



# Rellevància del TNF i l'esfingomielinasa àcida en la fibrogènesi hepàtica

Núria Tarrats Font

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

DEPARTAMENT DE MORT I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR, IIBB-CSIC

UNIVERSITAT DE BARCELONA

**RELLEVÀNCIA DEL TNF i  
L'ESFINGOMIELINASA ÀCIDA EN LA  
FIBROGÈNESI HEPÀTICA**

Núria Tarrats Font

Barcelona 2012



# **RELLEVÀNCIA DEL TNF i L'ESFINGOMIELINASA ÀCIDA EN LA FIBROGÈNESI HEPÀTICA**

PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA

MEMÒRIA PER OPTAR AL TÍTOL DE

DOCTORA EN BIOLOGIA

PER LA UNIVERSITAT DE BARCELONA

Presentada per: Núria Tarrats Font

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la  
Dra. Montserrat Marí Garcia i el Dr. José Carlos Fernández-Checa Torres  
del Departament de Mort i Proliferació Cel·lular de l'Institut d'Investigacions  
Biomèdiques de Barcelona, Consell Superior d'Investigacions Científiques.

Mai m'he trobat ningú tant ignorant  
de qui no pogués aprendre alguna cosa.

*Galileo Galilei*

Viu com si fossis a morir demà.  
Aprèn com si fossis a viure per sempre.

*Mahatma Gandhi*

A tots els que m'estimen

Quan vaig començar a escriure aquesta tesi veia molt lluny aquest moment, veia molt lluny el moment de donar les gràcies a tots aquells que m'han ajudat en aquest camí. Ara que el final ja s'acosta, moltes persones són les que em venen al cap, i creieu-me que em sabia molt de greu deixar-me algú.

Crec que és lògic començar pels meus directors de tesi, la Montse i el Carlos. Primer de tot, agrair la possibilitat d'entrar en aquest grup per fer la tesi, i agrair també la confiança dipositada al llarg d'aquests anys. Al mateix temps, donar les gràcies a l'Albert, l'Anna Colell i la Carmen pel seu suport, i per ajudar-me a entendre la complexitat de treballar en un grup tant gran. A tu Carmen per la teva calidesa humana, perquè sempre m'ha agradat aquest punt de mare que es preocupa pels seus en la teva manera de ser. A tu Carlos per sorprendre'm sempre amb la teva ment privilegiada, connectant, memoritzant i citant el més mínim detall...jo de gran vull ser com tu!. I finalment a tu Montse per guiar-me aquests 4 anys i mig, ensopegant i tornant-nos a aixecar, i mostrant-me que en el món de la ciència s'ha de ser fort però sense perdre el rumb, i que al final tot s'aconsegueix si ets capaç de mirar-ho amb un prisma diferent.

Recordo clarament el meu primer dia en el laboratori 325 dins la Facultat de Medicina a l'ospital Clínic de Barcelona. L'Anna Moles i la Susana Núñez em van ensenyar a fer la perfusió d'un fetge el primer dia! Quan vaig haver superat el primer moment de mareig, vaig aconseguir canular-lo i perfondre'!. Tot un èxit, em deien elles...mentre jo encara tremolava! L'Anna Moles va ser qui es va encarregar de mi, qui em va explicar com funcionava el laboratori, i qui em va encomanar l'esperit lluitador que ella sempre ha tingut. Potser és que ens assemblàvem una mica, o bé molt, o bé gens, però sempre he admirat l'esforç i la dedicació que sempre va mostrar durant els anys que vam compartir. Quins farts de riure ens fèiem amb la Laura Llacuna, l'Alberto, la Susana l'Anna i jo! Perquè tot i treballar de valent, sempre hi havia temps per dinar junts, xerrar una estona i divertir-nos.

Això em fa pensar en els companys de laboratori que ja no hi són, i en els que tot just acaben d'arribar! Recordo molt bé la Laura Llacuna amb el seu sentit de l'humor, de qui vaig aprendre a no preocupar-me si no era necessari. També el Joan Montero, tot i no treballar plegats, sempre ha estat algú afable, fàcil de parlar-hi, i sempre disposat a donar un cop de mà! Espero que tots dos tingueu el futur científic i personal que realment us mereixeu. I els que acabeu d'arribar, Álvaro i Guillermo, només dir-vos que paciència, que sempre t'has d'equivocar per avançar, i que 4 anys passen volant! A les que ja estan a mig camí (tant de la tesi com del post-doc), la Bet, la Laura Martínez, la Cristina, la Milica i la Laura Conde, només dir-vos que molts ànims, que ja queda poc! A tu Martínez per ensenyar-me que ser tossut pot ser una gran virtut, i que no cal estressar-se per segons què, que al final tot acaba sortint si s'és perseverant. A tu Milica per animar-me i valorar-me sempre, i perquè he après que la teva paciència i dedicació et fan ser encara més valenta per enfrontar-te a una tesi doctoral tant allunyada de la Medicina.

I deixo pel final, però no per menys importants a les meves nenes del laboratori. Començaré per l'Anna Fernández i la seva veterania, no perquè sigui més vella (n'has fet 30 tot just, oi?) si no perquè és la que porta més anys com a pre-doc i post-doc en el laboratori, i segueix posant estudis d'alcohol! Sempre tindrè present la teva paciència, fortalesa i alegria fins i tot quan les coses s'han torçat, i la teva capacitat de treure ferro a problemes insignificants que potser m'impedien avançar. Et desitjo tot el millor en lo professional i encara més en lo personal. A la Núria Matías donar-li les gràcies per la seva confiança, per la possibilitat de parlar-li obertament de problemes sovint compartits, i en aquests últims dos anys, per les seves rialles sempre fidels a l'APM (tengo 3 piscinas...). Sempre he anat de congrés amb ella i ens ho hem passat bomba, i tot i semblar una persona reservada, m'agrada saber que conec l'altre cara més oberta i divertida que descobreixes quan la coneixes millor. Ànims en aquest últim tram...aviat seràs Doctora! A l'Anna Baulies per ser la incorporació més sorprenent, per tirar endavant qualsevol cosa que se li presenti pel camí sense por, i sempre amb èxit. Sé que amb la teva dedicació, perseverança i esforç arribaràs molt lluny. A més...ets l'alegria personificada! Fins i tot en moments difícils, fins i tot quan més cansades hem estat (respirant mitocòndries fins les



21h de la nit), o fins i tot quan ens quedàvem *freakejant* fins les tantes al laboratori parlant amb la Martínez de com dissoldre l'àcid palmític, han sigut moments alegres i divertits que mai dubtaria en repetir. A la Raquel Fucho per ser una alenada d'aire fresc, un remolí d'energia i coneixement que ho inunda tot. Perquè m'has ensenyat que no per voler molt, molt, molt, que un experiment surti, aquest serà un èxit, i tot i així, que no passa res per seguir-ho desitjant molt, molt, molt. Ets un gran exemple de rigorositat i saber fer, i m'alegra haver pogut participar de la teva vida tant canviant en aquests 3 últims anys! Però si has format una família i tot (que maco el Quim, e?). Tot és possible Raquel, i algú com tu sé que no es rendirà davant cap dificultat en el camí. Ànims, que aquest 2012 ja seràs Doctora! I finalment a la Susana Núñez, la Susi, la Su, la Petisu. Crec que és la persona que més admiro d'aquest laboratori (i algú em va dir que si ho crec és que és així). De tu he après moltíssