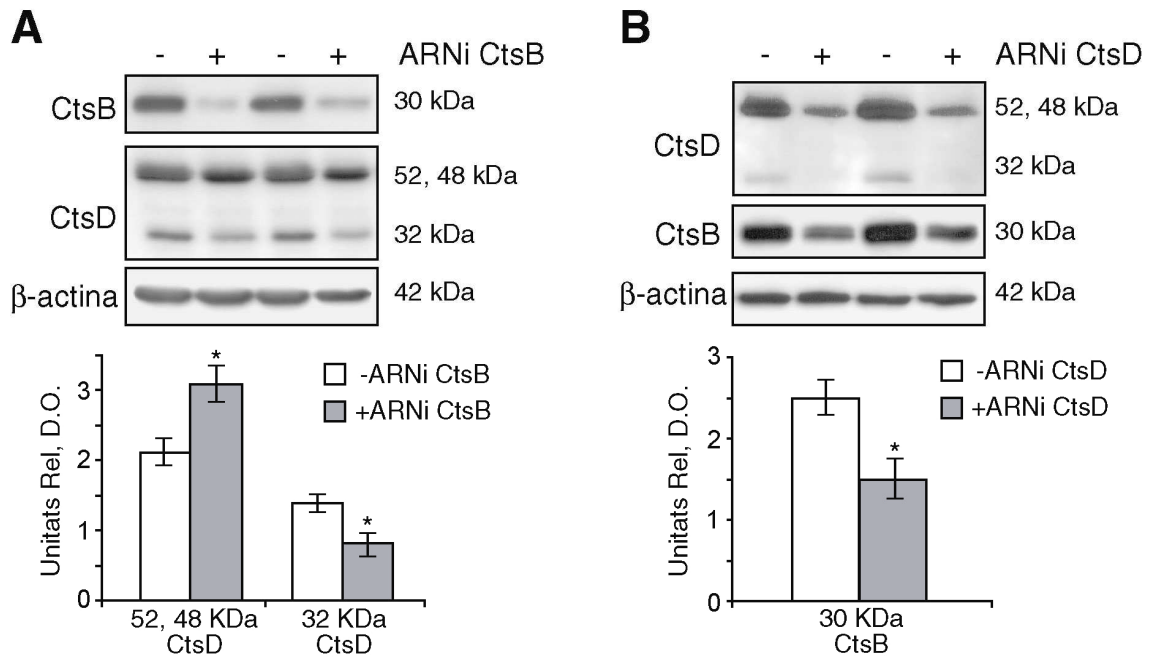


Figura 22: (A) El silenciament de la CtsB o (B) la CtsD en CEH de 5 dies durant 48 hores afecta el processament de la CtsD o la CtsB respectivament. Les dades són mitjanes \pm D.E., * $P \leq 0.05$ vs CEH transfectades amb ARNi ctrl.

4.5. La CtsB modula la via de Fosfoinositol 3 Cinasa/AKT en CEH ratolí activades

En CEH s'ha descrit com l'activació d'AKT a través de PDGF BB regula la supervivència [186], la proliferació i la deposició de col·lagen [187]. El PDGF és un dímer format per dos cadenes polipeptídiques, la cadena A i la cadena B. Dels tres possibles dímers PDGF BB és el més potent estimulant el creixement i la senyalització intracel·lular en CEH activades, això correlaciona amb la predominança dels receptors PDGF β (tipus B) en aquestes cèl·lules respecte els PDGF α (tipus A) [188]. La unió del PDGF al seu receptor provoca el reclutament de diverses molècules entre elles la PI3K, la qual és necessària per la mitogènesi i la quimiotaxi. La PI3K, s'ha vist implicada en la activació d'AKT a través de la síntesi de fosfoinosítides [189]. Per altra banda, el receptor de PDGF β (PDGF β -R) juga un paper fonamental en la transformació de CEH quiescents a CEH/MFs i s'ha descrit la seva degradació causada per l'acció de les catèpsines en les CEH [190], [191]. Així doncs, es va voler analitzar el paper de la CtsB i la CtsD en la modulació de l'expressió de PDGF β -R. En primer lloc es va examinar el nivell de PDGF β -R en CEH des del dia 2 de cultiu al dia 10, i

es va veure que l'expressió de PDGF β -R augmentava al llarg del temps d'activació de les CEH (Figura 23) de forma paral·lela a la CtsB i la CtsD (Figura 11A).

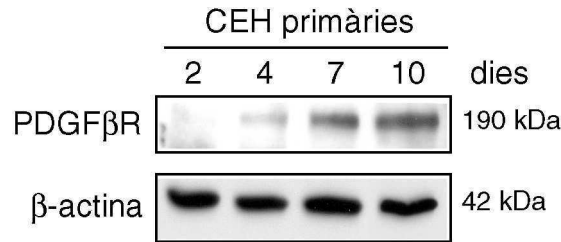


Figura 23: Nivells proteics de PDGF β -R durant l'activació de CEH des del dia 2 al dia 10 de cultiu.

Posteriorment, es va analitzar l'efecte de la inhibició de la CtsB amb Ca074-Me o de la CtsD amb Pepstatina A sobre la degradació de PDGF β -R en CEH tractades amb el seu lligand, PDGF BB. La inhibició farmacològica de CtsB o CtsD no va afectar la degradació de PDGF β -R induïda pel seu lligand PDGF BB (Figura 24A i B).

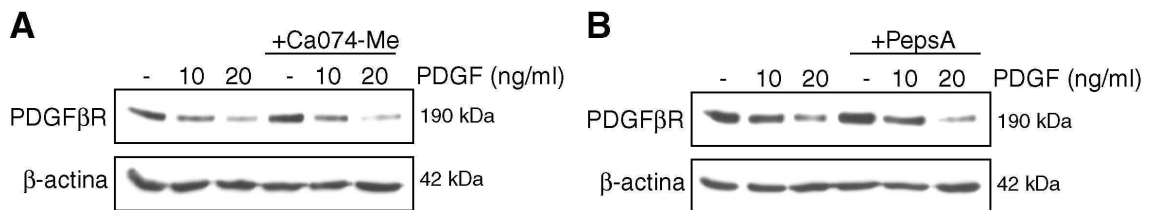


Figura 24: (A) Efecte de la inhibició de la CtsB (10 μ M, 24 hores) o (B) de la CtsD (10 μ g/mL, 24 hores) sobre la degradació de PDGF β -R després de l'estímul amb PDGF BB durant 1 hora.

Es va veure que tot i que PDGF BB produïa una ràpida fosforilació d'AKT, observada només als 15 minuts de l'estímul en CEH activades, al tractar-les amb l'inhibidor de la CtsB aquesta fosforilació es veia significativament disminuïda (Figura 25A). A més, aquesta disminució sobre la fosforilació d'AKT induïda per PDGF BB era independent de CtsD, ja que al tractar-les amb Pepstatina A no s'observava cap efecte (Figura 25B).

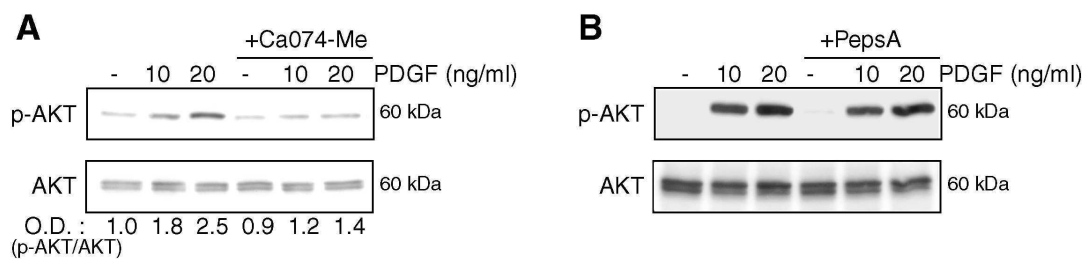


Figura 25: (A) Efecte de la inhibició de la CtsB (10 μ M, 24 hores) o (B) de la CtsD (10 μ g/mL, 24 hores) sobre la fosforilació d'AKT després de l'estímul amb PDGF BB durant 15 minuts.

Al inhibir la via de fosfoinositol 3 cinasa (PI3K)/AKT amb LY294002 es van observar efectes similars als que prèviament s'havien obtingut amb l'inhibidor de la CtsB. Així doncs, LY294002 va bloquejar la fosforilació d'AKT induïda per PDGF BB (Figura 26A) i va disminuir la proliferació de CEH després de l'estimulació amb PDGF BB (Figura 26B).

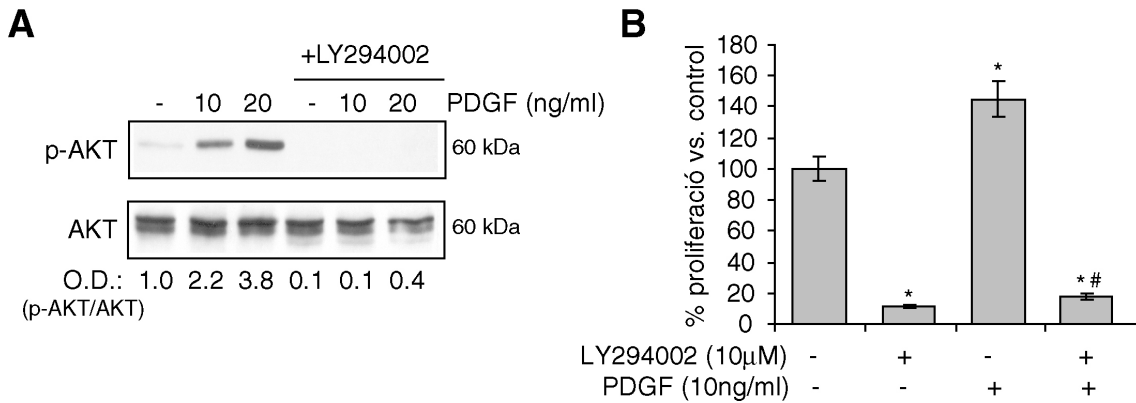


Figura 26: (A) Efecte de la inhibició de PI3K per LY294002 (10μM, preincubació 1 hora) sobre la fosforilació d'AKT per PDGF BB (15 minuts). (B) Proliferació de CEH per incorporació de timidina ³H durant 24 hores amb LY294002 i/o PDGF BB. Les dades són mitjanes ± D.E., *P ≤ 0.05 vs CEH control, # P ≤ 0.01 vs CEH tractades amb PDGF BB.

Tots aquests resultats suggereixen una regulació del potencial mitogènic de les CEH per part de la CtsB a través de la modulació de la via PI3K/AKT en resposta a PDGF BB.

4.6. Sobreexpressió de la CtsB en ratolins tractats amb CCl₄

Tenint en compte els resultats previs, els quals suggereixen un paper important de la CtsB i la CtsD en l'activació de les CEH de ratolí, es va decidir investigar la seva expressió *in vivo* en el model de fibrosi induïda per CCl₄ (apartat 3.1. de Material i mètodes).

L'anàlisi immunohistoquímic de seccions de fetge d'animals control i animals tractats amb CCl₄ va revelar una intensa colocalització de CtsB amb GFAP, com a marcador de CEH [192], només en els animals tractats amb CCl₄ (Figura 27A). Per altra banda, la detecció de CtsD en les seccions es va revelar més difusa i amb un patró similar en animals control i animals tractats CCl₄ col·localitzant parcialment amb GFAP (Figura 27B). Aquests resultats suggereixen un augment de l'expressió de CtsB, específicament en les CEH, durant la fibrogènesi.

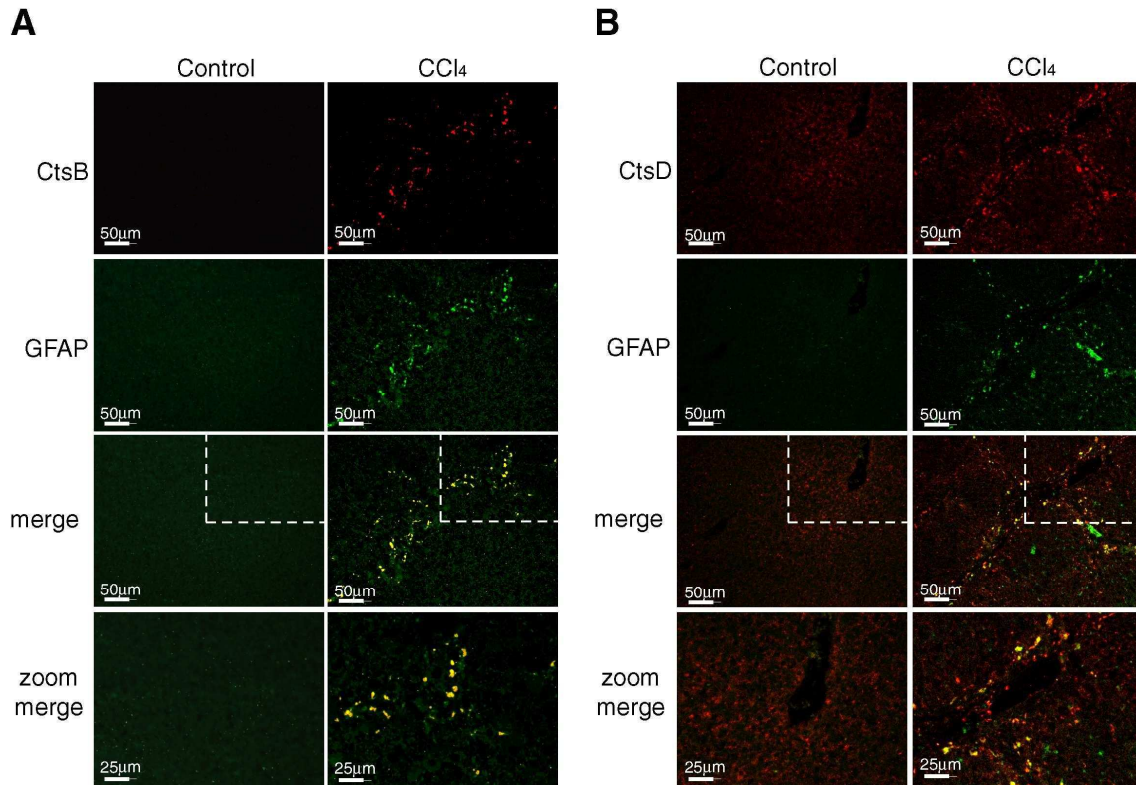


Figura 27: Imatges d'immunofluorescència de la CtsB (vermell) (A) o de la CtsD (vermell) (B) amb GFAP (verd) en talls histològics de fetges de ratolins control i tractats amb CCl₄ durant 6 setmanes. Els últims panells de (A) i (B) mostren una magnificació de la secció dreta superior que s'indica amb una línia discontinua. L'escala és de 50 μm en totes les imatges, excepte les inferiors que és de 25 μm.

De forma paral·lela, es va comparar l'activitat de la CtsB i la CtsD en fetges control i tractats amb CCl₄ respecte CEH cultivades durant 2 o 10 dies. Mentre que l'activitat de la CtsD va ser similar en fetges de ratolins control, en fetges tractats amb CCl₄ i en CEH de 10 dies, l'activitat de la CtsB va ser significativament inferior en fetge, independentment del tractament amb CCl₄, comparada amb la de CEH cultivades 10 dies (Figura 28A). Es van obtenir resultats similars al analitzar els nivells de proteïna tant de CtsB com de CtsD de les mostres (Figura 28B), confirmant així les observacions obtingudes amb la immunohistoquímica (Figura 27A i B).

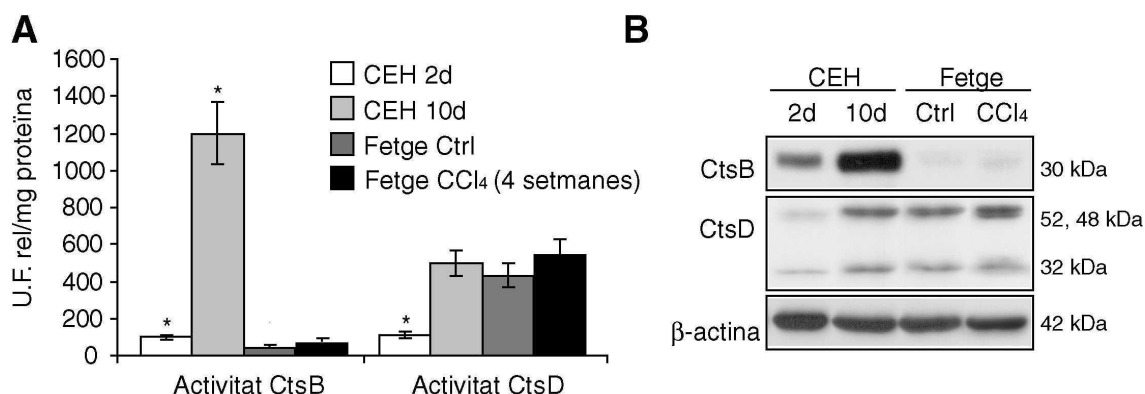


Figura 28: (A) Activitat de la CtsB i la CtsD. (B) Expressió de proteïna en CEH de 2 i 10 dies i fetges control i tractats amb CCl₄ durant 6 setmanes. Les dades són mitjanes ± D.E., *P ≤ 0.01 vs fetge control.

Aquests resultats indiquen que la CtsB i la CtsD s'expressen de forma diferent en CEH i hepatòcits durant la fibrosi induïda per CCl₄, i que l'augment de la CtsB en ratolins tractats amb CCl₄ es dona específicament en les CEH.

4.7. La inhibició de la CtsB atenua la fibrosi hepàtica induïda per CCl₄

Tenint en compte els resultats de l'apartat anterior, la següent pregunta a respondre va ser si la inhibició de la CtsB podria jugar un paper en la reversió de la fibrogènesi *in vivo* després de l'administració de CCl₄. Per tal d'assolir un basal de fibrosi abans de l'administració de l'inhibidor, es va estimular l'activació de les CEH dels ratolins administrant CCl₄ dos cops per setmana durant dues setmanes. Seguidament, se'ls va administrar CCl₄ i vehicle o Ca074-Me durant 4 setmanes més (Figura 29).

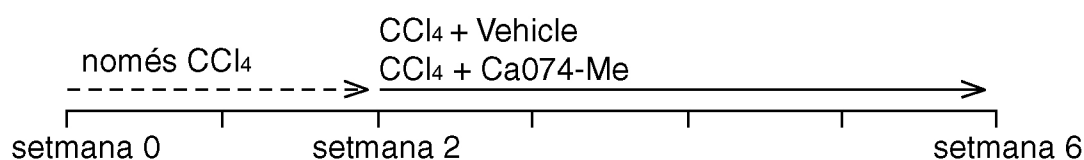


Figura 29: Representació del model experimental per a l'administració del CCl₄ i el Ca074-Me en ratolins.

La inhibició de la CtsB *per se* no va afectar els paràmetres estudiats en els animals control. Els nivells d'alanina aminotransferasa (ALT), que són un reflex del dany hepàtic, van augmentar en sèrum en els animals tractats amb CCl₄ comparats amb els tractats amb oli. La inhibició de la CtsB amb el Ca074-Me no va alterar significativament els nivells d'ALT (Figura 30A), la qual cosa indica que l'inhibidor no té un efecte significatiu prevenint el dany hepatocel·lular.

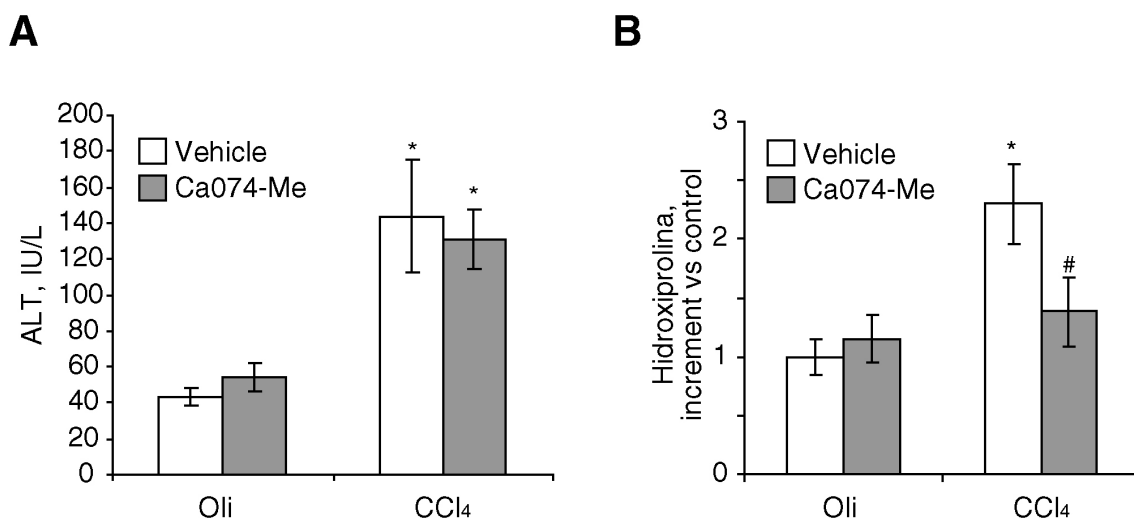


Figura 30: (A) Nivells d'alanina aminotransferasa en sèrum. (B) Nivells d'hidroxirolina per mg de proteïna d'homogenat de fetge. Les dades són mitjanes ± D.E., *P ≤ 0.01 vs animals tractats amb oli, #P ≤ 0.05 vs animals tractats amb CCl₄ i vehicle.

Les tincions hematoxilina i eosina en les seccions de fetge van revelar una acumulació de matriu extracel·lular i una dilatació dels sinusoides en els animals tractats amb CCl₄ (Figura 31A). Tot i així, els animals tractats simultàniament amb el Ca074-Me i CCl₄, presentaven una millor preservació del parènquima hepàtic i una disminució de l'acumulació de fibra. Al analitzar l'activitat del citocrom P450 2E1 als microsomes, es va veure que l'activitat dins del grup d'animals tractats amb CCl₄ era comparable, haguessin estat tractats o no amb el Ca074-Me (Figura 32). Així doncs, l'efecte terapèutic causat per l'inhibidor de la CtsB en els ratolins tractats amb CCl₄ no es podia atribuir ni a un metabolisme defectuós del CCl₄ a causa del Ca074-Me, ni a una protecció dels hepatòcits (Figura 30A).

La determinació de contingut hepàtic d'hidroxirolina va mostrar una disminució significativa de l'acumulació de col·lagen en els animals tractats amb CCl₄ que havien rebut el Ca074-Me, comparats amb els animals que només havien rebut el CCl₄ (Figura 30B).

Aquest resultat es va confirmar amb la tinció Sirius red que va mostrar un augment de la detecció de fibres de col·lagen en els animals tractats només amb CCl_4 respecte els tractats amb el CCl_4 i el Ca074-Me (Figura 31B).

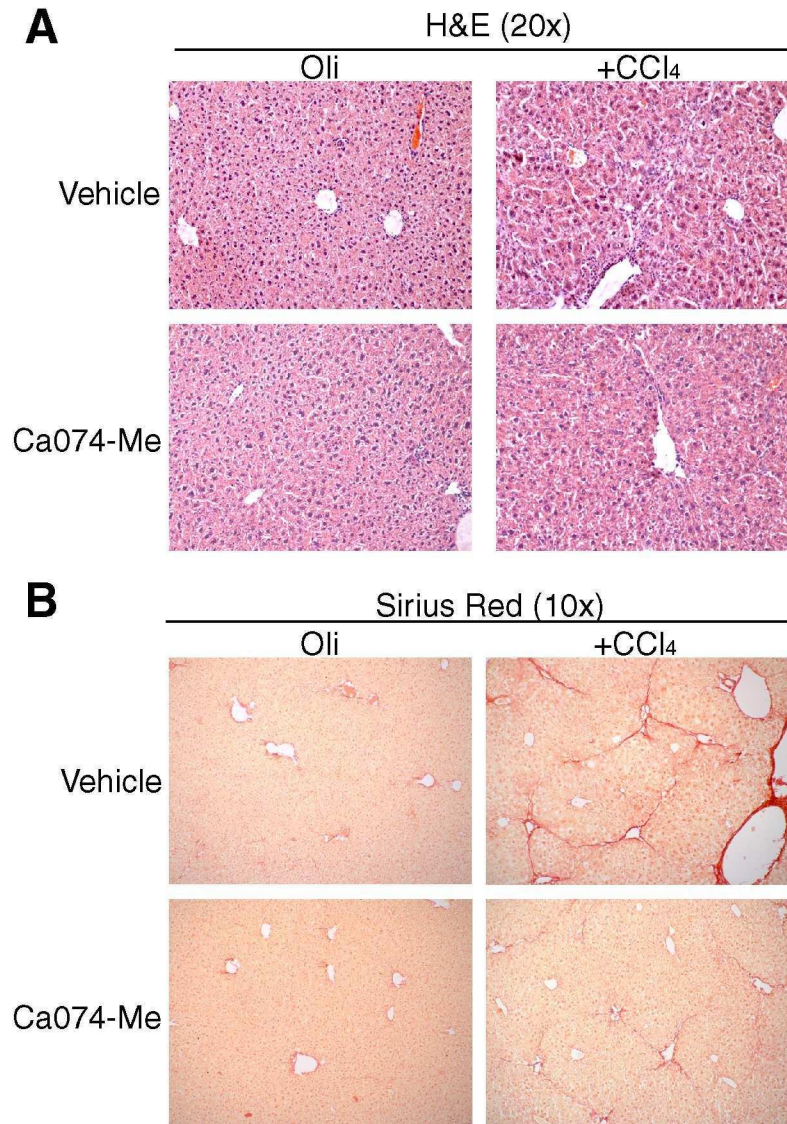


Figura 31: (A) Tinció hematoxilina i eosina sobre talls histològics de fetge. (B) Tinció Sirius red sobre talls histològics de fetge.

A més, la inhibició de la CtsB en els animals tractats amb CCl_4 va resultar en una disminució de les cèl·lules α -SMA positives en seccions hepàtiques (Figura 33). Aquesta disminució es va veure acompanyada per una infiltració de neutròfils quasi insignificant, determinada per immunohistoquímica de cèl·lules mieloperoxidasa (MPO) positives (Figura 33).

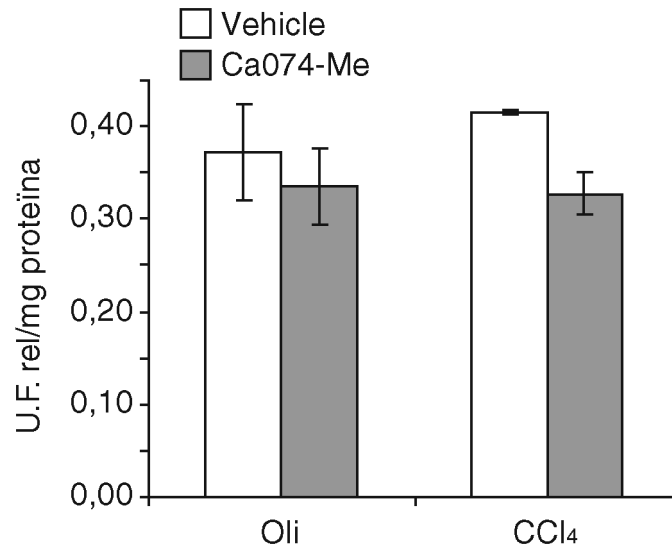


Figura 32: Activitat del citocrom P450 2E1 de microsomes d'animals tractats amb i sense CCl₄ i/o Ca074-Me. Les dades són mitjanes ± D.E.

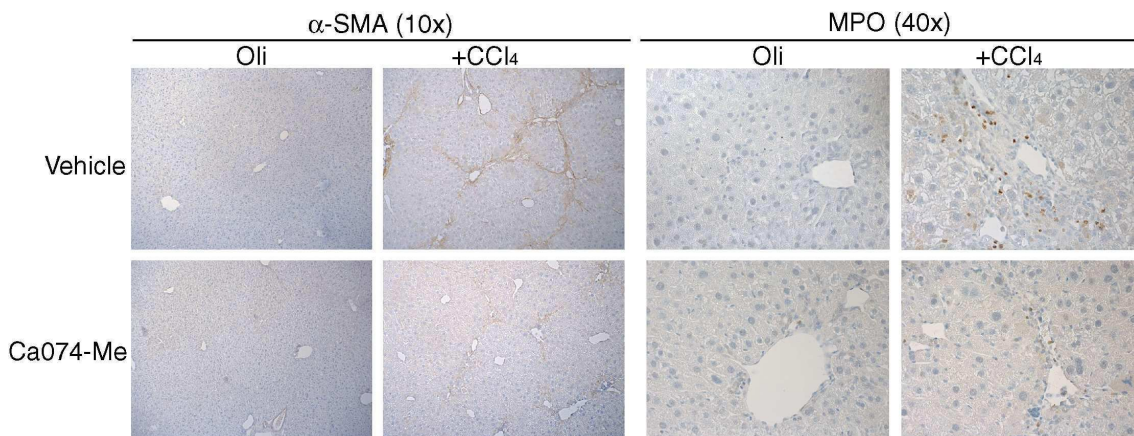


Figura 33: Detecció per immunohistoquímica d' α -SMA i mieloperoxidasa (MPO) en diferents grups experimentals de ratolins.

El conjunt de resultats d'aquest apartat indiquen que mentre que la funció que la CtsB juga en el dany hepatocel·lular induït per CCl₄ no és significativa, el paper que juga en la fibrogènesi hepàtica pot ser de gran rellevància.

Bloc II: Caracterització de la contribució de l'ASMasa al procés d'activació de les CEH en relació amb les catepsines B i D

4.8. L'ASMasa augmenta la seva expressió durant el procés d'activació de les CEH

Fins a aquest moment s'ha descrit la implicació de les catepsines B i D en el procés d'activació de les CEH i en el model de fibrosi per CCl₄. Degut a la relació prèviament descrita entre la CtsB, la CtsD i l'ASMasa [88], [114], [107], es va voler analitzar si l'ASMasa podia estar jugant un paper dins del procés d'activació de les CEH. En aquest sentit, CEH van ser cultivades en plàstic per tal d'estudiar la seva activació. Es van recollir les CEH des del dia 2 fins al dia 9 de cultiu i es va analitzar l'expressió de l'ASMasa i l'NSMasa. Degut a la falta de bons anticossos per a la detecció de l'ASMasa i l'NSMasa, es va determinar la seva expressió estudiant l'activitat d'ambdues proteïnes (Figura 34). Es va veure un augment de l'activitat de l'ASMasa al llarg del temps de cultiu que correlacionava amb l'augment de l'α-SMA, la CtsB i la CtsD detectat per *Western blot* (Figura 11A). Per contra, l'activitat de l'NSMasa es va mantenir constant al llarg del temps.

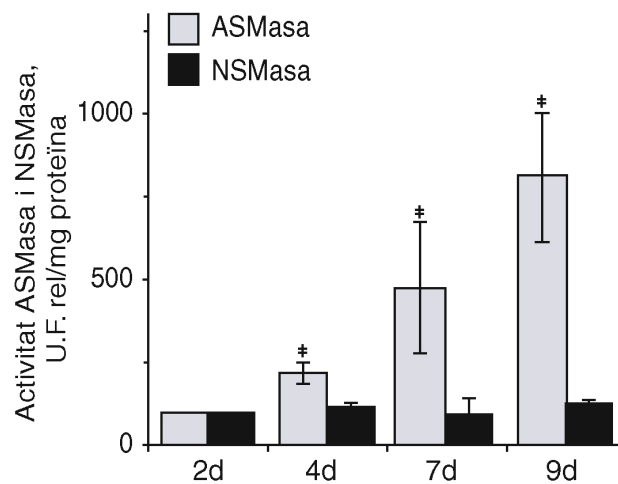


Figura 34: Activitat ASMasa i NSMasa al llarg del temps d'activació de les CEH. Les dades són mitjanes ± D.E. #P ≤ 0.05 vs 2d.

4.9. La inhibició farmacològica de l'ASMasa disminueix el potencial profibrogènic de les CEH

Ja que l'ASMasa augmentava durant l'activació de les CEH i correlacionava amb marcadors de transdiferenciació de les CEH com l'α-SMA (Figura 11A), es va voler analitzar l'efecte de la inhibició farmacològica de l'ASMasa en CEH en procés d'activació. Es va escollir la Imipramina, un fàrmac que s'utilitza com a antidepressiu, com a inhibidor

de l'ASMasa [193]. La Imipramina no actua inhibint directament l'ASMasa sinó que interactua amb el lloc d'unió de l'ASMasa, a les vesícules lipídiques [194]. Aquesta unió provoca un alliberament de l'enzim de la membrana i el seu trencament proteolític en el lisosoma. Així doncs, CEH de 5 dies van ser tractades amb Imipramina a dosi 25µM de 4 a 48 hores. La inhibició farmacològica de l'ASMasa durant 20 hores amb Imipramina a dosi 25µM va provocar una disminució de l'activitat de l'ASMasa del 86% (Figura 35A).

Ja que existia una relació prèviament descrita entre l'ASMasa, la CtsB [88] i la CtsD [114], [107] (veure l'apartat 1.3. de la Introducció), es va decidir analitzar l'expressió d'ambdues proteïnes en front a la inhibició de l'ASMasa. Aquesta inhibició va resultar en una disminució de l'expressió de CtsB, CtsD i α-SMA a diferents temps, amb un màxim a 24 hores (Figura 35B).

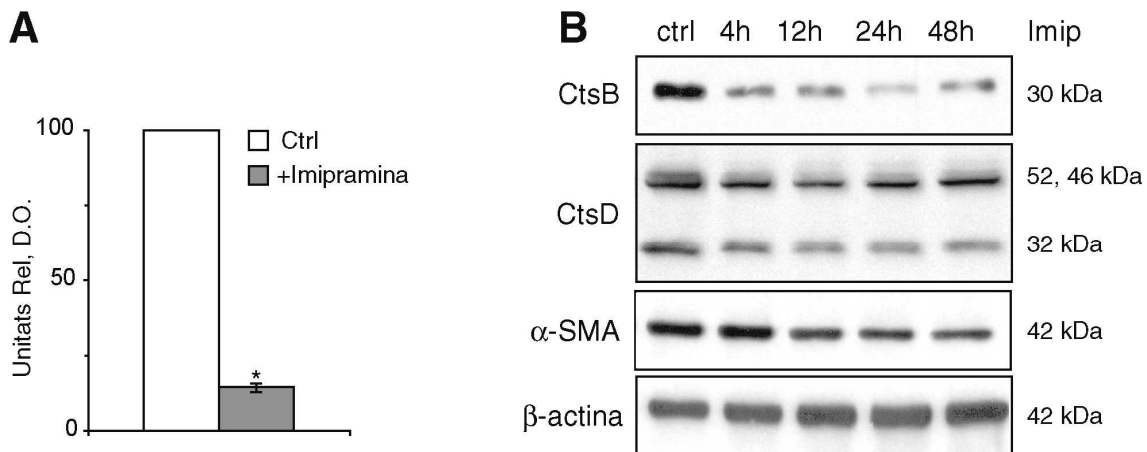


Figura 35: (A) Activitat ASMasa davant de la inhibició amb Imipramina a dosi 25µM durant 20 hores. Les dades són mitjanes ± D.E *P≤ 0.01 vs ctrl. (B) Expressió de CtsB, CtsD i α-SMA davant de la inhibició amb Imipramina a dosi 25µM a diferents temps.

Al analitzar l'expressió relativa de l'ARNm de l'α-SMA també es va observar una disminució al llarg del temps d'inhibició, amb un màxim a les 12 hores (Figura 36A). Segons aquests resultats, sembla que existeix una relació entre l'ASMasa i les catepsines B i D, ja que la inhibició farmacològica de l'ASMasa a través de la Imipramina resulta en una disminució d'ambdues catepsines (Figura 35B). A més, la inhibició de l'ASMasa disminueix el fenotip profibrogènic de les CEH, ja que es veu una disminució de l'α-SMA tant a nivell de proteïna com a nivell d'ARNm (Figura 35B i 36A).

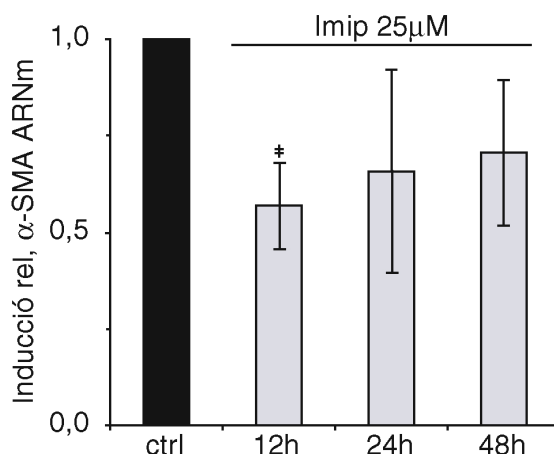


Figura 36: (A) Expressió relativa de l'ARNm de l' α -SMA davant de la inhibició de l'ASMasa amb Imipramina 25 μ M a diferents temps. Les dades són mitjanes \pm D.E., #P \leq 0.05 vs ctrl.

4.10. El silenciament de l'ASMasa disminueix la CtsB i la CtsD de forma selectiva

Degut a que la Imipramina actua alliberant l'ASMasa del seu ancoratge a la membrana lisosomal, es podria pensar que l'efecte observat sobre la CtsB i la CtsD es podria donar a causa d'una desestabilització del lisosoma. Per tal de confirmar l'efecte de la inhibició de l'ASMasa sobre l'expressió de la CtsB, la CtsD i l' α -SMA es va fer una aproximació més específica de la inhibició de l'ASMasa utilitzant ARNi.

Es van cultivar CEH durant 5 dies i es van transfectar amb ARNi de l'ASMasa. Es va aconseguir una disminució de l'ARNm de l'ASMasa del 50% respecte les CEH transfectades amb l'ARNi control (Figura 37A). La transfecció amb ARNi de l'ASMasa no va afectar de forma significativa els nivells d'ARNm de la CtsB ni de la CtsD (Figura 37A). Al analitzar l'expressió de la CtsB i la CtsD per *Western blot*, es va veure una disminució de la forma activa de la CtsB (30KDa) i de les proformes (52, 46KDa) i la forma madura (32KDa) de la CtsD (Figura 37B i 38), en resposta al silenciament de l'ASMasa amb ARNi. Paral·lelament, i per tal de veure que la transfecció no afectava de forma inespecífica a les catepsines, es va analitzar en aquestes mostres una proteïna mitocondrial com la MnSOD₂ (Figura 37B i 38). La transfecció no va afectar els nivells de l'esmentada proteïna, i per tant l'efecte que s'observava a causa del silenciament de l'ASMasa sobre la CtsB i la CtsD era específic. A més, al analitzar l'ARNm de l' α -SMA es va veure disminució significativa en resposta a la transfecció amb ARNi de l'ASMasa (Figura 39).

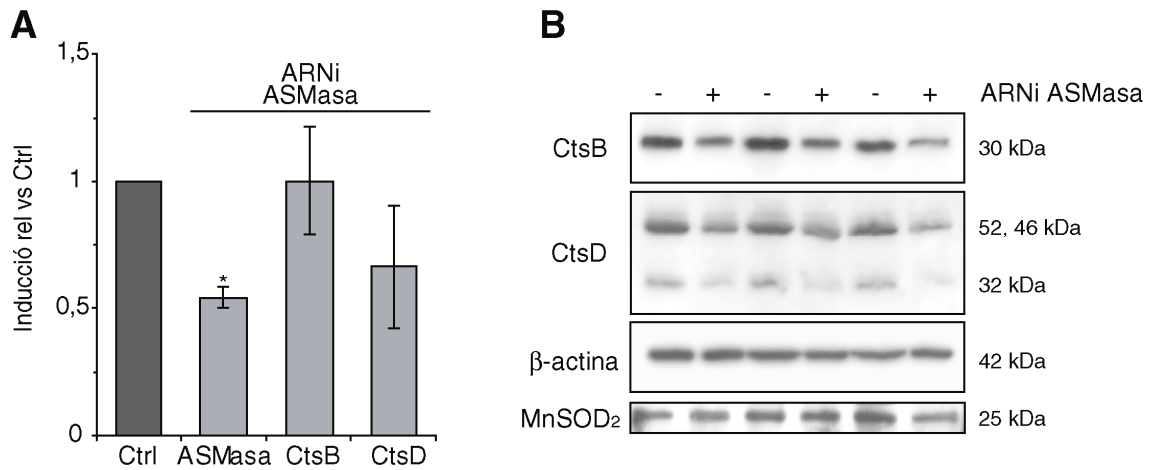


Figura 37: (A) Expressió relativa de l'ARNm de l'ASMasa, la CtsB i la CtsD davant de la transfecció amb ARNi de l'ASMasa. (B) Expressió de la CtsB, la CtsD i la MnSOD₂ en resposta al silenciament de l'ASMasa en CEH de 5 dies. Les dades són mitjanes \pm D.E., *P \leq 0.01 vs Ctrl.

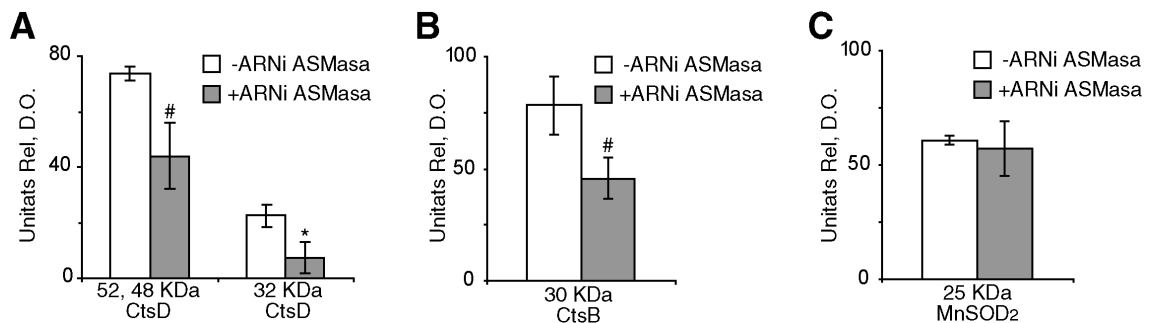


Figura 38: Quantificació del *Western blot* de la Figura 37B. (A) CtsD proforma (52, 46KDa) i forma activa (32KDa). (B) CtsB forma activa (30KDa). (C) MnSOD₂. Les dades són mitjanes \pm D.E., *P \leq 0.01, #P \leq 0.05 vs ARNi Ctrl.

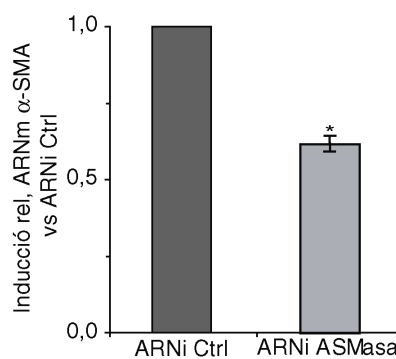


Figura 39: Expressió relativa de l'ARNm de l'α-SMA davant de la transfecció amb ARNi de l'ASMasa. Les dades són mitjanes \pm D.E., *P \leq 0.01 vs ARNi Ctrl.

Tenint en compte els resultats d'aquest apartat podem dir que tant el silenciament com la inhibició farmacològica de l'ASMasa provoquen una disminució de la CtsB i la CtsD a nivell de proteïna i una disminució de l'α-SMA a nivell d'ARNm.

4.11. La inhibició farmacològica de l'ASMas disminueix la capacitat proliferativa de les CEH activades via Fosfoinositol 3 Cinasa/AKT

Com ja s'ha mostrat en els apartats previs, tant la inhibició farmacològica (Figura 35B) com a través de ARNi (Figura 37B) de l'ASMas provoca una disminució de l'expressió de la CtsB. Això podria suggerir una possible cascada de senyalització on l'ASMas podria trobar-se per sobre de la CtsB. Aquesta possible ruta podria també incloure la senyalització a través de la Fosfoinositol 3 cinasa (PI3K)/AKT, ja que com hem descrit anteriorment la inhibició de la CtsB mitjançant Ca074-Me provoca una modulació de la via PI3K/AKT al disminuir la fosforilació d'AKT induïda per PDGF BB (Figura 25A). Així doncs, el següent objectiu va ser analitzar si la inhibició de l'ASMas amb Imipramina podia estar afectant la proliferació cel·lular i la senyalització per PDGF BB.

Amb aquest objectiu, es va quantificar la capacitat proliferativa de les CEH al llarg del temps d'activació enfront a la inhibició de la CtsB i l'ASMas amb Ca074-Me i Imipramina, respectivament. Es van tractar CEH de 2 dies amb Ca074-Me o Imipramina i es va seguir la seva proliferació per incorporació de timidina ³H. La taxa de proliferació de les CEH de 7 a 8 dies es va veure disminuïda un 90% amb l'inhibidor de la CtsB (Ca074-Me) i un 60% amb l'inhibidor de l'ASMas (Imipramina) respecte la de les cèl·lules control del mateix dia (Figura 40).

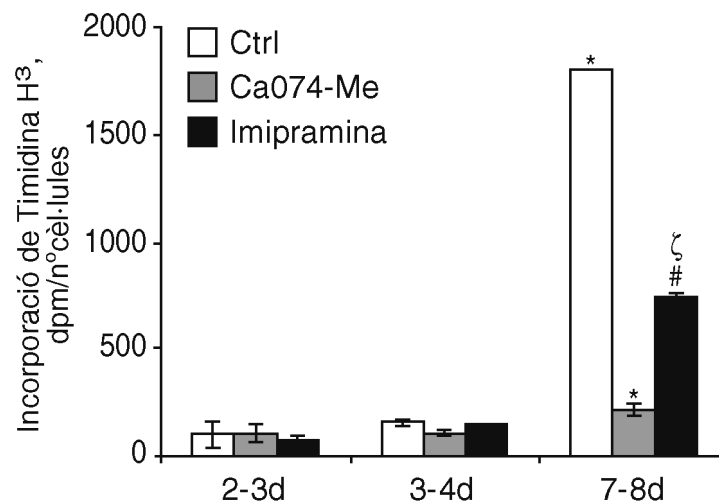


Figura 40: Proliferació de les CEH al llarg del temps tractades amb o sense Ca074-Me 10µM o Imipramina 25 µM. Dades d'incorporació de timidina ³H durant 24 hores d'un experiment representatiu ± D.E. vs Ctrl 2-3d. En Ctrl 7-8d *P≤ 0.01 vs Ctrl 2-3d, en Ca074-Me 7-8d i Imipramina 7-8d *P≤ 0.01 i #P≤ 0.05 vs Ctrl 7-8d respectivament, en Imipramina 7-8d ζP≤ 0.05 vs Ca074-Me 7-8d.

Per altra banda, es va voler analitzar el paper que la inhibició de l'ASMas, i en conseqüència de la CtsB, tenia sobre la senyalització a través de PDGF BB. Per tal d'aconseguir una bona inhibició de la CtsB, i tenint en compte la Figura 35B, CEH de 5 dies van ser tractades amb Imipramina a dosi 25µM durant 6 hores. Després de les 6 hores d'inhibició es va administrar PDGF BB a dosi 10ng/mL o 20ng/mL durant 15 minuts i es va analitzar la fosforilació d'AKT. PDGF BB produïa una ràpida fosforilació d'AKT en les CEH activades. Malgrat això i de la mateixa manera que ja s'havia mostrat prèviament al inhibir la CtsB davant de l'estimulació amb PDGF (Figura 25A), al tractar-les amb l'inhibidor de l'ASMas aquesta fosforilació es veia significativament disminuïda (Figura 41A).

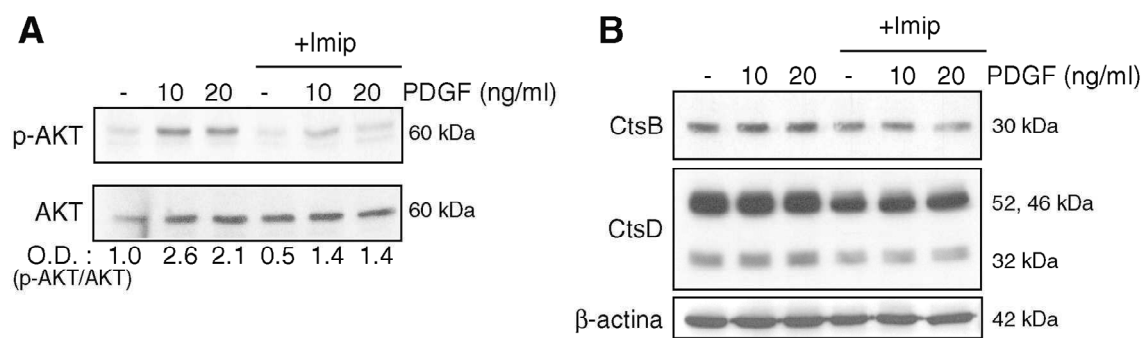


Figura 41: (A) Efecte de la inhibició de l'ASMas amb Imipramina (25µM, 6 hores) sobre la fosforilació d'AKT o (B) sobre l'expressió de la CtsB i la CtsD després de l'estímul amb PDGF BB durant 15 minuts.

Com ja havíem observat prèviament (Figura 35B), la inhibició de l'ASMas amb Imipramina va provocar una disminució de l'expressió de la forma madura de la CtsB (30KDa), i de la proforma (52, 46 KDa) i la forma madura (32 KDa) de la CtsD (Figura 41B).

A la llum dels resultats d'aquest apartat, sembla que la inhibició de l'ASMas o de la CtsB mitjançant la Imipramina o Ca074-Me respectivament resulta en una disminució significativa de la proliferació cel·lular de les CEH activades. Aquesta disminució podria estar en part provocada per una disminució de la fosforilació d'AKT induïda per PDGF BB.

4.12. Les CEH procedents de ratolins deficients en *ASMasa* presenten un fenotip més profibrogènic

Tenint en compte les observacions prèvies en CEH salvatges, es va voler estudiar el fenotip d'activació de les CEH procedents de ratolins deficients en *ASMasa* (*ASMasa*^{-/-}) respecte el de CEH procedents de ratolins salvatges (*ASMasa*^{+/+}). Es van aïllar CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{-/-} i ratolins *ASMasa*^{+/+} i es van cultivar en plàstic per tal d'estudiar el seu procés d'activació al llarg del temps.

Es van escollir tres gens representatius del procés d'activació de les CEH: α -SMA, TGF β i Col·lagen 1A1 (*Col1A1*) i es va analitzar l'expressió relativa del seus ARNm al llarg del temps d'activació de les CEH. Es va veure que l'expressió dels tres gens candidats augmentava al llarg del procés d'activació tant en CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{+/+}, com de ratolins *ASMasa*^{-/-}. A més, es va veure que a cada temps analitzat, l'expressió relativa d'aquests gens era sempre superior en les CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{-/-} respecte les CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{+/+} (Figura 42).

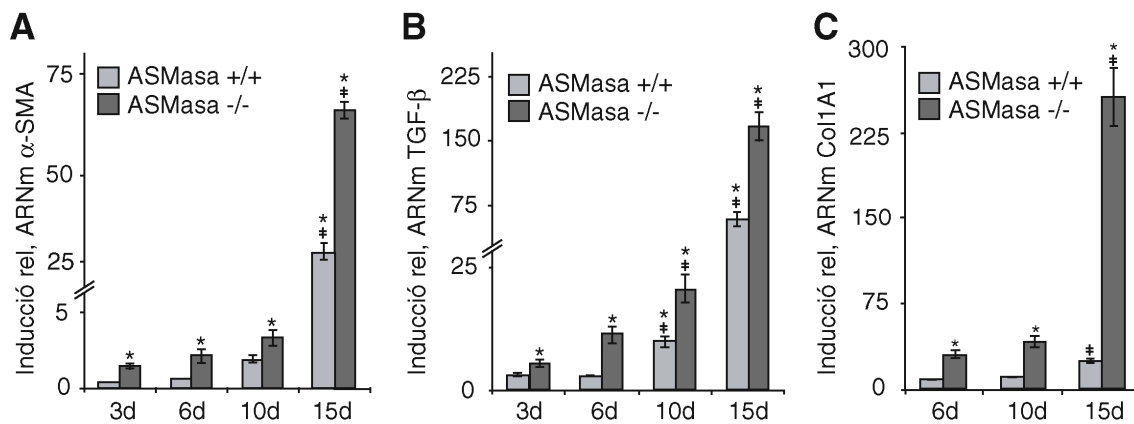


Figura 42: Expressió relativa de l'ARNm de diferents gens marcadors de fibrosi al llarg del temps d'activació de CEH procedents de ratolins salvatges (*ASMasa*^{+/+}) i ratolins deficients en *ASMasa* (*ASMasa*^{-/-}). (A) Expressió relativa d' α -SMA. (B) Expressió relativa de TGF β . (C) Expressió relativa de *Col1A1*. Les dades són mitjanes \pm D.E., *P \leq 0.01 vs *ASMasa*^{+/+}, #P \leq 0.01 vs 3d o 6d en el cas de *Col1A1*.

Així doncs i a diferència del que hauríem esperat en vista dels resultats previs, les CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{-/-} tenen un fenotip més profibrogènic que les CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{+/+}.

Tenint en compte els resultats previs respecte a l'expressió de la CtsB i la CtsD en ratolins salvatges (Figura 11A) i la seva disminució davant la inhibició de l'ASMasa tant farmacològica (Figura 35B) com per ARNi (Figura 37B), es va voler analitzar l'expressió d'aquestes proteïnes en ratolins *ASMasa*^{-/-} respecte ratolins *ASMasa*^{+/+}.

Es van aïllar CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{+/+} i *ASMasa*^{-/-} i es van cultivar en plàstic al llarg del temps. Es va analitzar l'expressió de CtsB, CtsD a 2, 4, 7, 11 dies. L'expressió tant de la CtsB com de la CtsD es va veure augmentada al llarg del temps de cultiu amb un màxim a dia 11. La CtsB i la CtsD van augmentar de forma paral·lela a l' α -SMA, marcador del procés d'activació (Figura 43A). De la mateixa manera que succeïa amb els gens marcadors de fibrosi (Figura 42), es va observar un augment superior a tots els temps de la CtsB, la CtsD i l' α -SMA en CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{-/-} respecte CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{+/+} (Figura 43A). També es va analitzar l'activitat de la CtsB i es va veure que la CtsB detectada per *Western blot* era activa i que aquesta activitat correlacionava amb la senyal detectada a la Figura 43A (Figura 43B).

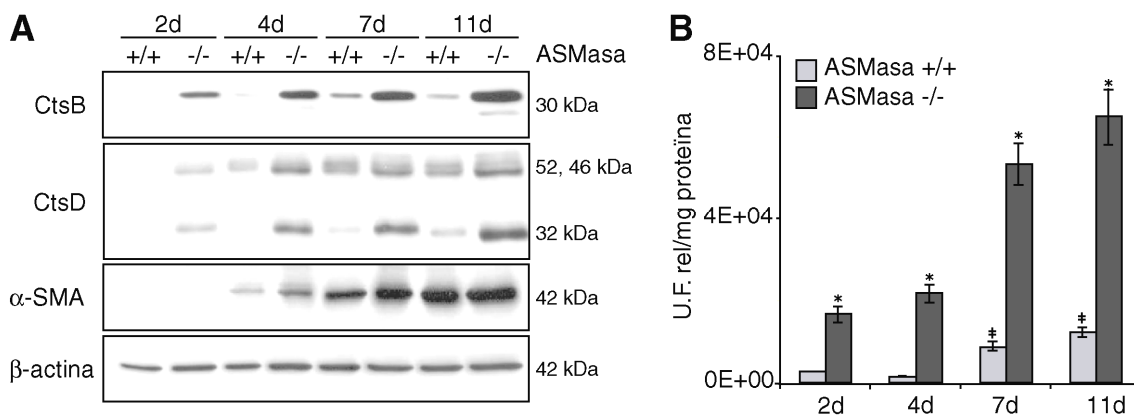


Figura 43: (A) Expressió de la CtsB, la CtsD i l' α -SMA al llarg del temps d'activació en CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{+/+} i ratolins *ASMasa*^{-/-}. (B) Activitat CtsB en les CEH. Les dades són mitjanes D.E., *P \leq 0.01 vs *ASMasa*^{+/+}, #P \leq 0.01 vs 2d.

Per tant, les CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{-/-} tenen un potencial més profibrogènic, ja que mostren marcadors clàssics de fibrosi com l' α -SMA, el TGF β , i el Col1A1 més augmentats a tots els temps estudiats al llarg del període d'activació de les cèl·lules. A més, les CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{-/-} expressen més CtsB, CtsD i α -SMA en comparació amb les CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{+/+}.

4.13. La inhibició de la CtsB en CEH procedents de ratolins deficients en ASMasa disminueix el seu potencial fibrogènic

En l'apartat anterior es mostra com les CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{-/-} presenten un potencial profibrogènic superior en comparació a les CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{+/+}. Malgrat això, caldria haver esperat el contrari, ja que s'ha mostrat com la inhibició de l'ASMasa tant farmacològica (Figura 35B) com a través de ARNi (Figura 37B) disminueix la CtsB, la CtsD, l' α -SMA i la proliferació cel·lular possiblement via PI3K/AKT (Figura 40 i 41A). Així doncs, una absència total d'ASMasa com la que mostren aquests ratolins hauria de significar una disminució del potencial profibrogènic d'aquestes cèl·lules. El fet que la CtsB i la CtsD es trobin augmentades de forma tant significativa, expressant-se ja a dia 2 (Figura 43A), en les CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{-/-} podria fer pensar en un mecanisme de compensació entre l'ASMasa i les catepsines en els animals *ASMasa*^{-/-}.

Per tal de comprovar la hipòtesi, CEH de 5 dies procedents de ratolins *ASMasa*^{+/+} i *ASMasa*^{-/-} van ser tractades durant 48 hores amb Ca074-Me a dosi 10 μ M i es va analitzar l'expressió d' α -SMA com a marcador de fibrosi. El tractament amb l'inhibidor de la CtsB va provocar una disminució de l'expressió d' α -SMA tant en ratolins *ASMasa*^{+/+} com en ratolins *ASMasa*^{-/-} (Figura 44A). Per altra banda, es va voler analitzar la taxa de proliferació de les CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{-/-} respecte la de ratolins *ASMasa*^{+/+} i el seu comportament davant de la inhibició de la CtsB.

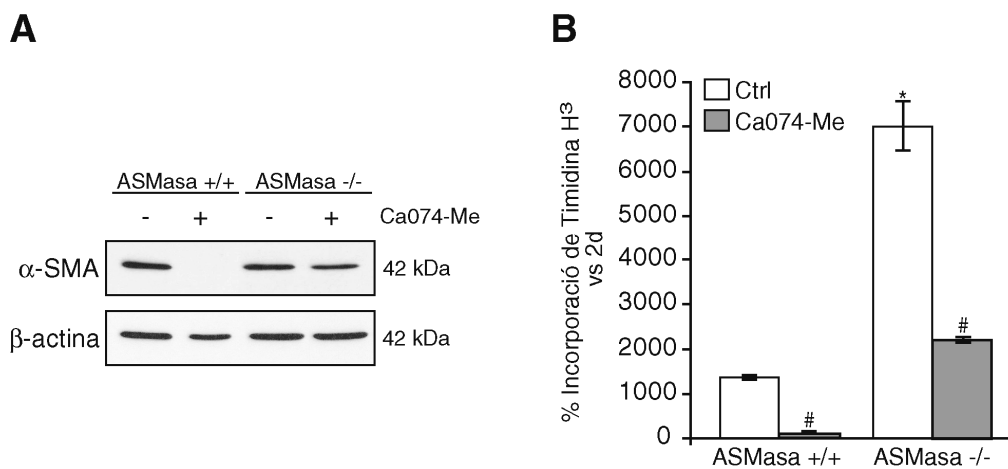


Figura 44: (A) Expressió de l' α -SMA en CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{+/+} i ratolins *ASMasa*^{-/-} amb i sense Ca074-Me. (B) Taxa de proliferació en CEH a dia 5 vs dia 2. Dades d'un experiment representatiu \pm D.E., *P \leq 0.01 vs *ASMasa*^{+/+}, #P \leq 0.01 vs Ctrl.

Les CEH procedents de ratolins $ASMasa^{-/-}$ tenien una taxa de proliferació 500 vegades superior a la de ratolins $ASMasa^{+/+}$, la qual cosa confirmaria el fenotip més profibrogènic. Tot i aquesta gran capacitat proliferativa, la inhibició de la CtsB, amb l'inhibidor Ca074-Me, provocava una disminució significativa de la proliferació cel·lular tant de les CEH procedents de ratolins $ASMasa^{+/+}$ com de les de ratolins $ASMasa^{-/-}$ (Figura 44B).

Els resultats d'aquest apartat mostren com el fenotip més profibrogènic de les CEH procedents de ratolins $ASMasa^{-/-}$ estaria causat en part per la CtsB, ja que la seva inhibició reverteix característiques significatives del fenotip.

4.14. Els ratolins deficients en $ASMasa$ presenten més fibrosi davant del tractament amb CCl_4

Per tal de confirmar aquest aparent potencial més profibrogènic de les CEH procedents de ratolins $ASMasa^{-/-}$, es va voler sotmetre a ratolins $ASMasa^{-/-}$ al model de fibrosi hepàtica per CCl_4 . Ratolins $ASMasa^{-/-}$ i $ASMasa^{+/+}$ van ser tractats durant 4 setmanes dos cops per setmana amb CCl_4 a dosi $0.5\mu\text{l/g}$ de ratolí. Com a vehicle es va utilitzar l'oli de blat de moro.

El dany hepàtic es va avaluar quantificant els nivells d'ALT en sèrum. No es va observar un dany hepàtic significatiu provocat pel CCl_4 ni en ratolins $ASMasa^{+/+}$ ni en ratolins $ASMasa^{-/-}$ (Figura 45A). També es va analitzar l'activitat de la CtsB en homogenats de fetge i es va veure un augment significatiu de l'activitat CtsB en els animals tractats amb CCl_4 respecte els seus controls. Dins el grup d'animals tractats amb CCl_4 es va observar un augment significatiu en els animals $ASMasa^{-/-}$ respecte els animals $ASMasa^{+/+}$. Cal destacar que els animals $ASMasa^{-/-}$ tractats amb el vehicle ja presentaven un augment significatiu de l'activitat CstB respecte els animals $ASMasa^{+/+}$.

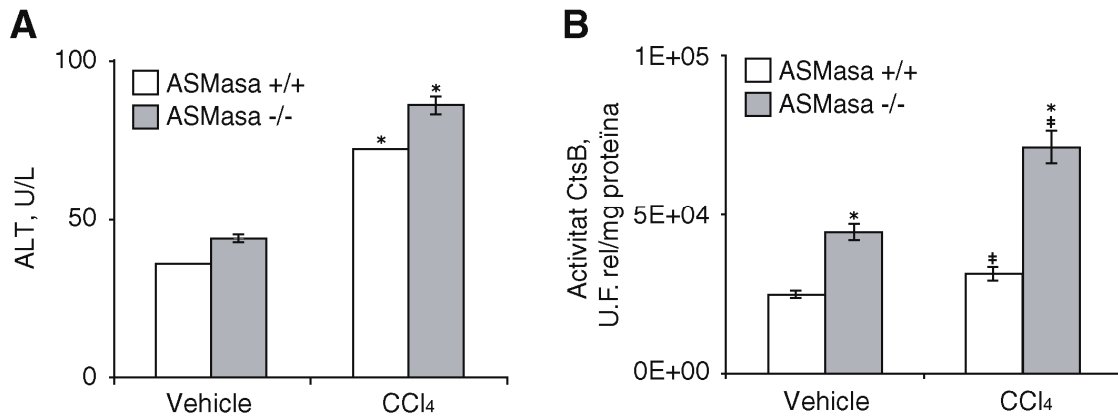


Figura 45: (A) Nivells d'alanina aminotransferasa en sèrum. Les dades són mitjanes \pm D.E., * $P \leq 0.01$ vs animals tractats amb vehicle. (B) Activitat CtsB en homogenats de fetge. Les dades són mitjanes \pm D.E., # $P \leq 0.05$ vs animals tractats amb vehicle, * $P \leq 0.01$ vs animals ASMasa^{+/+}.

Posteriorment, es van voler verificar les dades obtingudes sobre l'activitat de la CtsB i es va analitzar l'expressió per *Western blot* de la CtsB, la CtsD i l' α -SMA. Es va veure un augment de la CtsB i la CtsD davant del tractament amb CCl₄, sent aquest augment major en els animals ASMasa^{-/-} respecte els animals ASMasa^{+/+} (Figura 46A). A més, aquest augment correlacionava amb l'expressió de l' α -SMA com a marcador de fibrosi, veient-se també un augment superior en els animals ASMasa^{-/-} respecte els animals ASMasa^{+/+} (Figura 46A).

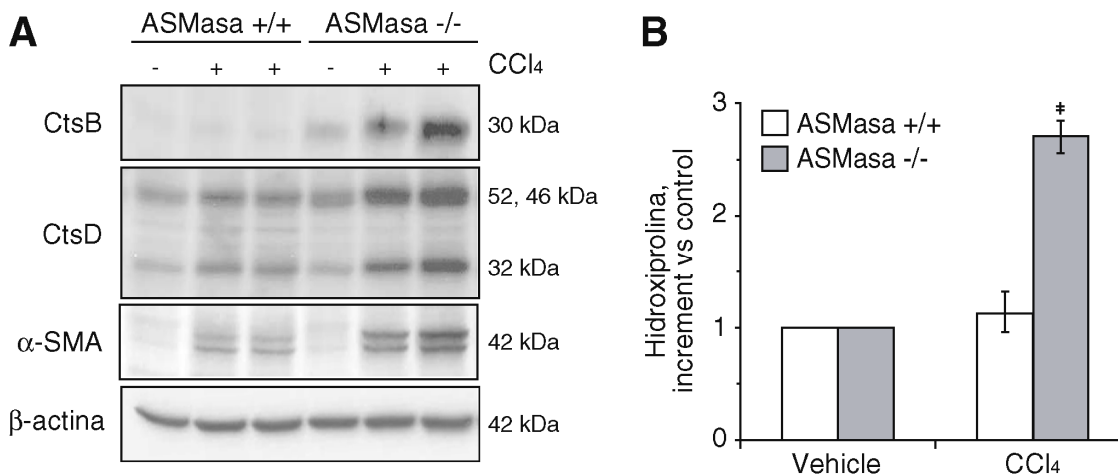


Figura 46: (A) Expressió de CtsB, CtsD i α -SMA en lisat total de fetge. (B) Nivells d'hidroxirolina per mg de proteïna d'homogenat de fetge. Les dades són mitjanes \pm D.E., # $P \leq 0.05$ vs animals tractats amb vehicle.

Al analitzar el contingut d'hidroxiprolina dels fetges es va veure que només els animals $ASMasa^{-/-}$ tractats amb CCl_4 mostraven uns nivells significativament elevats respecte el seus controls (Figura 46B). Aquestes observacions es van confirmar histològicament mitjançant la tinció Sirius red. Tot i que es va veure acumulació de fibra, tenyida en vermell, en ambdós tipus de ratolins tractats amb CCl_4 , l'acumulació de fibra va ser superior en els animals $ASMasa^{-/-}$ (Figura 47B). És important tenir en compte el fet que tant els animals $ASMasa^{+/+}$ com $ASMasa^{-/-}$ tractats amb el vehicle mostraven un aspecte normal.

Les tincions hematoxilina i eosina van revelar també un aspecte normal dels fetges dels animals tractats amb el vehicle. Per altra banda, mentre que els animals $ASMasa^{+/+}$ tractats amb CCl_4 mostraven un aspecte pràcticament normal, els $ASMasa^{-/-}$ presentaven un parènquima amb acumulació de cèl·lules escumoses envoltades de fibra i una dilatació major dels sinusoides (Figura 47A). Les cèl·lules escumoses eren visibles també en la tinció Sirius red (Figura 47B). L'aparició d'aquestes estructures només es va observar en els animals $ASMasa^{-/-}$ tractats amb CCl_4 , però no en els tractats amb el vehicle. La generació de cèl·lules escumoses en els animals deficients en $ASMasa$ ja s'havia descrit prèviament. Es creu que les cèl·lules de Kupffer degeneren a causa de la gran acumulació d'esfingomielinina que es dona en el seu interior, generant-se així les cèl·lules escumoses [195].

Es va analitzar per immunohistoquímica les cèl·lules positives per α -SMA, marcador de CEH activades, i per mieloperoxidasa (MPO), marcador d'infiltració de neutròfils. Es va veure un marcatge de cèl·lules α -SMA positives en tots els animals sotmesos al tractament amb CCl_4 . Malgrat això, el marcatge va ser molt més intens en els animals $ASMasa^{-/-}$ tractats amb CCl_4 respecte els animals salvatges (Figura 48). De forma similar, en els animals $ASMasa^{+/+}$ tractats amb CCl_4 pràcticament no es va detectar infiltració de neutròfils, detectada pel marcatge MPO. Mentre que les immunohistoquímiques dels fetges dels animals $ASMasa^{-/-}$ tractats amb CCl_4 van revelar una infiltració molt acusada (Figura 48).

Tenint en compte els resultats d'aquest apartat, podem concloure que els ratolins deficients en $ASMasa$ són més sensibles a la fibrosi induïda per CCl_4 probablement per un augment de l'expressió de les catepsines B i D.

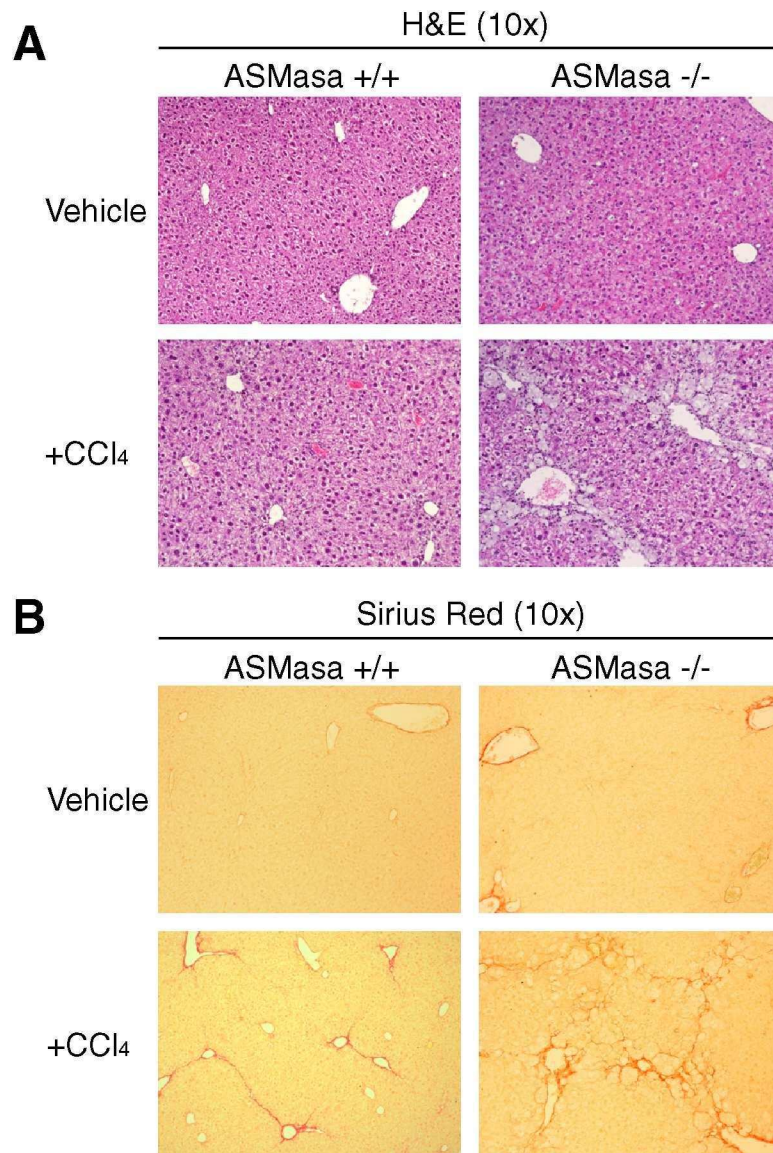


Figura 47: (A) Tinció hematoxilina i eosina sobre talls histològics de fetge. (B) Tinció Sirius red sobre talls histològics de fetge.

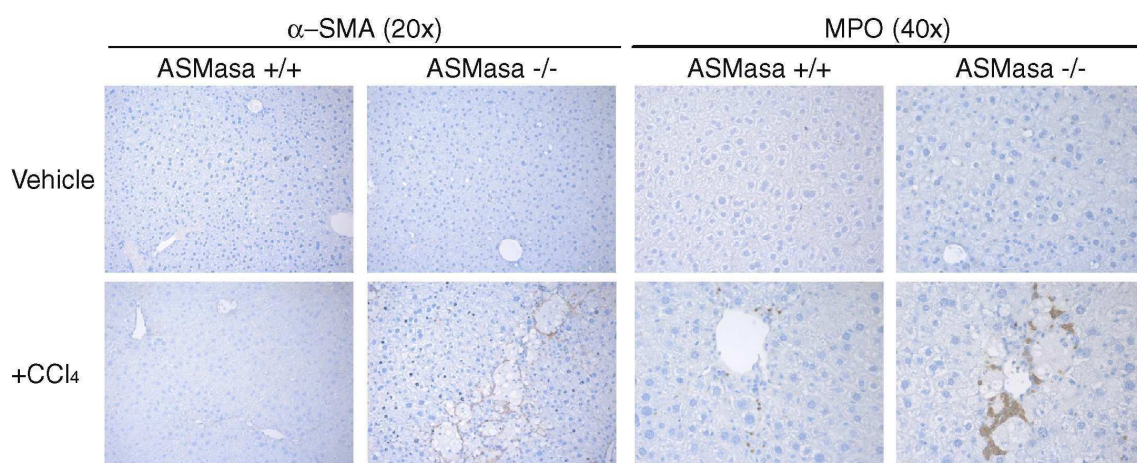


Figura 48: Detecció per immunohistoquímica d' α -SMA i mieloperoxidasa (MPO) en diferents grups experimentals de ratolins.

◦ ◦ ● 5. Discussió

Tot i el progrés dels últims anys en la comprensió de la biologia de les CEH, els mecanismes d'activació i transdiferenciació d'aquestes cèl·lules encara no es coneixen totalment, la qual cosa limita la possibilitat d'un tractament específic de la fibrosi hepàtica. En aquest sentit, la present tesi contribueix de manera significativa a un major enteniment d'aquests processos, proposant un nou paper de l'ASMa en la fibrosi hepàtica, al regular l'activació de les CEH a través de les catepsines.

Les catepsines són proteases lisosomals que s'han vist implicades en processos com el càncer [196], la metastasi [197] i la mort cel·lular [64], [198]. En concret al fetge han estat relacionades amb patologies com el càncer hepàtic o hepatocarcinoma [84], [101], [85], [81], les malalties de fetge gras no alcohòliques [199], [91] i la fibrosi hepàtica [161], [97], [163]. Tot i la rellevància que les catepsines poden tenir en el procés d'activació de les CEH i la fibrogènesi, el seu paper no s'ha estudiat en profunditat. Per aquesta raó, aquest ha estat un dels objectius d'aquesta tesi.

Com mostren els resultats, l'expressió de les catepsines B i D augmenta al llarg del temps d'activació de les CEH primàries de ratolí cultivades en plàstic. Aquest augment correlaciona amb l' α -SMA, marcador del procés de transdiferenciació de les CEH. Al estudiar *in vitro* la inhibició farmacològica o amb ARNi de la CtsB i/o la CtsD hem observat una afectació de la proliferació cel·lular i la migració en CEH activades. Ambdós tipus d'inhibició disminueixen l'expressió de marcadors clàssics de fibrosi com l' α -SMA i el TGF β . A més, es dona una disminució de la taxa de proliferació cel·lular i de la migració de les CEH activades. Concretament, la inhibició farmacològica de la CtsB mitjançant Ca074-Me resulta en un augment del ARNm de la CtsB observat per PCR a temps real (dades no mostrades). Això suggereix que la manca d'activitat CtsB en les cèl·lules provoca un augment de la síntesi de l'enzim per tal de compensar la inhibició. Tot i que hem observat l'eficàcia de l'inhibidor sobre l'activació de les CEH i el seu impacte antifibròtic, el seu ús a llarg termini podria tenir un caràcter temporal degut a la sobreexpressió de les catepsines. Estudis addicionals necessitarien valorar el tractament perllongat amb inhibidors de la CtsB en la inhibició de la fibrosi hepàtica.

Els resultats que hem obtingut amb CEH primàries de ratolí els hem confirmat amb la línia cel·lular de CEH humanes activades LX2, obtenint idèntics resultats, excepte en la

disminució de l'expressió de TGF β . Mentre que en CEH primàries activades de ratolí la inhibició de la CtsB provocava una disminució de TGF β , en LX2 no hem observat el mateix fenomen. Això probablement es pot atribuir al fet que les LX2 estan més diferenciades que les CEH de 5 dies. S'ha descrit com les CEH canvien la seva resposta a TGF β al llarg del temps d'activació, tornant-se insensibles al factor de creixement un cop es transdiferencien totalment [183], [200]. Degut a que l'expressió de les catepsines augmenta al llarg del temps d'activació i la seva inhibició reverteix en part el fenotip activat d'aquestes cèl·lules, pensem que les catepsines B i D podrien modular parcialment la transdiferenciació i la perpetuació de l'activació de les CEH, característiques fonamentals pel seu potencial fibrogènic i en conseqüència per a la fibrogènesi hepàtica.

On es localitzaven les catepsines en les CEH i com són secretades a l'exterior cel·lular són qüestions que també s'han abordat en aquest treball. Els resultats mostren com les catepsines B i D col·localitzen amb el marcador lisosomal LAMP2b en CEH activades. A més, hem proposat una possible ruta d'internalització de les catepsines des de l'exterior cel·lular cap als lisosomes ja que hem mostrat com les catepsines col·localitzen amb marcadors d'endosomes primerencs, Rab5A, i tardans, Rab7. Heinrich *et al.* ja havien descrit prèviament la colocalització de Bid amb CtsD en vesícules Rab5A positives en el context de l'apoptosi induïda per CtsD [114]. En aquest sentit, Lemansky *et al.* van veure en fetge de rata com la CtsD era secretada a l'exterior cel·lular mitjançant vesícules [201]. Pel que fa a la CtsB, s'havia vist com canvis en el pH pericel·lular podien induir la seva secreció al medi extracel·lular gràcies a vesícules [202]. Així doncs, en el nostre model les catepsines es localitzarien en els lisosomes, des dels quals serien secretades al exterior cel·lular, on podrien desenvolupar un paper clau en la degradació de proteïnes de la matriu extracel·lular. Concretament, hem observat com la CtsB té la capacitat de degradar proteïnes de la matriu extracel·lular com el col·lagen desnaturalitzat (gelatina). De fet, la secreció de les catepsines s'ha correlacionat positivament amb la capacitat invasiva i metastàtica de certs tumors [203], [173], [204] ja sigui facilitant la invasió al degradar proteïnes de la matriu extracel·lular o activant altres proteases com l'activador del plasminògen tipus urocinasa [205]. El pH en el que actuarien les catepsines en l'exterior cel·lular en aquest model requereix un estudi més detallat. S'ha descrit com la CtsB pot ser secretada tant a pH neutre [206] com a pH àcid, amb activitat endopeptidasa en el primer cas i exopeptidasa en el segon. Al seu torn, la CtsD també pot ser secretada a l'exterior cel·lular [112]. El pH en el que actuaria la CtsD en el medi extracel·lular és igualment

controvertit, ja que pot actuar a pH àcid [112] però existeixen evidències que podria proteolitzar substrats com la prolactina a pH fisiològic [207]. En models d'inflamació i càncer s'ha descrit la disminució del pH extracel·lular [208], [209]. En el nostre cas això podria estar afavorint l'activació de les catepsines secretades.

Les catepsines B i D, com ja s'ha mencionat anteriorment, són proenzims que per arribar a ser actius han de ser processats. Prèviament s'ha descrit com les catepsines a més d'activar-se autocatalíticament [184], [106] poden ser activades per altres catepsines. En aquest sentit, la CtsB és capaç de processar la CtsD [105] i a l'inrevés [185]. Malgrat aquests antecedents, l'activació recíproca d'aquestes proteases en el model d'activació en plàstic de les CEH no s'havia analitzat. En el nostre model, la inhibició tant farmacològica com per ARNi de la CtsB provoca una disminució de la forma madura de la CtsD i un augment de la proforma. Per altra banda, s'obtenen resultats idèntics sobre la CtsB al inhibir la CtsD. Cal destacar que hem comprovat l'especificitat dels inhibidors, veient-se una especificitat total del Ca074-Me per la CtsB i de la Pepstatina A per la CtsD (dades no mostrades). Per altra banda, també hem analitzat per PCR a temps real l'especificitat dels ARNi pels seus ARN diana, sense veure creuaments (dades no mostrades). Un cop descartats els creuaments, podem dir que existeix una relació entre ambdues catepsines de tal forma que al inhibir-ne una té lloc paral·lelament una disminució de la forma activa de l'altra i un augment de la proforma, cosa que indicaria una manca de processament. Així doncs, en aquest model es donaria un processament mutu entre la CtsB i la CtsD i per tant, en inhibir la CtsB estem afectant parcialment l'activitat de la CtsD.

El mecanisme pel qual es dona una disminució de la proliferació cel·lular i la migració al inhibir les catepsines també va ser un dels objectius d'aquest estudi. El PDGF és un factor de creixement implicat en la transdiferenciació de les CEH a CEH/MFs. Concretament, s'ha descrit la seva participació en processos com la proliferació cel·lular, la quimiotaxi, la supervivència [54], [186] i la deposició de col·lagen [187]. Les catepsines B i D s'han relacionat amb anterioritat amb la ruta de senyalització induïda per PDGF. En aquest sentit, s'ha vist com l'estimulació amb PDGF provoca un augment de la secreció de la CtsB al medi extracel·lular de fibroblasts sinovials [210]. Les catepsines s'han implicat de forma indirectament en la degradació del receptor de PDGF en CEH i en conseqüència amb una disminució de la sensibilitat a l'estímul [191], [190]. Tot i això, aquests estudis no havien aprofundit en l'anàlisi de la presència de catepsines en la CEH, assumint que la CtsB

[191] o la CtsD [190] eren les responsables de l'absència del receptor PDGF en CEH quiescents. Els nostres estudis han demostrat que això no és possible ja que les CEH quiescents no expressen catepsines. A més, el receptor de PDGF s'indueix durant el procés d'activació de les CEH, sent molt baixa la seva expressió en CEH quiescents [211]. Tenint en compte aquests antecedents, hem analitzat com es veu alterada la ruta de senyalització d'AKT en resposta a PDGF BB davant de la inhibició de les catepsines. En el nostre model, el receptor PDGF β augmenta al llarg del procés d'activació de la mateixa manera que ho fan la resta de marcadors de fibrosi. Per altra banda, es dona una disminució del receptor induïda per la unió al seu lligand, però independent de la inhibició de les catepsines. Així doncs, sembla que les catepsines no provocarien una disminució de la sensibilitat al PDGF per la degradació del seu receptor. A continuació hem estudiat la fosforilació d'AKT davant de la inhibició de les catepsines. La fosforilació d'AKT davant de l'estimulació amb PDGF es veu reduïda al tractar les cèl·lules prèviament amb l'inhibidor de la CtsB, però no el de la CtsD. Aquesta mateixa disminució de la fosforilació es reproduïx al administrar un inhibidor de la PI3K. Davant d'aquests resultats semblaria que la CtsB estaria participant en la ruta de senyalització de PDGF.

Si la CtsB estigués participant directament en la ruta de PDGF, requerriria probablement una localització citosòlica. Com la catepsina B es redistribueix en aquest model des de la seva localització lisosomal fins al citosol, és una qüestió que requereix un estudi més profund. De forma teòrica podem aportar certes aproximacions. S'ha descrit com l'estimulació de les CEH amb PDGF augmenta l'activitat d'un intercanviador de membrana Na^+/H^+ . Aquest intercanviador provoca una lleugera basificació del pH de l'interior cel·lular [212], [213], la qual cosa podria generar una redistribució dels lisosomes en l'interior cel·lular [214] i un augment de l'exocitosi [215], [216]. L'esfingosina, producte resultant de la metabolització de la ceramida, també podria estar jugant un paper en la desestabilització del lisosoma al unir-se a la CtsB [88]. Aquesta qüestió s'abordarà més endavant en aquesta discussió.

A causa del paper que les catepsines B i D juguen en el procés de transdiferenciació i perpetuació de l'activació de les CEH, es va voler analitzar l'impacte de la seva inhibició en un model de fibrogènesi *in vivo* com el del CCl_4 . Canbay *et al.* van descriure amb anterioritat la implicació de la CtsB en el model de lligadura del conducte biliar en ratolins a nivell de l'hepatòcit, però no a nivell de la CEH [97]. Per tal d'obtenir una bona estratègia d'inhibició

en el fetge a nivell global, hem analitzat la quantitat de CtsB i de CtsD que hi ha en les CEH en comparació amb la del fetge total. La CtsB es veu augmentada de forma molt significativa amb el procés de transdiferenciació de les CEH. En canvi, tant en fetge total control com tractat amb CCl₄, s'observen uns nivells de CtsB per sota del de les CEH quiescents. Tot i que la CtsD també augmenta amb l'activació de les CEH, els seus nivells en fetges control o tractats amb CCl₄ resulten molt similars als trobats en CEH activades. Per tal de confirmar aquestes observacions, hem analitzat per immunohistoquímica el patró d'expressió de les catepsines B i D en fetges control o tractats amb CCl₄. La CtsB s'expressa exclusivament a les CEH dels fetges tractats amb CCl₄, mentre que no s'observa marcatge en els fetges control i per tant en els hepatòcits. La CtsD, en canvi, mostra un patró d'expressió més difús i similar entre els animals control i els tractats amb CCl₄, col·localitzant parcialment en aquests últims amb les CEH. Com a resum podem dir que la CtsB augmenta la seva expressió amb el tractament amb CCl₄ a nivell de CEH. En canvi, la CtsD tot i que augmenta amb el tractament amb CCl₄ a nivell de CEH, ja s'expressa a nivell d'hepatòcit en els animals control. Així doncs, a l'hora de plantejar l'estratègia a seguir en la inhibició de les catepsines en el model *in vivo*, hem escollit la inhibició de la CtsB enfront la de la CtsD, degut al seu augment específic en la CEH i la seva absència en els fetges control.

El model *in vivo* consisteix finalment en l'administració del CCl₄ durant dues setmanes després de les quals es coadministra el CCl₄ amb l'inhibidor de la CtsB. Aquestes dues primeres setmanes permeten la inducció de l'activació de les CEH i l'inici de la fibrogènesi. L'administració de l'inhibidor de la CtsB resulta en una disminució del número de cèl·lules α -SMA positives, la infiltració de neutròfils, la síntesi de col·lagen i per tant, en una reducció de la progressió de la fibrogènesi induïda pel CCl₄. Canbay *et al.*, van veure que al inhibir la CtsB es veia una disminució del dany hepatocel·lular, el qual contribueix a l'activació de les CEH [97]. Així doncs, si s'eliminava el dany en l'hepatòcit, disminuïa en part l'activació de les CEH. Contràriament a l'observat per Canbay *et al.*, en el nostre model la inhibició de la CtsB no genera una disminució del dany hepàtic causat per CCl₄. Aquesta observació indicaria que la disminució de la fibrosi hepàtica observada es donaria per un efecte sobre les CEH i no sobre el dany hepàtic. Un aspecte que encara resta per clarificar és la total absència d'infiltració de neutròfils observada en els animals tractats amb l'inhibidor de la CtsB i el CCl₄. Aquest fet podria indicar un efecte directe de la inhibició de

la CtsB sobre els neutròfils, o bé una disminució de les quimiocines secretades per les CEH responsables de la quimioatracció d'aquests.

Un cop demostrada la implicació de les catepsines B i D en l'activació de les CEH i en el model de fibrogènesi hepàtica s'ha aprofundit en la relació existent en aquest model entre les catepsines i l'esfingomielinasa àcida (ASMasa). La relació entre l'ASMasa i les catepsines ja havia estat prèviament descrita en el context de l'apoptosi [88], [114], [107], però no en el model d'activació *in vitro* de les CEH. A més, l'ASMasa s'havia vist implicada en processos tant de mort com de proliferació cel·lular [147], [153], processos fonamentals en el desenvolupament de la fibrosi hepàtica. Primerament, ens hem plantejat caracteritzar l'activitat ASMasa i NSMasa al llarg del temps d'activació de les CEH. S'ha observat que mentre que l'ASMasa augmenta al llarg del procés de transdiferenciació de les CEH, l'NSMasa es manté constant. La inhibició de l'ASMasa, tant farmacològicament com per ARNi, resulta en una disminució significativa de les catepsines B i D i l' α -SMA, com a marcador del procés de fibrosi. A més, la inhibició de l'ASMasa provoca una disminució de la taxa de proliferació de les CEH. Així doncs, sembla que existeix una relació entre l'ASMasa i les catepsines en el nostre model.

Com l'ASMasa modula la capacitat profibrogènica de les CEH ha estat una altra qüestió a resoldre en aquest treball. Treballs anteriors havien descrit com l'ASMasa podia intervenir en rutes de proliferació cel·lular i supervivència com la del PDGF [153], [154]. A més i com ja s'ha mostrat en aquesta discussió, la CtsB participa en la proliferació cel·lular de les CEH dins de la via del PDGF. Així doncs, s'ha analitzat l'impacte que la inhibició de l'ASMasa provoca sobre la proliferació cel·lular i quina relació existeix amb la senyalització per PDGF. La inhibició farmacològica de l'ASMasa provoca una disminució significativa de la proliferació de les CEH activades, al igual que succeeix al inhibir la CtsB. L'administració conjunta de l'inhibidor de l'ASMasa i el PDGF resulta en una disminució de la fosforilació d'AKT induïda pel factor de creixement. Aquestes observacions ens permeten establir que la inhibició de l'ASMasa en CEH activades provoca la disminució de les catepsines B i D, la qual cosa resulta en un efecte sobre la proliferació cel·lular i la fosforilació d'AKT idèntic a l'observat al inhibir específicament la CtsB. Aquest fet reforça la idea d'una relació íntima entre aquestes proteïnes, apuntant que l'ASMasa podria trobar-se per sobre de les catepsines en una possible ruta de senyalització i regular així en part l'actuació d'aquestes proteases.

El mecanisme pel qual l'ASMasa actua sobre la ruta de senyalització del PDGF a través de les catepsines requerirà un estudi més detallat. Anteriorment en aquesta discussió ja s'ha comentat una possible implicació de l'ASMasa en la permeabilització del lisosoma a través de l'esfingosina [88]. Aquest mecanisme alliberaria la CtsB del lisosoma al citosol on, per un mecanisme encara desconegut, podria participar en la senyalització per PDGF. De fet, s'ha descrit com les cèl·lules de ratolins deficientes en CtsD i CtsB tenen les rutes de supervivència i proliferació cel·lular alterades. Concretament s'ha vist com les neurones procedents de ratolins deficientes en CtsD, tenen una disminució en la senyalització de la ruta de supervivència PI3K/AKT, sent més sensibles a l'apoptosi [217]. Per altra banda, la deficiència de la CtsB, estudiada en el context del càncer, s'ha vist implicada en una disminució de la proliferació de les cèl·lules tumorals [218].

Segons hem vist en el nostre model, l'ASMasa podria ésser profibrogènica, ja que la seva inhibició *in vitro* resulta en una menor expressió de marcador d'activació de les CEH i en una inferior taxa de proliferació. Per altra banda, s'ha descrit que els ratolins deficientes en ASMasa (ASMasa^{-/-}) posseeixen resistència a estímuls apoptòtics [219], [220] i [141]. Tenint en compte això, el següent objectiu que ens hem proposat és analitzar el fenotip d'activació de les CEH dels ratolins ASMasa^{-/-}. Hem vist com les CEH procedents de ratolins ASMasa^{-/-} tenen un fenotip més profibrogènic. A més, aquesta absència d'ASMasa s'acompanya d'un augment de l'expressió de la CtsB i la CtsD i de forma més primerenca. Segons les observacions realitzades al inhibir l'ASMasa en ratolins salvatges, s'hagués esperat que l'absència total d'ASMasa que presenten els ratolins ASMasa^{-/-} hagués resultat en una menor capacitat profibrogènica. Contràriament a l'esperat, les CEH procedents de ratolins ASMasa^{-/-} posseeixen un fenotip més profibrogènic. Aquesta contradicció pot ser explicada gràcies a algun tipus de mecanisme de compensació existent en els ratolins ASMasa^{-/-}. De fet, s'han descrit amb anterioritat l'existència de mecanismes de compensació en altres models de ratolins deficientes en certes proteïnes [221], [222].

La següent qüestió que ens hem plantejat és quin pot ser el mecanisme responsable de l'augment del potencial profibrogènic d'aquestes cèl·lules. Degut a l'augment de catepsines observat en el model d'activació de les CEH procedents dels ratolins ASMasa^{-/-} i a la implicació d'aquestes en la progressió de la fibrosi hepàtica tant *in vivo* com *in vitro*, hem escollit aquestes proteases com a possibles candidates responsables del fenotip. La inhibició farmacològica de la CtsB en CEH procedents de ratolins ASMasa^{-/-} resulta en una

disminució de l' α -SMA. A més, aquesta inhibició provoca també una disminució de la capacitat proliferativa d'aquestes cèl·lules. Així doncs, l'augment de la capacitat profibrogènica observat en les CEH procedents de ratolins $ASMasa^{-/-}$ seria causat en part per un augment de l'expressió de la CtsB en aquests animals. Això es donaria probablement per un mecanisme de compensació encara per determinar.

Finalment, i per tal de confirmar aquesta major capacitat profibrogènica de les CEH dels animals $ASMasa^{-/-}$ hem analitzat el comportament de la fibrosi *in vivo* induïda per CCl_4 . Animals $ASMasa^{+/+}$ i $ASMasa^{-/-}$ s'han sotmès a tractament amb CCl_4 durant 4 setmanes. Tot i que ambdós tipus d'animals tenen uns nivells de dany hepatocel·lular similars, els animals $ASMasa^{-/-}$ mostren una acumulació de col·lagen major causada pel CCl_4 . Aquests animals també mostren un augment de les catepsines B i D i de l' α -SMA. Al analitzar a nivell histològic els fetges d'aquests animals, es veu que els animals $ASMasa^{-/-}$ mostren una degeneració dels macròfags residents cap a cèl·lules escumoses [195], una major acumulació de fibra i una major infiltració de neutròfils. Aquests resultats confirmen que els animals $ASMasa^{-/-}$ pateixen una fibrosi hepàtica major davant de la inducció amb CCl_4 probablement causada per un augment de les catepsines.

Com a resum d'aquesta discussió podem esquematitzar la participació de la CtsB, la CtsD i l' $ASMasa$ en l'activació de les CEH segons s'il·lustra en la Figura 49. En aquest model les catepsines B i D es localitzarien en els lisosomes des dels quals podrien ser secretades a l'exterior cel·lular i internalitzades via endosomes. És en la seva localització extracel·lular on podrien jugar un paper important en la degradació de la matriu extracel·lular i la progressió de la fibrosi. A més, probablement al lisosoma tindria lloc una activació recíproca entre la CtsB i la CtsD. Per altra banda, l' $ASMasa$ podria estar implicada en l'activació de les catepsines i en la transdiferenciació de les CEH. Catepsines i $ASMasa$ confluirien en aquestes cèl·lules en la ruta de senyalització PI3K/AKT, estimulada per PDGF de tal manera que la seva inhibició evitaria l'activació d'aquesta via i per tant, la transcripció de gens implicats en la migració, la quimiotaxi i la proliferació cel·lular (Figura 49).

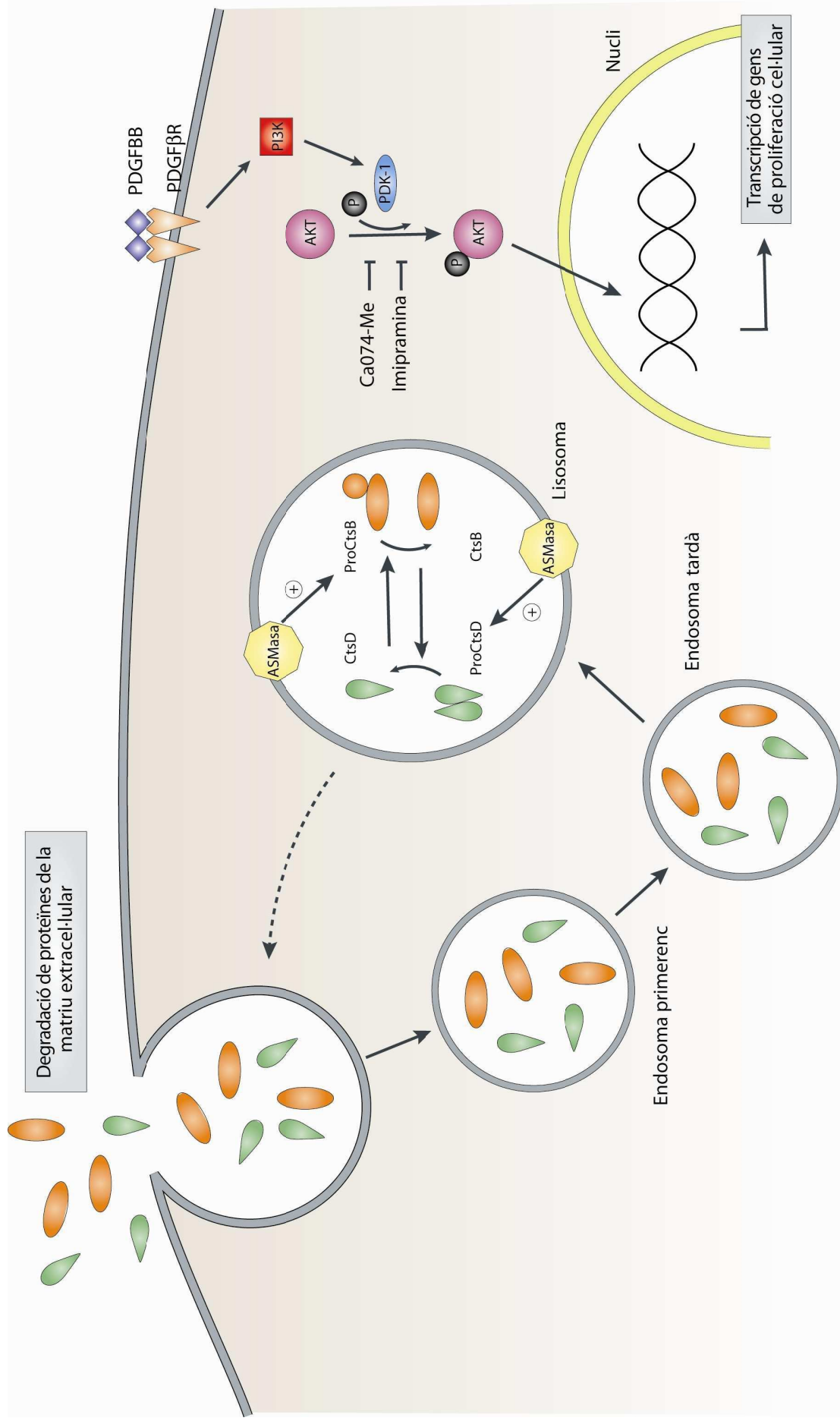


Figura 49: Participació de les catepsines B i D i l'ASMasA en el procés d'activació de la CEH

◦◦● 6. Conclusions

A partir dels resultats obtinguts en aquest treball experimental es poden extreure les següent conclusions:

1. Les catepsines B i D augmenten durant el procés de transdiferenciació de les CEH localitzant-se predominantment a lisosomes i endosomes.
2. Ambdues catepsines es secreten a l'exterior cel·lular, on concretament la catepsina B té capacitat de degradar proteïnes de la matriu extracel·lular.
3. Existeix un processament mutu entre les catepsines B i D.
4. La inhibició de les catepsines B i D provoca una disminució del fenotip profibrogènic de les CEH.
5. L'ASMasa augmenta selectivament al llarg del temps d'activació de les CEH, precedint la seva transdiferenciació fet que no s'observa amb l'NSMasa. La inhibició de l'ASMasa resulta en una disminució de l'activació de les CEH.
6. Existeix una jerarquia entre l'activació de l'ASMasa i les catepsines B i D, on sembla que l'ASMasa es situaria per sobre d'aquestes últimes.
7. L'ASMasa i la catepsina B conflueixen en la ruta de senyalització de PDGF. La inhibició farmacològica de qualsevol de les dues resulta en una disminució del fenotip activat i la taxa de proliferació de les CEH.
8. Les CEH procedents de ratolins *ASMasa*^{-/-} presenten un fenotip més profibrogènic degut a un mecanisme de compensació del model transgènic, que provoca un augment de la catepsina B. La inhibició en aquestes cèl·lules de la catepsina B reverteix en part l'activació.
9. Les catepsines i l'ASMasa podrien ser possibles dianes terapèutiques per revertir l'activació de les CEH i frenar la progressió de la fibrosi hepàtica.

◦◦● 7. Bibliografia

Bibliografia

- 1 Friedman SL. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J. Hepatol.* 2003, 38:S38-S53.
- 2 Tsukada S, Parsons A, Rippe R. Mechanisms of liver fibrosis. *Clinica Chimica Acta* 2006, 364:33-60.
- 3 Parola M, Marra F, Pinzani M. Myofibroblast – like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Molecular Aspects of Medicine* 2008, 29:58-66.
- 4 Pinzani M, Romanelli R, Magli S. Progression of fibrosis in chronic liver diseases – time to tally the score. *J Hepatol* 2001, 34:764-767.
- 5 Bataller R, Brenner D. Liver fibrosis. *J. Clin. Inv.* 2005, 115:2:209-218.
- 6 Chen A, Davis B. The DNA binding protein BTEB mediates acetaldehyde-induced, jun N-terminal Kinase-dependent α 1(I) collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2000, 220:2818-2826.
- 7 Brenner DA, Chojkier M. Acetaldehyde increases collagen gene transcription in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1987, 262:17690-17695.
- 8 Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Deneef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J. Hepatol.* 2000, 36:200-209.
- 9 di Bonzo L, Ferrero I, Cravanzola C, Mareschi K, Rustichell D, Novo E, Sanavio F, Cannito S, Zamara E, Bertero M, Davit A, Francica S, Novelli F, Colombatto S, Fagioli F, Parola M. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* 2008, 57:223-231.
- 10 Novo E, Marra F, Zamara E, di Bonzo VL, Caligiuri A, Cannito S, Antonaci C, Colombatto S, Pinzani M, Parola M. Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut* 2006, 55:90-97.
- 11 Bataller R, North K, and Brenner D. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003, 37:493-503.
- 12 Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, Vizzutti F, Anania F, Milani S, Rombouts K, Laffi G, Pinzani M, Marra F. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005, 42:1339-1348.

- 13 Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* 2001, 34:288-297.
- 14 Ding X, Saxena N, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania F. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005, 166:1655-1669.
- 15 Bertolani C, Sancho-Bru P, Failli P, Bataller R, Aleffi S, DeFranco R, Mazzinghi B, Romagnani P, Milani S, Gines P, Colmenero J, Parola M, Gelmini S, Tarquini R, Laffi G, Pinzani M, Marra F. Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Am. J. Pathol.* 2006, 169:2042-2053.
- 16 Lee J, Semela D, Iredale J, Shah V. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte?. *Hepatology* 2007, 45:817-825.
- 17 De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic?. *Gastroenterology* 2006, 131:272-275.
- 18 Zhan S, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, Torok NJ. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology* 2006, 43:435-443.
- 19 Robertson H, Kirby JA, Yip WW, Jones DEJ, Burt AD. Biliary epithelial-mesenchymal transition in posttransplantation recurrence of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007, 45:977-981.
- 20 Friedman S, Arthur M. Reversing hepatic fibrosis. *Sci Med* 2002, 8:194-205.
- 21 Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001, 48:548-557.
- 22 Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997, 151:1265-1272.
- 23 Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S, Wilkins B, Iredale J. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 2000, 156:1235-1243.
- 24 Preaux A, D'ortho M, Bralet M, Laperche Y, Mavier P. Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2. *Hepatology* 2002, 36:615-622.

- 25 Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJP, Benyon C, Iredale JP. 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* 2002, 277:11069-11076.
- 26 Mathurin P, Duchatelle V, Ramond MJ, Degott C, Bedossa P, Erlinger S, Benhamou JP, Chaput JC, Rueff B, Poynard T. Survival and prognostic factors in patients with severe alcoholic hepatitis treated with prednisolone. *Gastroenterology* 1996, 110:1847-1853.
- 27 Brown KE, Poulos JE, Li L, Soweid AM, Ramm GA, O'Neill R, Britton RS, Bacon BR. Effect of vitamin E supplementation on hepatic fibrogenesis in chronic dietary iron overload. *Am J Physiol* 1997, 272:G116-23.
- 28 Jia JD, Bauer M, Cho JJ, Ruehl M, Milani S, Boigk G, Riecken EO, Schuppan D. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1. *J Hepatol* 2001, 35:392-398.
- 29 Cao Q, Mak KM, Lieber CS. DLPC decreases TGF-beta1-induced collagen mRNA by inhibiting p38 MAPK in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, 283:G1051-61.
- 30 Gassó M, Rubio M, Varela G, Cabré M, Caballería J, Alonso E, Deulofem R, Camps J, Giménez A, Pajares M, Parés A, Mato JM, Rodés J. Effects of S-adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Hepatol* 1996, 25:200-205.
- 31 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002, 7:d793-807.
- 32 Galli A, Crabb DW, Ceni E, Salzano R, Mello T, Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Trozzi L, Surrenti C, Casini A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology* 2002, 122:1924-1940.
- 33 Cho JJ, Hocher B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 2000, 118:1169-1178.
- 34 Pines M, Nagler A. Halofuginone: a novel antifibrotic therapy. *Gen Pharmacol* 1998, 30:445-450.
- 35 Bruck R, Genina O, Aeed H, Alexiev R, Nagler A, Avni Y, Pines M. Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology* 2001, 33:379-386.
- 36 Geerts A, Rogiers V. Sho-saiko-To: the right blend of traditional Oriental medicine and liver cell biology. *Hepatology* 1999, 29:282-284.

- 37 Moro T, Shimoyama Y, Kushida M, Hong YY, Nakao S, Higashiyama R, Sugioka Y, Inoue H, Okazaki I, Inagaki Y. Glycyrrhizin and its metabolite inhibit Smad3-mediated type I collagen gene transcription and suppress experimental murine liver fibrosis. *Life Sci* 2008, 83:531-539.
- 38 Yang Y, Yang S, Chen M, Zhang X, Zou Y, Zhang X. Compound Astragalus and *Salvia miltiorrhiza* Extract exerts anti-fibrosis by mediating TGF-beta/Smad signaling in myofibroblasts. *J Ethnopharmacol* 2008, 118:264-270.
- 39 Wale K. Liver perivascular cells revealed by gold- and silver- impregnation methods and electron microscopy. In: Motta P, ed. *Biopathology of the Liver: An ultrastructural Approach*. Dordrecht: Kluwer 2001, :23-23.
- 40 Boers W, Aarass S, Linthorst C, Pinzani M, Elferink R, Bosma P. Transcriptional profiling reveals novel markers of liver fibrogenesis: Gremlin and insulin-like growth factor-binding proteins. *J Biol Chem* 2006, 281:16289-16295.
- 41 Roskams T, Cassiman D, De Vos R, Libbrecht L. Neuroregulations of the neuroendocrine compartment of the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004, 280:910-923.
- 42 Oben J, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran T, LI Z, Huang J, Thomas S, Diehl A. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004, 53:438-445.
- 43 Zou Z, Ekastaksin W, Wake K. Zonal and regional differences identified from precision mapping of vitamin A-storing lipid droplets of the hepatic stellate cells in pig liver: a novel concept of addressing the intralobular area of heterogeneity. *Hepatology* 1998, 27:1098-1108.
- 44 Wake K, Sato T. Intralobular heterogeneity of perisinusoidal stellate cells in porcine liver. *Cell Tissue Res* 1993, 273:227-237.
- 45 Friedman S. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008, 88:125-172.
- 46 Cassiman D, Barlow A, Vander Borgh S, Libbrecht L, Pachnis V. Hepatic stellate cells do not derive from neural crest. *J. Hepatol.* 2006, 44:1098-1104.
- 47 Roskams T. Different types of liver progenitor cells and their niches. *J. Hepatol.* 2006, 45:1-4.
- 48 Libbrecht L, Cassiman D, Desmet V, Roskam T. The correlation between portal myofibroblasts and development of intrahepatic bile ducts and arterial branches in human liver. *Liver* 2002, 22:252-258.

- 49 Okuno M, Sato T, Kitamoto T, Imai S, Kawada N, Suzuki Y, Yoshimura H, Moriwaki H, Onuki K, Masushige S, Muto Y, Friedman S, Kato S, Kojima S. Increased 9,13-di-cis-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF-beta mediated fibrogenesis in vivo. *J Hepatol* 1999, 30:1073-1080.
- 50 Vinas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Berenguer C, Enrich C, Nicolas J, Ercilla G, Gallart T, Vives J, Arroyo V, Rodes J. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 2003, 38:919-929.
- 51 Unanue E. Ito cells, stellate cells, myofibroblasts: new actors in antigen presentation. *Immunity* 2007, 26:9-10.
- 52 Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb MP, Glass DJ, Lemke G, Yancopoulos GD. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* 1997, 1:25-34.
- 53 Vogel W. Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *FASEB J* 1999, 13 Suppl:S77-82.
- 54 Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 2002, 7:D:1720-1726.
- 55 Friedman S. Molecular regulation of hepatic fibrosis and integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000, 275:4:2247-2250.
- 56 Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001, 21:397-416.
- 57 Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor beta smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007, 56:284-292.
- 58 Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, Conti M, Huet S, Ba N, Buffet C, Bedossa P. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001, 34:738-744.
- 59 Melton A, Yee H. Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis. *Hepatology* 2007, 45:1446-1453.
- 60 Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 1998, 152:423-430.

- 61 Novo E, Marra F, Zamara E, Valfrè di Bonzo L, Monitillo L, Cannito S, Petrai I, Mazzocca A, Bonacchi A, De Franco RSM, Colombatto S, Autelli R, Pinzani M, Parola M. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut* 2006, 55:1174-1182.
- 62 Turk B, Bieth J, Björk I, Dolenc I, Turk D, Cimerman N, Kos J, Colic A, Stoka V, Turk V. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation an/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995, 376:225-230.
- 63 Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2000, 2:318-325.
- 64 Conus S, Simon H. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem Pharmacol* 2008, 76:1374-1382.
- 65 Maubach G, Lim MCC, Kumar S, Zhuo L. Expression and upregulation of cathepsin S and other early molecules required for antigen presentation in activated hepatic stellate cells upon IFN-gamma treatment. *Biochim Biophys Acta* 2007, 1773:219-231.
- 66 Lutgens SPM, Cleutjens KBJM, Daemen MJAP, Heeneman S. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB J* 2007, 21:3029-3041.
- 67 Frlan R, Gobec S. Inhibitors of cathepsin B. *Curr Med Chem* 2006, 13:2309-2327.
- 68 Willenbrock F, Brocklehurst K. A general framework of cysteine-proteinase mechanism deduced from studies on enzymes with structurally different analogous catalytic-site residues Asp-158 and -161 (papain and actinidin), Gly-196 (cathepsin B) and Asn-165 (cathepsin H). Kinetic studies up to pH 8 of the hydrolysis of N-alpha-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginine 2-naphthylamide catalysed by cathepsin B and of L-arginine 2-naphthylamide catalysed by cathepsin H. *Biochem J* 1985, 227:521-528.
- 69 Khouri HE, Plouffe C, Hasnain S, Hiramata T, Storer AC, Ménard R. A model to explain the pH-dependent specificity of cathepsin B-catalysed hydrolyses. *Biochem J* 1991, 275 (Pt 3):751-757.
- 70 Reinheckel T, Deussing J, Roth W, Peters C. Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biol Chem* 2001, 382:735-741.
- 71 Haque A, Banik NL, Ray SK. New insights into the roles of endolysosomal cathepsins in the pathogenesis of Alzheimer's disease: cathepsin inhibitors as potential therapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008, 7:270-277.

- 72 Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, Turk D, Turk B. Emerging Roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des* 2007, 13:387-403.
- 73 Friedrich B, Jung K, Lein M, Türk I, Rudolph B, Hampel G, Schnorr D, Loening SA. Cathepsins B, H, L and cysteine protease inhibitors in malignant prostate cell lines, primary cultured prostatic cells and prostatic tissue. *Eur J Cancer* 1999, 35:138-144.
- 74 Lah TT, Calaf G, Kalman E, Shinde BG, Russo J, Jarosz D, Zabrecky J, Somers R, Daskal I. Cathepsins D, B and L in breast carcinoma and in transformed human breast epithelial cells (HBEC). *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995, 376:357-363.
- 75 Hazen LG, Bleeker FE, Lauritzen B, Bahns S, Song J, Jonker A, Van Driel BE, Lyon H, Hansen U, Köhler A, Van Noorden CJ. Comparative localization of cathepsin B protein and activity in colorectal cancer. *J Histochem Cytochem* 2000, 48:1421-1430.
- 76 Hughes SJ, Glover TW, Zhu XX, Kuick R, Thoraval D, Orringer MB, Beer DG, Hanash S. A novel amplicon at 8p22-23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:12410-12415.
- 77 Kawasaki G, Kato Y, Mizuno A. Cathepsin expression in oral squamous cell carcinoma: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002, 93:446-454.
- 78 Ebert W, Knoch H, Werle B, Trefz G, Muley T, Spiess E. Prognostic value of increased lung tumor tissue cathepsin B. *Anticancer Res* 1994, 14:895-899.
- 79 Scorilas A, Fotiou S, Tsiambas E, Yotis J, Kotsiandri F, Sameni M, Sloane BF, Talieri M. Determination of cathepsin B expression may offer additional prognostic information for ovarian cancer patients. *Biol Chem* 2002, 383:1297-1303.
- 80 Troy AM, Sheahan K, Mulcahy HE, Duffy MJ, Hyland JMP, O'Donoghue DP. Expression of Cathepsin B and L antigen and activity is associated with early colorectal cancer progression. *Eur J Cancer* 2004, 40:1610-1616.
- 81 Lee N, Chen L, Lin M, Tsang F, Yeung C, Poon R, Peng J, Leng X, Beretta L, Sun S, Day P, Luk J. Proteomic Expression Signature Distinguishes Cancerous and Non-Malignant Tissues in Hepatocellular Carcinoma. *J Proteome Res* 2009, .:
- 82 Yan S, Sloane BF. Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. *Biol Chem* 2003, 384:845-854.
- 83 Turk B, Bieth JG, Björk I, Dolenc I, Turk D, Cimerman N, Kos J, Colic A, Stoka V, Turk V. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995, 376:225-230.

- 84 Leto G, Tumminello FM, Pizzolanti G, Montalto G, Soresi M, Gebbia N. Lysosomal cathepsins B and L and Stefin A blood levels in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis: potential clinical implications. *Oncology* 1997, 54:79-83.
- 85 Yamamoto H, Murawaki Y, Kawasaki H. Collagenolytic cathepsin B and L activity in experimental fibrotic liver and human liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1992, 76:95-112.
- 86 Ding W, Yin X. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004, 8:445-454.
- 87 Guicciardi M, Deussing J, Miyoshi H, Bronk S, Svingen P, Peters C, Kaufmann S, Gores G. Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 2000, 106:1127-1137.
- 88 Nathan W, Werneburg M, Guicciardi M, Bronk S, Gores G. Tumor necrosis factor- α -associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, 283:G947-G956.
- 89 Kågedal K, Zhao M, Svensson I, Brunk UT. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J* 2001, 359:335-343.
- 90 ZhengZheng L, Berk M, McIntyre T, Gores G, Feldstein A. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *Hepatology* 2008, 47:1495-1503.
- 91 Feldstein A, Werneburg N, Canbay A, Guicciardi M, Bronk S, Rydzewski R, Burgart L, Gores G. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004, 40 (1):185-194.
- 92 Werneburg N, Guicciardi ME, Yin X, Gores GJ. TNF-alpha-mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, 287:G436-43.
- 93 Werneburg NW, Guicciardi ME, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins. *J Biol Chem* 2007, 282:28960-28970.
- 94 Feldstein AE, Werneburg NW, Li Z, Bronk SF, Gores GJ. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, 290:G1339-46.
- 95 Roberts L, Kuorsawa H, Bronk S, Fesmier J, Agellon L, Leung W, Mao F, Gores G. Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1997, 113:1714-1726.

- 96 Kahraman A, Barreyro FJ, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, Akazawa Y, Masuoka HC, Howe CL, Gores GJ. TRAIL mediates liver injury by the innate immune system in the bile duct-ligated mouse. *Hepatology* 2008, 47:1317-1330.
- 97 Canbay A, Guicciardi M, Higuchi H, Feldstein A, Bronk S, Rydzewski R, Tanai M, Gores G. Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *J. Clin. Invest.* 2003, 112:152-159.
- 98 Guicciardi M, Miyoshi H, Bronk S, Gores G. Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor-alpha-mediated hepatocyte apoptosis and liver injury: implications for therapeutic applications. *Am J Pathol* 2001, 159:2045-2054.
- 99 Mahe J. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin. Liver Dis.* 2001, 21:417-426.
- 100 Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 2003, 83:655-663.
- 101 Leto G, Tumminello FM, Pizzolanti G, Montalto G, Soresi M, Ruggeri I, Gebbia N. Cathepsin D serum mass concentrations in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996, 34:555-560.
- 102 Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:1456-1460.
- 103 Rijnbouts S, Kal AJ, Geuze HJ, Aerts H, Strous GJ. Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1991, 266:23586-23592.
- 104 Metcalf P, Fusek M. Two crystal structures for cathepsin D: The lysosomal targeting signal and active site. *EMBO J.* 1993, 12:1293-1302.
- 105 Laurent-Matha V, Derocq D, Prébois C, Katunuma N, Liaudet-Coopman E. Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B. *J Biochem* 2006, 139:363-371.
- 106 Richo G, Conner GE. Proteolytic activation of human procathepsin D. *Adv Exp Med Biol* 1991, 306:289-296.
- 107 Heinrich M, Wickel M, Schneider-Brachert W, Sandberg C, Gahr J, Schwandner R, Weber T, Saftig P, Peters C, Brunner J, Krönke M, Schütze S. Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J* 1999, 18:5252-5263.
- 108 Laurent-Matha V, Maruani-Herrmann S, Prébois C, Beaujouin M, Glondou M, Noël A, Alvarez-Gonzalez ML, Blacher S, Coopman P, Baghdiguian S, Gilles C, Loncarek J,

- Freiss G, Vignon F, Liaudet-Coopman E. Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth. *J Cell Biol* 2005, 168:489-499.
- 109 Laurent-Matha V, Farnoud MR, Lucas A, Rougeot C, Garcia M, Rochefort H. Endocytosis of pro-cathepsin D into breast cancer cells is mostly independent of mannose-6-phosphate receptors. *J Cell Sci* 1998, 111 (Pt 17):2539-2549.
- 110 Koblinski J, Ahram M, Sloane B. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin. Chim. Acta* 2000, 291:113-135.
- 111 Gopalan P, Dufresne MJ, Warner AH. Thiol protease and cathepsin D activities in selected tissues and cultured cells from normal and dystrophic mice. *Can J Physiol Pharmacol* 1987, 65:124-129.
- 112 Benes P, Vetvicka V, Fusek M. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008, 68:12-28.
- 113 Hakala JK, Oksjoki R, Laine P, Du H, Grabowski GA, Kovanen PT, Pentikäinen MO. Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23:1430-1436.
- 114 Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Wickel M, Schneider-Brachert W, Trauzold A, Hethke A, Schütze S. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ* 2004, 11:550-563.
- 115 Johansson A, Steen H, Ollinger K, Roberg K. Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death Differ* 2003, 10:1253-1259.
- 116 Holman DH, Turner LS, El-Zawahry A, Elojeimy S, Liu X, Bielawski J, Szulc ZM, Norris K, Zeidan YH, Hannun YA, Bielawska A, Norris JS. Lysosomotropic acid ceramidase inhibitor induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008, 61:231-242.
- 117 Roberg K, Kågedal K, Ollinger K. Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am J Pathol* 2002, 161:89-96.
- 118 Bidère N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem* 2003, 278:31401-31411.

- 119 Lee AY, Gulnik SV, Erickson JW. Conformational switching in an aspartic proteinase. *Nat Struct Biol* 1998, 5:866-871.
- 120 Morales A, Lee H, Goñi FM, Kolesnick R, Fernandez-Checa JC. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* 2007, 12:923-939.
- 121 Hannun YA, Luberto C, Argraves KM. Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* 2001, 40:4893-4903.
- 122 Reynolds CP, Maurer BJ, Kolesnick RN. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett* 2004, 206:169-180.
- 123 Kolesnick R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* 2002, 110:3-8.
- 124 Morales A, París R, Villanueva A, Llacuna L, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Pharmacological inhibition or small interfering RNA targeting acid ceramidase sensitizes hepatoma cells to chemotherapy and reduces tumor growth in vivo. *Oncogene* 2007, 26:905-916.
- 125 Marí M, Fernández-Checa JC. Sphingolipid signalling and liver diseases. *Liver Int* 2007, 27:440-450.
- 126 Clarke CJ, Snook CF, Tani M, Matmati N, Marchesini N, Hannun YA. The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry* 2006, 45:11247-11256.
- 127 Kirschnek S, Paris F, Weller M, Grassme H, Ferlinz K, Riehle A, Fuks Z, Kolesnick R, Gulbins E. CD95-mediated apoptosis in vivo involves acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* 2000, 275:27316-27323.
- 128 Tomiuk S, Hofmann K, Nix M, Zumbansen M, Stoffel W. Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:3638-3643.
- 129 Hofmann K, Tomiuk S, Wolff G, Stoffel W. Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:5895-5900.
- 130 Krut O, Wiegmann K, Kashkar H, Yazdanpanah B, Krönke M. Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J Biol Chem* 2006, 281:13784-13793.
- 131 Neuberger Y, Shogomori H, Levy Z, Fainzilber M, Futerman AH. A lyso-platelet activating factor phospholipase C, originally suggested to be a neutral-sphingomyelinase, is located in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 2000, 469:44-46.

- 132 Mizutani Y, Tamiya-Koizumi K, Nakamura N, Kobayashi M, Hirabayashi Y, Yoshida S. Nuclear localization of neutral sphingomyelinase 1: biochemical and immunocytochemical analyses. *J Cell Sci* 2001, 114:3727-3736.
- 133 Sawai H, Domae N, Nagan N, Hannun YA. Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso-platelet activating factor-phospholipase C. *J Biol Chem* 1999, 274:38131-38139.
- 134 Lansmann S, Ferlinz K, Hurwitz R, Bartelsen O, Glombitza G, Sandhoff K. Purification of acid sphingomyelinase from human placenta: characterization and N-terminal sequence. *FEBS Lett* 1996, 399:227-231.
- 135 Ferlinz K, Hurwitz R, Vielhaber G, Suzuki K, Sandhoff K. Occurrence of two molecular forms of human acid sphingomyelinase. *Biochem J* 1994, 301 (Pt 3):855-862.
- 136 Schuchman EH. The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *J Inherit Metab Dis* 2007, 30:654-663.
- 137 Horinouchi K, Erlich S, Perl DP, Ferlinz K, Bisgaier CL, Sandhoff K, Desnick RJ, Stewart CL, Schuchman EH. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat Genet* 1995, 10:288-293.
- 138 Grassmé H, Cremesti A, Kolesnick R, Gulbins E. Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* 2003, 22:5457-5470.
- 139 Yu ZF, Nikolova-Karakashian M, Zhou D, Cheng G, Schuchman EH, Mattson MP. Pivotal role for acidic sphingomyelinase in cerebral ischemia-induced ceramide and cytokine production, and neuronal apoptosis. *J Mol Neurosci* 2000, 15:85-97.
- 140 Dimanche-Boitrel M, Meurette O, Rebillard A, Lacour S. Role of early plasma membrane events in chemotherapy-induced cell death. *Drug Resist Updat* 2005, 8:5-14.
- 141 García-Ruiz C, Colell A, Marí M, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernández-Checa JC. Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest* 2003, 111:197-208.
- 142 Smith EL, Schuchman EH. The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *FASEB J* 2008, 22:3419-3431.
- 143 Sharma K, Shi Y. The yins and yangs of ceramide. *Cell Res* 1999, 9:1-10.
- 144 Osawa Y, Uchinami H, Bielawski J, Schwabe RF, Hannun YA, Brenner DA. Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 2005, 280:27879-27887.

- 145 Rotolo JA, Zhang J, Donepudi M, Lee H, Fuks Z, Kolesnick R. Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J Biol Chem* 2005, 280:26425-26434.
- 146 Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, Heinrich M, Merkel O, Ehrenschwender M, Adam D, Mentlein R, Kabelitz D, Schütze S. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity* 2004, 21:415-428.
- 147 Kolesnick RN, Krönke M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998, 60:643-665.
- 148 Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996, 380:75-79.
- 149 Llacuna L, Marí M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Morales A. Critical role of acidic sphingomyelinase in murine hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2006, 44:561-572.
- 150 García-Ruiz C, Marí M, Morales A, Colell A, Ardite E, Fernández-Checa JC. Human placenta sphingomyelinase, an exogenous acidic pH-optimum sphingomyelinase, induces oxidative stress, glutathione depletion, and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 2000, 32:56-65.
- 151 Marí M, Colell A, Morales A, Pañeda C, Varela-Nieto I, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *J Clin Invest* 2004, 113:895-904.
- 152 Hofmeister R, Wiegmann K, Korherr C, Bernardo K, Krönke M, Falk W. Activation of acid sphingomyelinase by interleukin-1 (IL-1) requires the IL-1 receptor accessory protein. *J Biol Chem* 1997, 272:27730-27736.
- 153 Spiegel S, Merrill AHJ. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J* 1996, 10:1388-1397.
- 154 Sasaki T, Hazeki K, Hazeki O, Ui M, Katada T. Permissive effect of ceramide on growth factor-induced cell proliferation. *Biochem J* 1995, 311 (Pt 3):829-834.
- 155 Coroneos E, Martinez M, McKenna S, Kester M. Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines. Implications for cellular proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 1995, 270:23305-23309.

- 156 Serriere-Lanneau V, Teixeira-Clerc F, Li L, Schippers M, de Wries W, Julien B, Tran-Van-Nhieu J, Manin S, Poelstra K, Chun J, Carpentier S, Levade T, Mallat A, Lotersztajn S. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P2 triggers hepatic wound healing. *FASEB J* 2007, 21:2005-2013.
- 157 Waters C, Sambhi B, Kong K, Thompson D, Pitson SM, Pyne S, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate and platelet-derived growth factor (PDGF) act via PDGF beta receptor-sphingosine 1-phosphate receptor complexes in airway smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2003, 278:6282-6290.
- 158 Kato Y, Lambert CA, Colige AC, Mineur P, Noël A, Frankenne F, Foidart J, Baba M, Hata R, Miyazaki K, Tsukuda M. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2005, 280:10938-10944.
- 159 Kato Y, Ozawa S, Tsukuda M, Kubota E, Miyazaki K, St-Pierre Y, Hata R. Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma. *FEBS J* 2007, 274:3171-3183.
- 160 Knodell R, Ishak K, Black W, Chen T, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan T, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981, 1:431-435.
- 161 Gohda E, Nagahama J, Nakamura O, Tsubouchi H, Daikuhara Y, Pitot HC. Increased activities of liver cathepsins T and D in carbon tetrachloride-treated rats. *Biochim Biophys Acta* 1984, 802:362-371.
- 162 Kristensen DB, Kawada N, Imamura K, Miyamoto Y, Tatenno C, Seki S, Kuroki T, Yoshizato K. Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000, 32:268-277.
- 163 Maubach G, Lim MCC, Zhuo L. Nuclear cathepsin F regulates activation markers in rat hepatic stellate cells. *Mol Biol Cell* 2008, 19:4238-4248.
- 164 Varela-Rey M, Montiel-Duarte C, Osés-Prieto JA, López-Zabalza MJ, Jaffrèzou JP, Rojkind M, Iraburu MJ. p38 MAPK mediates the regulation of alpha1(I) procollagen mRNA levels by TNF-alpha and TGF-beta in a cell line of rat hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2002, 528:133-138.
- 165 Myung SJ, Yoon J, Kim BH, Lee J, Jung EU, Lee H. Heat shock protein 90 inhibitor induces apoptosis and attenuates activation of hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2009.

- 166 Weiskirchen R, Gressner AM. Isolation and culture of hepatic stellate cells. *Methods Mol Med* 2005, 117:99-113.
- 167 Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, Mukherjee P, Friedman SL, Eng FJ. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005, 54:142-151.
- 168 Rodriguez LG, Wu X, Guan J. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* 2005, 294:23-29.
- 169 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72:248-254.
- 170 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227:680-685.
- 171 Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981, 112:195-203.
- 172 Barrett AJ. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. *Biochem J* 1980, 187:909-912.
- 173 Klose A, Zigrino P, Denhöfer R, Mauch C, Hunzelmann N. Identification and discrimination of extracellularly active cathepsins B and L in high-invasive melanoma cells. *Anal Biochem* 2006, 353:57-62.
- 174 Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem* 1981, 112:70-75.
- 175 Koop DR. Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Mol Pharmacol* 1986, 29:399-404.
- 176 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162:156-159.
- 177 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, 29:e45.
- 178 Kominami E, Ueno T, Munro D, Katunuma N. The selective role of cathepsins B and D in the lysosomal degradation of endogenous and exogenous proteins. *FEBS Lett* 1991, 287:189-192.
- 179 Towatari T, Nikawa T, Murata M, Yokoo C, Tamai M, Hanada K, Katunuma N. Novel epoxysuccinyl peptides. A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo. *FEBS Lett* 1991, 280:311-315.

- 180 Marciniuszyn JJ, Hartsuck JA, Tang J. Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin. *J Biol Chem* 1976, 251:7088-7094.
- 181 Wang X, Tang X, Gong X, Albanis E, Friedman SL, Mao Z. Regulation of hepatic stellate cell activation and growth by transcription factor myocyte enhancer factor 2. *Gastroenterology* 2004, 127:1174-1188.
- 182 Jane DT, Morvay LC, Allen F, Sloane BF, Dufresne MJ. Selective inhibition of cathepsin B with cell-permeable CA074Me negatively affects L6 rat myoblast differentiation. *Biochem Cell Biol* 2002, 80:457-465.
- 183 Liu C, Gaça MDA, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem* 2003, 278:11721-11728.
- 184 Pungercar JR, Caglic D, Sajid M, Dolinar M, Vasiljeva O, Pozgan U, Turk D, Bogoy M, Turk V, Turk B. Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity. *FEBS J* 2009, 276:660-668.
- 185 Nishimura Y, Kawabata T, Kato K. Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. *Arch Biochem Biophys* 1988, 261:64-71.
- 186 Gentilini A, Romanelli R, Marra F, Gentilini P, Pinzani M. IGF-I is a survival factor for human hepatic stellate cells (HSC): involvement of PI 3-K and C-Akt. *J Hepatol* 2001, 34, Suppl.1:7.
- 187 Reif S, Lang A, Lindquist JN, Yata Y, Gabele E, Scanga A, Brenner DA, Rippe RA. The role of focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-akt signaling in hepatic stellate cell proliferation and type I collagen expression. *J Biol Chem* 2003, 278:8083-8090.
- 188 Pinzani M, Gentilini A, Caligiuri A, De Franco R, Pellegrini G, Milani S, Marra F, Gentilini P. Transforming growth factor-beta 1 regulates platelet-derived growth factor receptor beta subunit in human liver fat-storing cells. *Hepatology* 1995, 21:232-239.
- 189 Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999, 13:2905-2927.
- 190 Okuyama H, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Kristensen DB, Yoshizato K, Uyama N, Yamaoka Y. Regulation of cell growth by redox-mediated extracellular proteolysis of platelet-derived growth factor receptor beta. *J Biol Chem* 2001, 276:28274-28280.
- 191 Lechuga CG, Hernández-Nazara ZH, Hernández E, Bustamante M, Desierto G, Cotty A, Dharker N, Choe M, Rojkind M. PI3K is involved in PDGF-beta receptor

upregulation post-PDGF-BB treatment in mouse HSC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, 291:G1051-61.

192 Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001, 21:311-335.

193 Albouz S, Le Saux F, Wenger D, Hauw JJ, Baumann N. Modifications of sphingomyelin and phosphatidylcholine metabolism by tricyclic antidepressants and phenothiazines. *Life Sci* 1986, 38:357-363.

194 Kölzer M, Werth N, Sandhoff K. Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine. *FEBS Lett* 2004, 559:96-98.

195 Otterbach B, Stoffel W. Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell* 1995, 81:1053-1061.

196 Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006, 6:764-775.

197 Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, Turk D, Turk V, Turk B. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des* 2007, 13:387-403.

198 Yan B, Wang W, Chen L, Bi M, Lu Y, Li B, Yang B. Role of cathepsin B-mediated apoptosis in fulminant hepatic failure in mice. *World J Gastroenterol* 2009, 15:1231-1236.

199 Baskin-Bey ES, Canbay A, Bronk SF, Werneburg N, Guicciardi ME, Nyberg SL, Gores GJ. Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia-warm reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005, 288:G396-402.

200 Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001, 502:4-10.

201 Lemansky P, Hasilik A, von Figura K, Helmy S, Fishman J, Fine RE, Kedersha NL, Rome LH. Lysosomal enzyme precursors in coated vesicles derived from the exocytic and endocytic pathways. *J Cell Biol* 1987, 104:1743-1748.

202 Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, Sloane BF. Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res* 1994, 54:6517-6525.

- 203 Klose A, Wilbrand-Hennes A, Zigrino P, Weber E, Krieg T, Mauch C, Hunzelmann N. Contact of high-invasive, but not low-invasive, melanoma cells to native collagen I induces the release of mature cathepsin B. *Int J Cancer* 2006, 118:2735-2743.
- 204 Garcia M, Derocq D, Pujol P, Rochefort H. Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. *Oncogene* 1990, 5:1809-1814.
- 205 Krueger S, Haeckel C, Buehling F, Roessner A. Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Res* 1999, 59:6010-6014.
- 206 Linebaugh BE, Sameni M, Day NA, Sloane BF, Keppler D. Exocytosis of active cathepsin B enzyme activity at pH 7.0, inhibition and molecular mass. *Eur J Biochem* 1999, 264:100-109.
- 207 Lkhider M, Castino R, Bouguyon E, Isidoro C, Ollivier-Bousquet M. Cathepsin D released by lactating rat mammary epithelial cells is involved in prolactin cleavage under physiological conditions. *J Cell Sci* 2004, 117:5155-5164.
- 208 Leake DS. Does an acidic pH explain why low density lipoprotein is oxidised in atherosclerotic lesions?. *Atherosclerosis* 1997, 129:149-157.
- 209 Montcourrier P, Silver I, Farnoud R, Bird I, Rochefort H. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* 1997, 15:382-392.
- 210 Lemaire R, Huet G, Zerimech F, Grard G, Fontaine C, Duquesnoy B, Flipo RM. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *Br J Rheumatol* 1997, 36:735-743.
- 211 Takashima T, Kawada N, Maeda N, Okuyama H, Uyama N, Seki S, Arakawa T. Pepstatin A attenuates the inhibitory effect of N-acetyl-L-cysteine on proliferation of hepatic myofibroblasts (stellate cells). *Eur J Pharmacol* 2002, 451:265-270.
- 212 Di Sario A, Baroni GS, Bendia E, D'Ambrosio L, Ridolfi F, Marileo JR, Jezequel AM, Benedetti A. Characterization of ion transport mechanisms regulating intracellular pH in hepatic stellate cells. *Am J Physiol* 1997, 273:G39-48.
- 213 Di Sario A, Svegliati Baroni G, Bendia E, Ridolfi F, Saccomanno S, Ugili L, Trozzi L, Marzioni M, Jezequel AM, Macarri G, Benedetti A. Intracellular pH regulation and Na⁺/H⁺ exchange activity in human hepatic stellate cells: effect of platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor 1 and insulin. *J Hepatol* 2001, 34:378-385.

- 214 Heuser J. Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. *J Cell Biol* 1989, 108:855-864.
- 215 Tapper H, Sundler R. Role of lysosomal and cytosolic pH in the regulation of macrophage lysosomal enzyme secretion. *Biochem J* 1990, 272:407-414.
- 216 Sundler R. Lysosomal and cytosolic pH as regulators of exocytosis in mouse macrophages. *Acta Physiol Scand* 1997, 161:553-556.
- 217 Walls KC, Klocke BJ, Saftig P, Shibata M, Uchiyama Y, Roth KA, Shacka JJ. Altered regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in cathepsin D-deficient brain. *Autophagy* 2007, 3:222-229.
- 218 Vasiljeva O, Korovin M, Gajda M, Brodoefel H, Bojic L, Krüger A, Schurigt U, Sevenich L, Turk B, Peters C, Reinheckel T. Reduced tumour cell proliferation and delayed development of high-grade mammary carcinomas in cathepsin B-deficient mice. *Oncogene* 2008, 27:4191-4199.
- 219 Paris F, Grassmé H, Cremesti A, Zager J, Fong Y, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Gulbins E, Kolesnick R. Natural ceramide reverses Fas resistance of acid sphingomyelinase(-/-) hepatocytes. *J Biol Chem* 2001, 276:8297-8305.
- 220 Lozano J, Menendez S, Morales A, Ehleiter D, Liao WC, Wagman R, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. Cell autonomous apoptosis defects in acid sphingomyelinase knockout fibroblasts. *J Biol Chem* 2001, 276:442-448.
- 221 Huls M, Brown CDA, Windass AS, Sayer R, van den Heuvel JJMW, Heemskerk S, Russel FGM, Masereeuw R. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Kidney Int* 2008, 73:220-225.
- 222 She P, Burgess SC, Shiota M, Flakoll P, Donahue EP, Malloy CR, Sherry AD, Magnuson MA. Mechanisms by which liver-specific PEPCK knockout mice preserve euglycemia during starvation. *Diabetes* 2003, 52:1649-1654.

◦◦● 8. Annex

Part dels resultats derivats de la present tesi han estat utilitzats per al següent article:

Moles A, Tarrats N, Fernández-Checa JC, Marí M. Cathepsins B and D drive hepatic stellate cell proliferation and promote their fibrogenic potential. *Hepatology* 2009, 49 (4):1297-307.

Cathepsins B and D Drive Hepatic Stellate Cell Proliferation and Promote Their Fibrogenic Potential

Anna Moles, Núria Tarrats, José C. Fernández-Checa,* and Montserrat Mari*

Cathepsins have been best characterized in tumorigenesis and cell death and implicated in liver fibrosis; however, whether cathepsins directly regulate hepatic stellate cell (HSC) activation and proliferation, hence modulating their fibrogenic potential, is largely unknown. Here, we show that expression of cathepsin B (CtsB) and cathepsin D (CtsD) is negligible in quiescent HSCs but parallels the increase of α -smooth muscle actin and transforming growth factor- β during *in vitro* mouse HSC activation. Both cathepsins are necessary for HSC transdifferentiation into myofibroblasts, because their silencing or inhibition decreased HSC proliferation and the expression of phenotypic markers of HSC activation, with similar results observed with the human HSC cell line LX2. CtsB inhibition blunted AKT phosphorylation in activated HSCs in response to platelet-derived growth factor. Moreover, during *in vivo* liver fibrogenesis caused by CCl₄ administration, CtsB expression increased in HSCs but not in hepatocytes, and its inactivation mitigated CCl₄-induced inflammation, HSC activation, and collagen deposition. **Conclusion:** These findings support a critical role for cathepsins in HSC activation, suggesting that the antagonism of cathepsins in HSCs may be of relevance for the treatment of liver fibrosis. (HEPATOLOGY 2009;49:1297-1307.)

Liver fibrosis represents the final common pathological outcome of many chronic liver insults, and is a major medical problem.^{1,2} Despite recent advances in the understanding of the activation of hepatic stellate cells (HSCs) and their role in liver fibrogenesis, relatively little is known about the molecular mechanisms that regulate these processes.

As in other tissues, the fibrotic component of the liver's wound-healing response is mediated by myofibroblasts. In the injured liver, myofibroblasts are potentially derived from a number of cellular sources, including activated HSC, which constitute a predominant reservoir for myofibroblasts.¹⁻⁴ HSCs are responsible for extensive synthesis and deposition of extracellular matrix (ECM) during liver fibrosis. Upon liver injury, HSCs undergo a phenotypic transformation from nonproliferating, retinoid-storing cells, to a proliferating, matrix-producing phenotype.¹⁻⁶ HSC activation occurs in a two-step process: the initiation phase is characterized by loss of retinoids and up-regulation of cytoskeletal protein expression such as α -smooth muscle actin (α -SMA) and desmin, and the perpetuation phase is where the ensuing myofibroblasts not only produce almost all of the ECM but also a broad array of cytokines and chemokines that amplify HSC activation via autocrine stimulation.^{1,6} To date, treatment for advanced liver fibrosis and cirrhosis is inefficient, and the development of successful antifibrotic therapies is imperative.

The cathepsin family comprises the catalytic serine (cathepsin G), aspartate (cathepsins D and E), and cysteine (cathepsins B, C, H, F, K, L, O, S, V, and W) peptidases that exhibit endopeptidase or exopeptidase activities.^{7,8} Apart from their known role in protein turnover, recent data have revealed that cathepsins can also regulate multiple processes including neovascularization of endothe-

Abbreviations: BDL, bile duct ligation; CtsB, cathepsin B; CtsD, cathepsin D; ECM, extracellular matrix; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HSC, hepatic stellate cell; PDGF, platelet-derived growth factor; PDGFR, PDGF- β receptor.

From the Liver Unit, and Centro de Investigaciones Biomédicas Esther Koplowitz, Hospital Clínic and Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), and Department of Cell Death and Proliferation, Instituto Investigaciones Biomédicas de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain.

Received September 9, 2008; accepted November 18, 2008.

*These authors share senior authorship.

The work was supported by CIBEREHD and grant PI070193 (Instituto de Salud Carlos III); by grant SAF2006-06780 (Plan Nacional de I+D), Spain; and by grant P50-AA-11999 (Research Center for Liver and Pancreatic Diseases, U.S. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism).

Address reprint requests to: Montserrat Mari, (monmari@clinic.ub.es) and José C. Fernández-Checa (checa229@yahoo.com), Liver Unit, Hospital Clínic, C/Vil·larroel 170, 08036-Barcelona, Spain. E-mail: monmari@clinic.ub.es; fax: (34) 93-4515272.

Copyright © 2008 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.22753

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

lial progenitor cells,⁹ antigen presentation,¹⁰ cell growth, and tissue homeostasis.¹¹⁻¹³ Moreover, cathepsins also have important functions outside lysosomes. For example, execution of programmed cell death, degradation of ECM components, or induction of invasive cell growth have been described when cathepsins are released into the cytosol or secreted in the extracellular space.¹⁴⁻¹⁸ Consistent with these functions, and because ECM degradation is a hallmark of tumorigenesis, aspartic protease cathepsin D (CtsD) and the cysteine cathepsin B (CtsB) have been implicated in cancer progression, invasion, and metastasis.^{7,14,19-21}

In addition, cathepsins have also been involved in liver injury and fibrogenesis. For instance, cathepsin T and CtsD activation has been observed in experimental fibrogenesis,²² and previous studies reported high levels of CtsB, CtsD, and CtsL in serum of patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma.²³⁻²⁵ Moreover, using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, Kristensen et al. reported the up-regulation of a number of proteins, including CtsD, during the activation of rat HSCs and liver fibrogenesis,²⁶ whose expression correlated with platelet-derived growth factor (PDGF) receptor β levels during HSC activation.²⁷ Finally, Canbay et al. described a lysosomal pathway of hepatocellular apoptosis and liver injury following bile duct ligation (BDL) in mice, in which CtsB played a key role, suggesting that CtsB-mediated hepatocellular apoptosis contributed to inflammation and fibrogenesis.²⁸ However, despite these investigations whether cathepsins (CtsB or CtsD) directly regulate HSC activation and proliferation, or if modulation of cathepsins expression in HSCs affects their fibrogenic potential has not been specifically addressed.

Thus, our aim was to examine the contribution of CtsB and CtsD in the activation of mouse HSCs *in vitro* and in the development of fibrosis *in vivo* following CCl₄ treatment. We show that the levels of CtsB and CtsD are negligible in quiescent HSCs but increase in parallel with the up-regulation of α -SMA and transforming growth factor- β (TGF- β) during HSC transdifferentiation into myofibroblasts. Genetic silencing or pharmacological inhibition of cathepsins mitigate HSC activation and hence progression of liver fibrogenesis.

Materials and Methods

Isolation and Culture of Hepatic Stellate Cells. C57BL/6 mice (8-12 weeks old) were from Charles River Laboratories. All animals received humane care according to the criteria outlined in the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". HSCs were isolated from C57BL/6 mice by perfusion with collagenase-pronase as

described²⁹ with small modifications. HSCs were separated from parenchymal cells by 60g centrifugation, and the supernatant was collected for centrifugation at 450g for 10 minutes. Pellet or nonparenchymal cells were re-suspended and purified over a 17.2% Hystodenz density gradient by centrifugation. The cloudy strip was collected and the HSCs were cleaned with Krebs-Henseleit buffer by centrifugation of 450g for 10 minutes. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium complemented with 10% fetal bovine serum, and antibiotics at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Culture purity was assessed by retinoid autofluorescence. Mouse HSCs were not passaged and were used from day 2 to day 10.

In Vivo Liver Fibrogenesis. C57BL/6 mice were treated with CCl₄ at a dose of 5 μ L (10% CCl₄ in corn oil)/g body weight, by intraperitoneal injection for 6 weeks twice a week. One hour before treatment with CCl₄, and during the last 4 weeks, mice received either CtsB inhibitor (Ca074Me) or vehicle. Stock solutions of Ca074Me were made at a concentration of 10 mg/mL in dimethyl sulfoxide. The stock was diluted 1:10 in saline and administered at 10 mg/kg body weight by intraperitoneal injection. Control animals received vehicle alone.

CtsB and CtsD Activities. CtsB activity was assayed fluorimetrically with Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride (60 μ mol/L) at pH 7.4 and 37°C as previously described.³⁰ Briefly, the assay buffer employed contained 20 mmol/L 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid (HEPES; pH 7.4), 5% sucrose, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 2 mmol/L ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 5 mmol/L dithiothreitol, and 2 mmol/L cysteine. The fluorimetric assay (excitation wavelength: 360 nm; emission wavelength: 460 nm) was performed in 96-well plates using 20 μ g of protein per sample. Similarly, CtsD activity was determined fluorimetrically (λ_{ex} : 400 nm; λ_{em} : 505 nm) using the specific substrate N-acetyl-Arg-Gly-Phe-Phe-Pro-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin (60 μ mol/L) at pH 7.4 and 37°C. The assay buffer contained 20 mM HEPES (pH 7.4), 5% sucrose, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 2 mM EDTA, and 5 mM dithiothreitol. Results were expressed as cathepsin activity (slope of fluorescence emission after 40 minutes) per milligram of protein.

In Vitro Small Interfering RNA Transfection. To silence CtsB and CtsD expression, specific pre-designed small interfering RNAs (siRNAs) for mouse were used for transfection using Lipofectamine LTX and PLUS following the manufacturer instructions. Briefly, 100 nmol/L siRNA, 5 μ L of PLUS, and 200 μ L of Optimem were

mixed for 15 minutes at room temperature. Lipofectamine LTX (6 μ L) was added afterward, and the mixture was transferred to a six-well plate after 25 minutes. In some cases, cells were transfected with both siRNA against CtsB and CtsD, evaluating the expression of α -SMA, TGF- β , and 2',5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS1). Cells were assayed usually 48 hours after siRNA transfection.

[³H]Thymidine Incorporation. Proliferation was estimated as the amount of [³H]thymidine incorporated into trichloroacetic acid (TCA)-precipitable material. HSCs were cultured in a six-well plate, and transfected at day 5. [³H]Thymidine (1 μ Ci/mL) was added at 12, 24, and 48 hours after transfection and incubated for 24 hours. The reaction was stopped by addition of 2 mL cold TCA (5%). After two rinses with cold TCA (5%), the radioactivity incorporated into TCA-insoluble material was recovered with 2.5 mL of 0.5 N NaOH and counted by liquid scintillation counting.

Statistical Analyses. All images display representative data from at least three independent observations. Statistical analyses were performed using Microsoft Excel software. The experiments were repeated at least three times. The statistical significance of differences was performed using the unpaired, nonparametric Student *t* test.

Reagents, Antibodies, and Methods. See Supporting Methods.

Results

CtsB and CtsD Expression During Mouse HSC Activation. Because the culture of HSCs is known to induce its transdifferentiation into a myofibroblast-like phenotype, fresh mouse primary HSCs were isolated to analyze CtsB and CtsD expression at different time points during culture. As shown in Fig. 1A, the expression of CtsB and CtsD was almost negligible in quiescent HSCs (day 2); however, their levels markedly increased during the time of culture with a maximum expression of both cathepsins seen at days 7-10; moreover, its increase over time paralleled the appearance of α -SMA (Fig. 1A), an indicator of the phenotypic transformation of HSCs into myofibroblasts. The higher protein expression observed in Fig. 1A was accompanied by increased functional activity of both cathepsins (Fig. 1B). More important, conditioned media from overnight cultures of 7-day-old HSCs revealed the presence of CtsB and CtsD in the extracellular media (Fig. 1C). This is consistent with the study by Kristensen et al., which reported the presence of CtsD in the extracellular media from activated rat HSC cultures.²⁶ There is a molecular weight shift in the extracellular media for both cathepsins compared to the form

present in cellular lysates (Fig. 1C). In the case of the secreted form of CtsB, the molecular weight is 25 kDa, derived from the processing of the 30 kDa intracellular active form.³¹ Unexpectedly, the molecular weight of the secreted form of CtsD is approximately 28 kDa, smaller than the intracellular 32 kDa double-chain of mature CtsD form, which has not been described previously to the best of our knowledge. Moreover, both CtsB and CtsD were localized in lysosomes, as shown by confocal imaging of 7-day-old HSCs double-stained with a lysosomal marker, and anti-CtsB or anti-CtsD antibodies (Fig. 1D). In addition, both cathepsins colocalized with each other in a punctate pattern (Fig. 1E), and colocalized also with Rab5A and Rab7, early and late endosome markers, respectively, indicating that these enzymes follow the secretory pathway for its secretion to the extracellular media (Fig. 1F).

CtsB and CtsD Silencing Down-Regulates Mouse HSC Proliferation and Expression of Fibrogenic Genes. We next examined the contribution of CtsB and CtsD on HSC activation following CtsB/CtsD silencing via siRNAs. To this end, 5-day-old HSCs were transfected with control, CtsB, and/or CtsD siRNA. The targeting of CtsB and CtsD by siRNAs reduced their protein levels by more than 80% in both cell lysates and extracellular media (Fig. 2A). Silencing of either CtsB or CtsD resulted in decreased cell proliferation (Fig. 2B), compared to HSCs transfected with control siRNA, with a more prominent effect observed for CtsD than CtsB. Simultaneous blocking of both cathepsins resulted in a synergic potentiation of the inhibitory effect on proliferation (Fig. 2B). Moreover, down-regulation of CtsB and/or CtsD also affected the levels of phenotypic markers of HSC activation, such as α -SMA and TGF- β , as soon as 24 hours after transfection, without affecting the interferon-responsive gene OAS1,³² indicating that siRNA transfection did not induce interferon response (Fig. 2C). As a positive control of interferon-response, we used lipopolysaccharide (1 μ g/mL, 24 hours) resulting in a six-fold to seven-fold increase in OAS1 messenger RNA (mRNA) (not shown). In addition, we observed a dramatic loss of HSC migration, examined by a wound-healing assay, in cells depleted of CtsB but not of CtsD, indicating a possible role of CtsB in the regulation of migration (Fig. 2D). We also examined the effect of pharmacological inhibition of CtsB on HSC activation. Parallel to the effect observed after silencing CtsB, its inhibition by Ca074Me, a potent and specific CtsB inhibitor (Fig. 2E),³³ resulted in the down-regulation of α -SMA and TGF- β mRNA both at the level of mRNA and protein (Fig. 2F).

Role of CtsB and CtsD in the Human HSC Cell Line LX2. To examine the relevance of the preceding

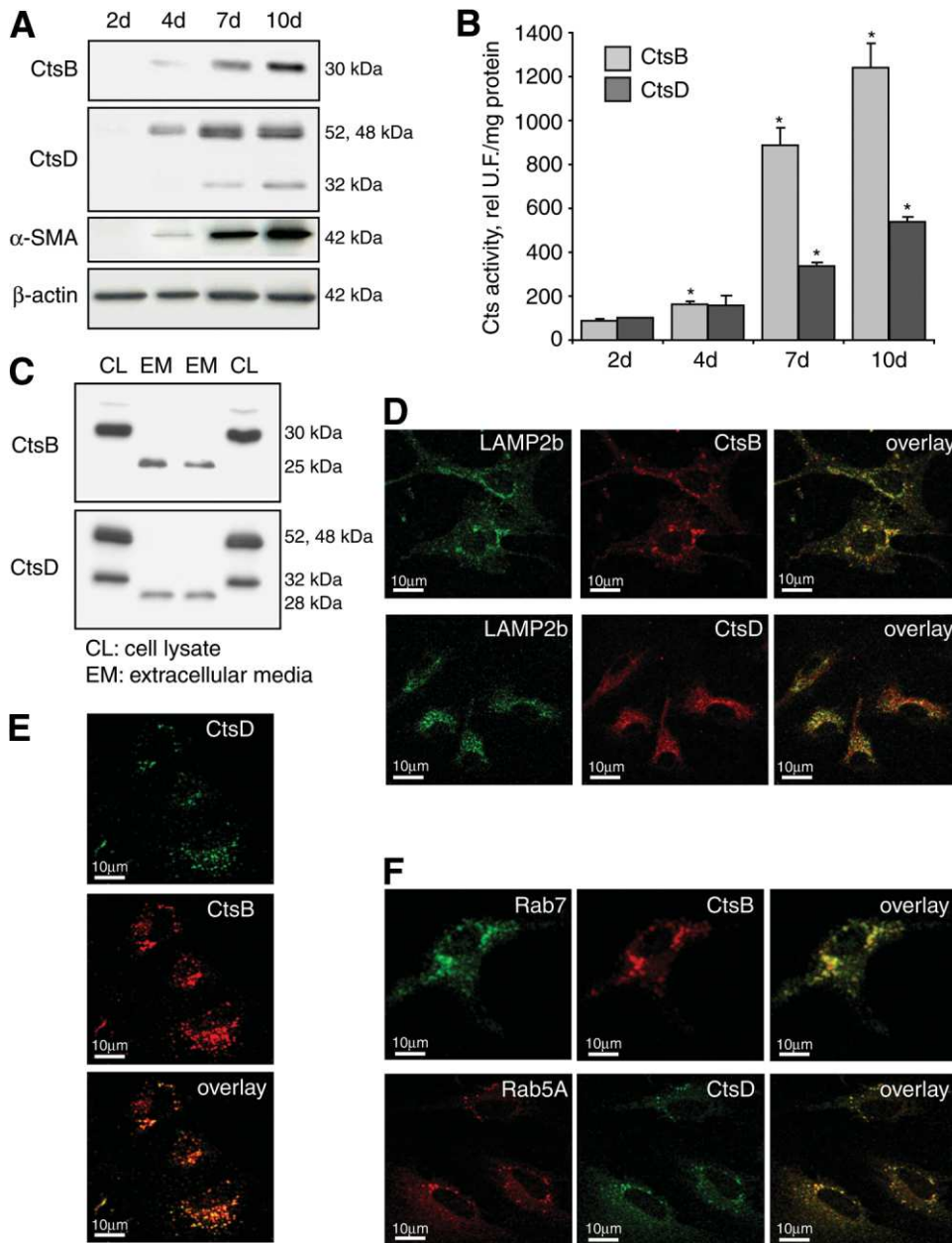


Fig. 1. Mouse HSCs express CtsB and CtsD. (A) Time-course of CtsB, CtsD, and α -SMA protein expression by western blot. (B) CtsB and CtsD activity. (C) CtsB and CtsD present in the extracellular media (EM) differ from the intracellular form (CL). Western blot displaying two representative experiments (experiment #1: lane 1-2; experiment #2: lane 3-4). (D-F) Confocal imaging of 7-day-old HSCs displaying (D) CtsB, CtsD, with a lysosomal marker (LAMP2b), (E) among themselves, and (F) with early (Rab5A) or late (Rab11) endosome markers. Data are means \pm standard deviation (SD), $n = 4$ and $*P \leq 0.05$ versus day 2 HSCs. Scale bar 10 μ m (D-F).

findings in human fibrogenesis, we next examined the expression of CtsB and CtsD in LX2 cells, an immortalized human HSC cell line similar to human activated HSCs.³⁴ As seen, LX2 exhibited the presence of both CtsB and CtsD, not only in the cellular lysates, but also in the extracellular media (Fig. 3A,B). In addition, CtsB activity in LX2 cells was similar to that of 10-day-old mouse HSC cultures (Fig. 3C). Silencing of CtsB by siRNA transfection or its inhibition using Ca074Me was observed to down-regulate α -SMA mRNA and protein levels in LX2 cells (Fig. 3D,E), whereas this effect was not observed upon CtsD silencing (not shown). However, reduction of CtsB and/or CtsD levels by siRNA decreased cell proliferation, compared to control siRNA-transfected

LX2 cells (Fig. 3F). In contrast, CtsB inhibition by Ca074Me did not affect the expression of TGF- β mRNA in LX2 cells, nor their migration in a wound-healing assay (not shown), probably reflecting the fact that TGF- β regulation and migration in fully activated LX2 cells may be different compared to primary HSCs, which models the initial phase of the transdifferentiation process.^{35,36}

Processing of CtsB and CtsD in Mouse HSCs.

Cathepsins are synthesized as inactive precursors, which are then processed either autocatalytically or by other enzymes to remove an N-terminal propeptide.³⁷ For instance, in mouse fibroblasts, CtsD processing has been shown to require the function of cysteine cathepsins, such as CtsB, to generate a mature CtsD form.³⁸ Conversely,

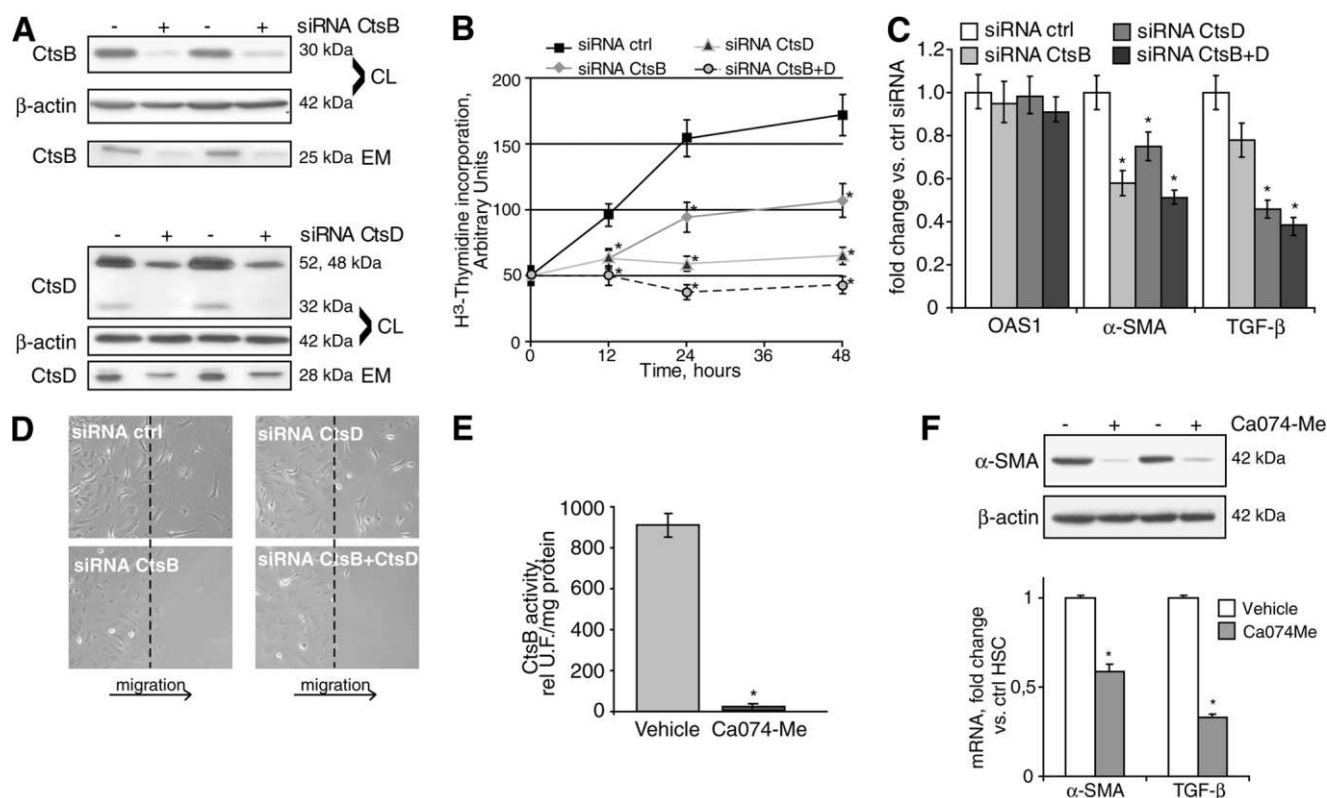


Fig. 2. CtsB or CtsD silencing weakens HSC activation. (A) CtsB and CtsD expression, (B) proliferation, (C) OAS1, α -SMA and TGF- β mRNA expression, and (D) migration after CtsB and/or CtsD silencing for 48 hours in 5-day-old HSCs. CtsB activity (E) and α -SMA protein, and α -SMA and TGF- β mRNA expression (F) after Ca074Me challenge (10 μ mol/L) for 48 hours in 5-day-old HSCs. Data are mean \pm SD, in (B) and (C), $n = 3$ and $*P \leq 0.05$ versus siRNA Ctrl transfected HSCs; in (E) and (F), $n = 3$ and $*P < 0.001$ versus vehicle-treated HSCs.

CtsD has been shown to process CtsB precursor by the cleavage of the procathepsin polypeptide.³⁹ Thus, we examined the effect of CtsB/CtsD inhibition or silencing on their reciprocal processing in primary mouse HSCs. As seen, CtsB inhibition by Ca074Me increased the CtsD precursor proform (52 and 48 kDa), while decreasing the mature form (32 kDa) (Fig. 4A). Similarly, after CtsD inhibition by pepstatin A, an aspartyl protease inhibitor that blocks CtsD activity among other proteases,⁴⁰ we observed the down-regulation of the CtsB mature form (30 kDa) (Fig. 4B). Comparable results were obtained after silencing CtsB (Fig. 4C) and CtsD (Fig. 4D) by siRNAs. Altogether, these results imply that CtsB and CtsD contribute to their mutual proteolytic processing in primary mouse HSCs.

CtsB Modulates the Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Pathway in Activated Mouse HSCs. PDGF- β receptor (PDGF β R) plays a key role in the transformation of HSCs into myofibroblasts and has been suggested as a putative target of cathepsins in activated HSCs.^{27,41} Thus, to investigate if CtsB and CtsD modulate the expression of PDGF β R, we first examined their levels as a function of the activation of HSCs from day 2 to day 10 in culture, and the effect of CtsB or CtsD inhibition on

PDGF β R degradation after PDGF challenge. As observed (Fig. 5A), PDGF β R increased its expression during the activation of mouse HSCs, in parallel to the expression observed for CtsB and CtsD (Fig. 1A). Pharmacological inhibition of CtsB or CtsD did not affect the degradation of PDGF β R induced by its ligand PDGF (Fig. 5B). However, although PDGF elicited a rapid phosphorylation of AKT, observed 15 minutes after PDGF challenge in activated HSCs, this process was markedly reduced in HSC cultures supplemented with the CtsB inhibitor Ca074Me (Fig. 5C). Moreover, CtsD inhibition by pepstatin A did not affect the phosphorylation of AKT induced by PDGF (Fig. 5C). Similar effects were observed after inhibition of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT pathway by LY294002, which blocked AKT phosphorylation by PDGF (Fig. 5D) and decreased HSC proliferation following PDGF challenge (Fig. 5E). Overall, these findings suggest that CtsB regulates the mitogenic potential of HSCs via modulation of AKT in response to PDGF.

CtsB Overexpression in CCl₄-Treated Mice. Because the preceding findings suggested a critical role of CtsB and CtsD in the activation of mouse primary HSCs, we next examined their expression during in vivo liver

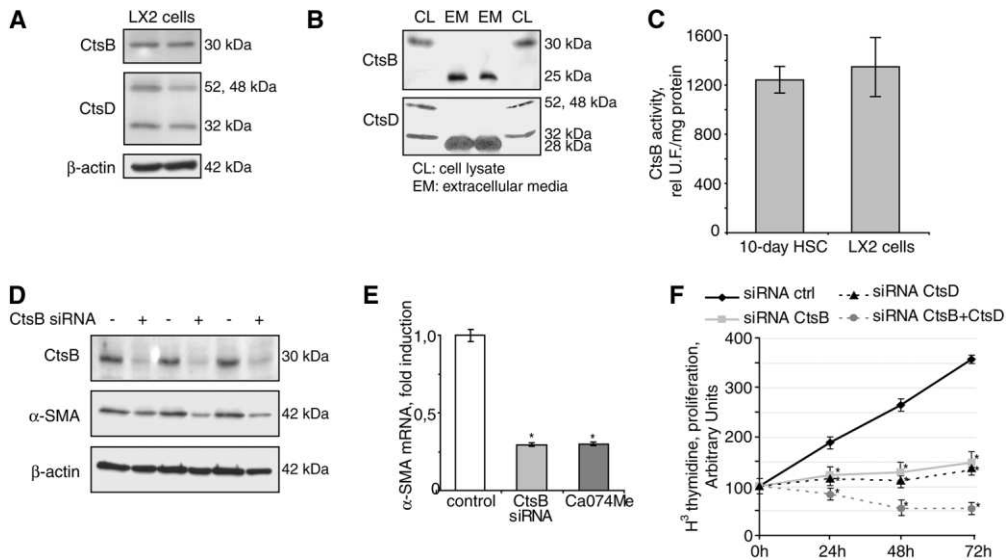


Fig. 3. CtsB and CtsD in LX2 cells. (A) CtsB and CtsD expression by western blot in LX2 cells, and (B) its presence in the extracellular media. In (B), the western blot displays two representative experiments (experiment #1: lane 1-2; experiment #2: lane 3-4). (C) CtsB activity in LX2 cells and 10-day-old HSCs. (D) α -SMA protein and (E) mRNA expression after CtsB silencing for 48 hours. (F) Proliferation after CtsB and/or CtsD silencing. Data are mean \pm SD, in (D), $n = 3$ and $*P \leq 0.001$ versus control HSC; in (E), $n = 3$ and $*P \leq 0.05$ versus siRNA control-transfected LX2 cells.

fibrogenesis induced by CCl_4 , a well-established model of liver injury. Immunohistochemical staining of liver sections displayed an intense staining of CtsB only in CCl_4 -treated mice that colocalized with glial fibrillary acidic protein (GFAP), an HSC marker⁴² (Fig. 6A). In contrast, CtsD staining of liver sections exhibited a more diffuse pattern similar in control and CCl_4 -treated livers that partially colocalized with GFAP (Fig. 6B). Because these findings suggested that the increased expression of CtsB during liver fibrogenesis is restricted to HSCs and because this particular cathepsin has been involved in tumor necrosis factor-mediated and cholestasis-mediated hepatocellular injury, and free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity in HepG2 cells,^{28,43,44} we examined the activity of CtsB and CtsD in CCl_4 -treated liver in comparison with that of 2-day-old and 10-day-old mouse HSC cul-

tures. Whereas CtsD activity was similar in the liver of control or CCl_4 -treated mice, and in 10-day-old HSC cultures, the activity of CtsB was very low in mouse liver, regardless of CCl_4 treatment, compared to the activity observed in 10-day-old HSCs (Fig. 6C). Similar results were observed when analyzing CtsB and CtsD protein levels (Fig. 6D), confirming the immunohistochemical findings (Fig. 6A,B). Thus, these results indicate that CtsB and CtsD are differentially expressed in HSCs and hepatocytes during CCl_4 -induced liver fibrogenesis, and that CtsB up-regulation is limited to HSCs in CCl_4 -treated mice.

CtsB Inhibition Mitigates CCl_4 -Mediated Liver Fibrogenesis. Given the above findings, we next asked whether CtsB inhibition could be of relevance in reversing liver fibrogenesis in vivo following CCl_4 administra-

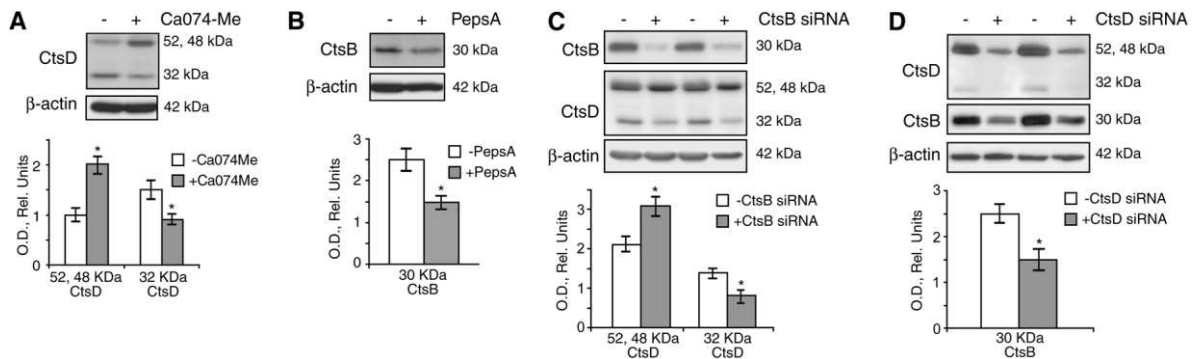


Fig. 4. CtsB and CtsD processing in HSCs. (A) Inhibition of CtsB in 5-day-old HSCs with Ca074Me (10 μ mol/L) for 24 hours affects CtsD processing. (B) Similarly, CtsD inhibition, with pepstatin A (10 μ g/mL) for 24 hours, resulted in less CtsB active form. (C,D) Parallel results were observed after CtsB or CtsD silencing. Data are mean \pm SD, $*P \leq 0.05$ versus untreated HSCs.

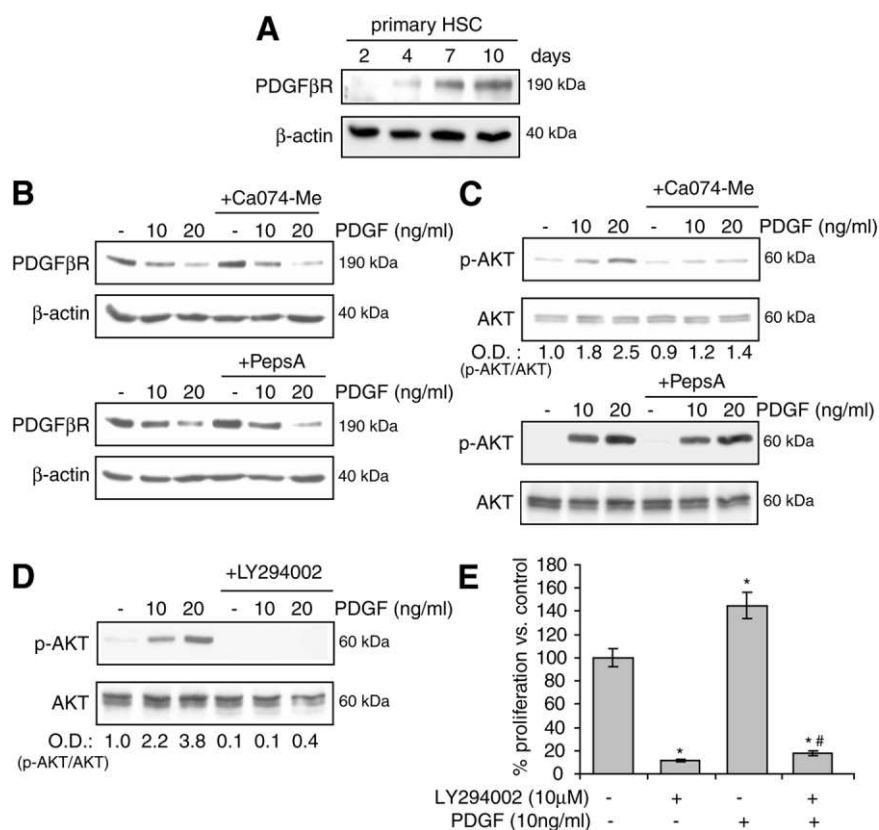


Fig. 5. PI3K/AKT activation after CtsB inhibition *in vitro*. (A) PDGFβR levels during mouse HSC activation from day 2 to day 10. (B) Effect of CtsB (Ca074Me 10 μmol/L, 24 hours) or CtsD (pepstatin A 10 μg/mL, 24 hours) inhibition on PDGFβR degradation after challenge with PDGF (60 minutes), and (C) on AKT phosphorylation after PDGF challenge (15 minutes). (D,E) Effect of the PI3K inhibitor LY294002 (10 μmol/L, 60 minute preincubation) on the phosphorylation of AKT by PDGF (15 minutes) (D), and on the proliferation for 24 hours (E). Data are mean ± SD, in (D), n = 3 and *P ≤ 0.05 versus control HSCs; #P ≤ 0.01 versus PDGF-treated HSCs.

tion. In order to stimulate HSC activation before inhibiting CtsB, CCl₄ was administered twice a week for 2 weeks, followed by CCl₄ and Ca074Me administration for 4 additional weeks (Fig. 7A). CtsB inhibition by itself did not alter any of the parameters studied in control animals (Fig. 7). The CCl₄ challenge for 6 weeks increased serum alanine aminotransferase compared to control or vehicle levels, which was not significantly altered after CtsB inhibition by Ca074Me (Fig. 7B). Hematoxylin & eosin staining of liver sections (Fig. 7C) displayed ECM accumulation and sinusoidal dilatation in CCl₄-treated mice, which were decreased after treatment with Ca074Me. These therapeutic effects were not due to impaired metabolism of CCl₄ in Ca074Me-treated animals because microsomal cytochrome P450 2E1 activity was comparable in both CCl₄-treated groups irrespectively of the presence of the inhibitor (not shown). However, CtsB inhibition in CCl₄-treated mice resulted in a more preserved architecture of liver parenchyma with less fibrosis. Moreover, as shown in Fig. 7D, determination of the hydroxyproline content in the liver revealed a significant decrease in collagen accumulation in CCl₄-treated mice that received Ca074Me, compared to mice challenged with CCl₄ alone. This result was further confirmed by the increased detection of collagen fibers by Sirius Red staining (Fig. 7E) in CCl₄-treated animals compared to those treated with CtsB inhibitor. In addition, CtsB inhibition in

CCl₄-treated animals decreased α-SMA-positive staining of liver sections, accompanied by almost negligible neutrophilic infiltration as determined by myeloperoxidase staining (Fig. 7F). Thus, these findings indicate that whereas the function of CtsB in CCl₄-induced hepatocellular damage is negligible, CtsB plays a critical role in *in vivo* liver fibrogenesis.

Discussion

Cathepsins are lysosomal proteases that have been mainly involved and best characterized in tumorigenesis and metastasis due to extensive ECM remodeling and in the regulation of cell death pathways.^{18,21,45,46} Although cathepsins have been implicated in liver fibrogenesis as well,²²⁻²⁵ their role in the regulation of HSC biology and their fibrogenic potential is largely unknown. This report provides evidence for a critical role of cathepsins, particularly CtsB and CtsD, in HSC activation and proliferation, modulating their transdifferentiation into a myofibroblast-like phenotype that ultimately controls liver fibrogenesis.

We show that CtsB and CtsD expression increase during *in vitro* mouse HSC activation and that this up-regulation occurs largely in lysosomes, although a significant fraction is secreted in the extracellular media. The colocalization of cathepsins with markers of early and late endosomes indicates that the release of lysosomal cathep-

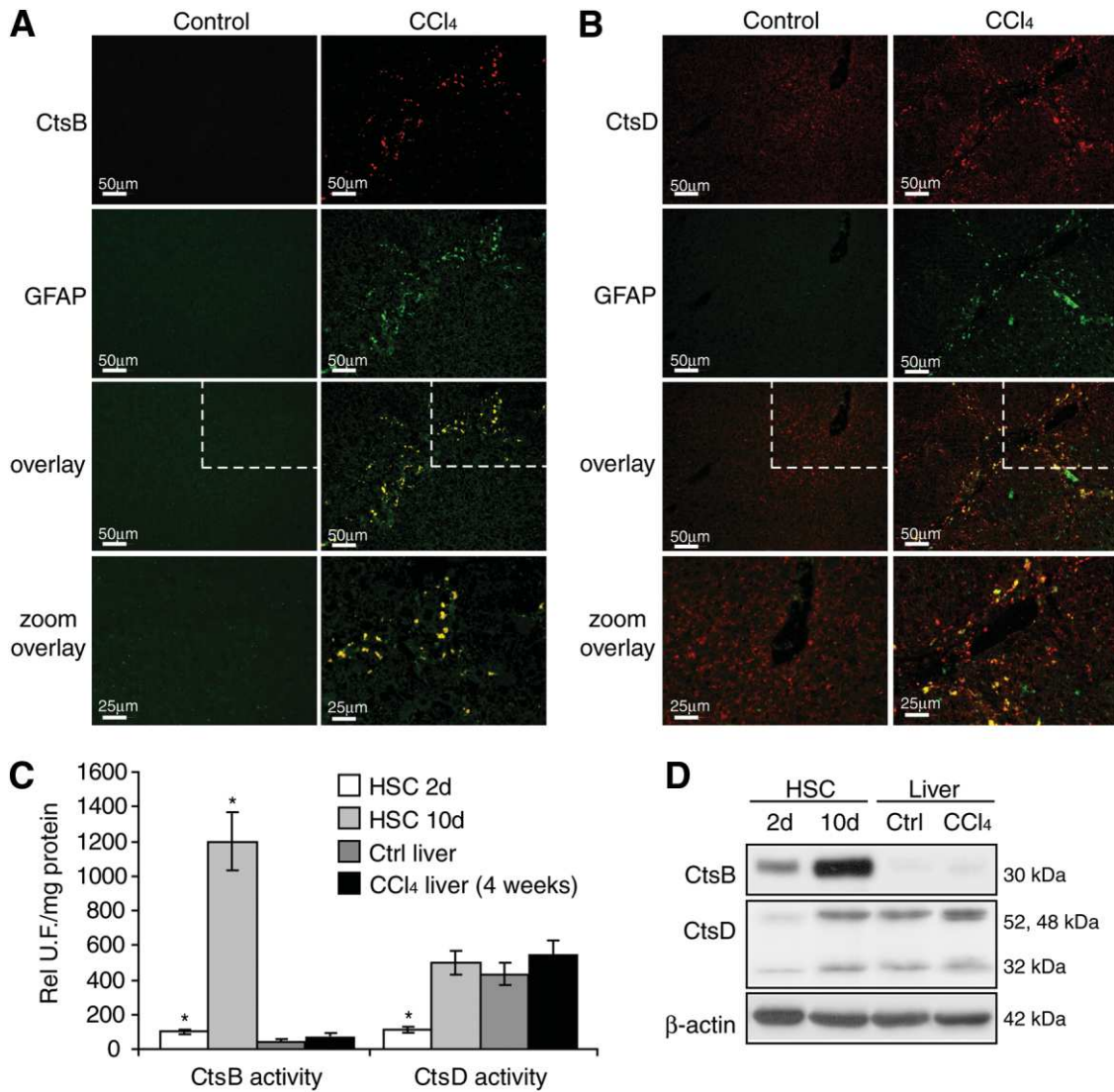


Fig. 6. CtsB and CtsD expression in experimental fibrosis *in vivo*. (A,B) Immunofluorescence imaging of CtsB (A) or CtsD (B) and GFAP in control liver and liver sections treated for 4 weeks with CCl₄. The lower panel of (A) and (B) displays a magnification of the upper-right section indicated by the dashed line (C,D) CtsB and CtsD activity (C) or protein expression (D) in day 2 and day 10 HSCs, and control livers and livers treated for 4 weeks with CCl₄. Data are mean \pm SD, in (C), $n = 3$ and $*P \leq 0.01$ versus control liver. Scale bars: 50 μm in all panels, except in the lower panels (25 μm).

sins follows the secretory pathway to potentially modulate ECM components and plasma membrane HSC receptors.

Previous studies reported that secreted CtsB contributed to the degradation of PDGF β R,⁴¹ suggesting that the inability of PDGF to induce HSC proliferation in quiescent HSCs was due to the degradation of PDGF β R. However, our findings portray a different scenario according to which CtsB would directly modulate HSC proliferation by a novel mechanism. Genetic and pharmacological antagonism of CtsB prevents the proliferation of either activated murine HSCs or the immortalized human LX2 cells. However, rather than regulating the degradation of PDGF β R in response to its ligand PDGF, we

observed that the inhibition of CtsB impairs the phosphorylation of AKT by PDGF. Thus, these findings suggest that CtsB positively regulates the PI3K/AKT pathway in response to PDGF. The exact mechanism or intermediate proteins responsible for the decreased activation of AKT observed in the absence of CtsB activity *in vitro* after PDGF challenge is of utmost importance and merits further investigation.

In addition to preventing HSC proliferation, down-regulation of CtsB and CtsD negatively regulates the expression of phenotypic markers of HSC activation such as α -SMA and TGF- β . These findings indicate that cysteine and aspartyl cathepsins directly modulate the early trans-differentiation and perpetuation phase of HSC activa-

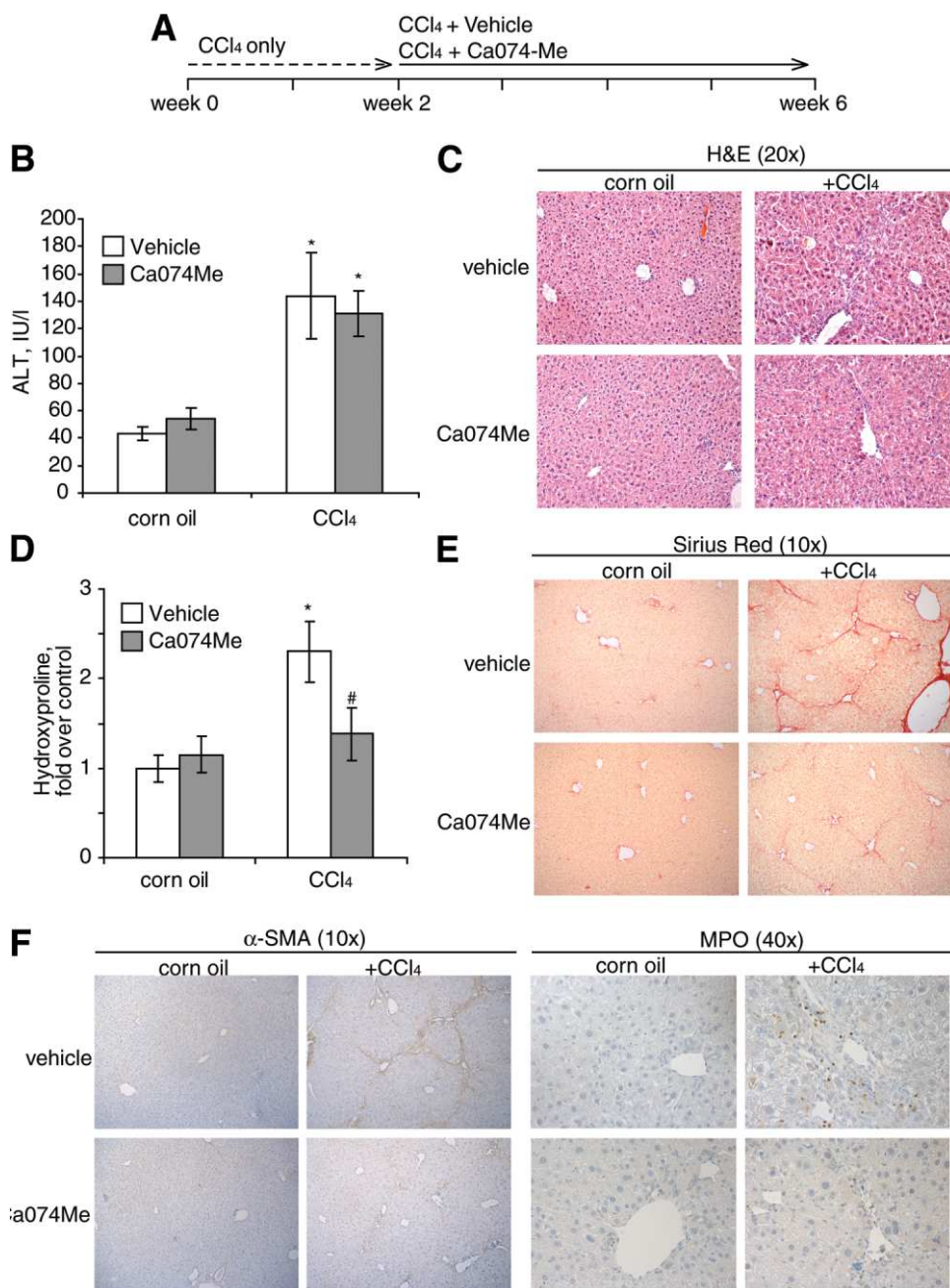


Fig. 7. CtsB inhibition in CCl₄-treated mice. (A) Experimental setup of CCl₄ and Ca074Me administration to mice. (B-F) At 6 weeks after initial CCl₄ challenge, we determined (B) serum alanine aminotransferase levels, (C) hematoxylin & eosin staining of liver sections, (D) hydroxyproline levels in liver homogenate, (E) Sirius Red staining of liver sections, and (F) immunostaining with α -SMA and myeloperoxidase (MPO) to evaluate neutrophilic infiltration in the different groups. Data are mean \pm standard error of the mean, in (B), $n = 5$ animals per group and $*P \leq 0.01$ versus corn oil-treated mice; in (D), $n = 5$ animals per group and $*P \leq 0.01$ versus corn oil-treated mice, and $\#P \leq 0.05$ versus CCl₄+vehicle-treated mice.

tion, critical steps for the regulation of their fibrogenic potential and hence liver fibrogenesis. However, whereas we also observed a decrease in TGF- β expression in primary mouse HSCs, TGF- β mRNA levels did not change in LX2 cells, probably reflecting that these cells are more differentiated than 5-day-old mouse HSCs and that the regulation of TGF- β at this stage of differentiation may be different, as suggested by others.^{35,36}

An important finding of this study is the description of active CtsB and CtsD in the extracellular media of HSCs, both in primary mouse HSCs and in human LX2 cells. This observation is significant because decreased pH may occur at local sites of tissue injury during inflammation,

favoring the activation of secreted cathepsins. In fact, secretion of cathepsins correlates positively with invasiveness and metastatic properties of many tumor entities,^{7,17,31} implying that CtsB facilitates invasion by degrading ECM components or by activating other matrix-degrading proteases like the urokinase-type plasminogen activator.⁴⁷

Given the role of CtsB/CtsD in orchestrating the proliferating and fibrogenic potential of activated HSCs, we next addressed their impact on liver fibrogenesis *in vivo*. Extending the previous observations of Canbay et al. in the BDL model of liver fibrogenesis,²⁸ we analyzed the role of CtsB in CCl₄-mediated liver

fibrosis. In agreement, we observed that pharmacological inhibition of CtsB prevented the increase in α -SMA up-regulation, collagen synthesis, and neutrophil infiltration induced by CCl₄. In contrast, although CtsB inhibition in BDL-induced liver fibrosis reduced hepatocellular damage, which was shown to contribute to HSC activation,²⁸ we observed that CtsB inhibition did not ameliorate the liver damage caused by CCl₄, probably reflecting that the involvement of CtsB in hepatocellular damage may well be stimuli-dependent.^{28,43,44} Besides, the up-regulation of CtsB during CCl₄ administration was confined to HSCs, with almost undetectable levels found in hepatocytes, as evidenced by its colocalization with GFAP, and by biochemical analyses of CtsB activity. In this regard and given the nature of GFAP staining, we cannot rule out the participation of CtsB in other myofibroblastic populations in the liver.^{42,48} Similarly, and given the complex posttranslational regulation of cathepsins,^{37,38} we cannot discard the involvement of other related family members in the activation of HSCs and modulation of their fibrogenic potential.

Finally, a relevant aspect of our findings is that the CtsB inhibitor Ca074Me, administered 2 weeks after CCl₄ treatment to allow the initial activation of HSCs, was able to reduce fibrosis progression. Although further research in this area is needed, our results position HSC cathepsins as potential therapeutic targets for the treatment of liver fibrosis.

Acknowledgment: The technical assistance of Susana Nuñez is highly appreciated. The authors thank Dr. Ramón Bataller for generously providing the LX2 cell line, and Drs. C. García-Ruiz, A. Colell, and A. Morales for critically reading the manuscript. M.M. is an IDIBAPS Investigator funded by "Department de Salut de la Generalitat de Catalunya".

References

- Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;88:125-172.
- Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006;364:33-60.
- Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007;117:539-548.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-218.
- Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:S84-S87.
- Bachem MG, Meyer D, Melchior R, M Sell M, Gressner AM. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self-perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest* 1992;89:19-27.
- Joyce JA, Baruch A, Chehade K, Meyer-Morse N, Giraudo E, Tsai FY, et al. Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004;5:443-453.
- Liaudet-Coopman E, Beaujouin M, Derocq D, Garcia M, Glondu-Lassis M, Laurent-Matha V, et al. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett* 2006;237:167-179.
- Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Sasaki K, Bruhl T, Farhadi MR, et al. Cathepsin is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat Med* 2005;11:206-213.
- Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, et al. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 1998;280:450-453.
- Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, Mossmann H, et al. Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *Eur Mol Biol J* 1995;14:3599-3608.
- Nakanishi H, Zhang J, Koike M, Nishioku T, Okamoto Y, Kominami E, et al. Involvement of nitric oxide released from microglia-macrophages in pathological changes of cathepsin D-deficient mice. *J Neurosci* 2001;21:7526-7533.
- Koike M, Shibata M, Ohsawa Y, Nishioku T, Okamoto Y, Kominami E, et al. Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 2003;22:146-161.
- Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 2000;291:113-135.
- Laurent-Matha V, Maruani-Herrmann S, Prébois C, Beaujouin M, Glondu M, Noël A, et al. Catalytically-inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth. *J Cell Biol* 2005;168:489-499.
- Fehrenbacher N, Jaattela M. Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res* 2005;65:2993-2995.
- Khalkhali-Ellis Z, Hendrix MJ. Elucidating the function of secreted maspin: inhibiting cathepsin D-mediated matrix degradation. *Cancer Res* 2007;67:3535-3539.
- Conus S, Perozzo R, Reinheckel T, Peters C, Scapozza L, Yousefi S, et al. Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *J Exp Med* 2008;205:685-698.
- Rocheffort H, Liaudet-Coopman E. Cathepsin D in cancer metastasis: a protease and a ligand. *APMIS* 1999;107:86-95.
- Turk V, Kos J, Turk B. Cysteine cathepsins (proteases)—on the main stage of cancer? *Cancer Cell* 2004;5:409-410.
- Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:764-75.
- Gohda E, Nagahama J, Nakamura O, Tsubouchi H, Daikuhara Y, Pitot HC. Increased activities of liver cathepsins T and D in carbon tetrachloride-treated rats. *Biochim Biophys Acta* 1984;802:362-371.
- Yamamoto H, Murawaki Y, Kawasaki H. Collagenolytic cathepsin B and L activity in experimental fibrotic liver and human liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1992;76:95-112.
- Leto G, Tuminello FM, Pizzolanti G, Montalto G, Soresi M, Gebbia N. Lysosomal cathepsins B and L and stefin A blood levels in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis: potential clinical implications. *Oncology* 1997;54:79-83.
- Leto G, Tuminello FM, Pizzolanti G, Montalto G, Soresi M, Ruggeri I, et al. Cathepsin D serum mass concentrations in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis. *Eur J Clin Chem* 1996;34:555-560.
- Kristensen DB, Kawada N, Imamura K, Miyamoto Y, Tateno C, Seki S, et al. Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *HEPATOLOGY* 2000;32:268-277.
- Takashima T, Kawada N, Maeda N, Okuyama H, Uyama N, Seki S, et al. Pepstatin A attenuates the inhibitory effect of N-acetyl-L-cysteine on proliferation of hepatic myofibroblasts (stellate cells). *Eur J Pharmacol* 2002;451:265-270.
- Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Feldstein A, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *J Clin Invest* 2003;112:152-159.
- Kim JS, Shukla SD. Histone h3 modifications in rat hepatic stellate cells by ethanol. *Alcohol Alcohol* 2005;40:367-372.
- Barrett J. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. *Biochem J* 1980;187:909-912.
- Klose A, Wilbrand-Hennes A, Zigrino P, Weber E, Krieg T, Mauch C, et al. Contact of high-invasive, but not low-invasive, melanoma cells to native

- collagen I induces the release of mature cathepsin B. *Int J Cancer* 2006; 118:2735-2743.
32. Wang X, Tang X, Gong X, Albanis E, Friedman SL, Mao Z. Regulation of hepatic stellate cell activation and growth by transcription factor myocyte enhancer factor 2. *Gastroenterology* 2004;127:1174-1788.
 33. Lee M, Fridman R, Mobashery S. Extracellular proteases as targets for treatment of cancer metastases. *Chem Soc Rev* 2004;33:401-409.
 34. Leto G, Tumminello FM, Gebbia N, Rausa L. Kinetics of in vivo inhibition of tissue cathepsin D by pepstatin A. *Int J Biochem* 1988;20:917-920.
 35. Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005;54:142-151.
 36. Liu C, Gaça MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem* 2003;278:11721-11728.
 37. Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, et al. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001;502:4-10.
 38. Turk V, Turk B, Guncar G, Turk D, Kos J. Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv Enzyme Regul* 2002;42:285-303.
 39. Laurent-Matha V, Derocq D, Prébois C, Katunuma N, Liaudet-Coopman F. Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B. *J Biochem* 2006; 139:363-371.
 40. Nishimura Y, Kawabata T, Kato K. Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. *Arch Biochem Biophys* 1988;261:64-71.
 41. Okuyama H, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Kristensen DB, Yoshizato K, et al. Regulation of cell growth by redox-mediated extracellular proteolysis of platelet-derived growth factor receptor β . *J Biol Chem* 2001;30:28274-28280.
 42. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:311-335.
 43. Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, et al. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 2000;106:1127-1137.
 44. Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *HEPATOLOGY* 2008;47:1495-1503.
 45. Heinrich M, Wickel M, Schneider-Brachert W, Sandberg C, Gahr J, Schwandner R, et al. Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J* 1999;18:5252-5263.
 46. Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, et al. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ* 2004;11:550-563.
 47. Krueger S, Haeckel C, Buehling F, Roessner A. Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Res* 1999;59:6010-6014.
 48. Knittel T, Kobold D, Piscaglia F, Saile B, Neubauer K, Mehde M, et al. Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem Cell Biol* 1999;112:387-401.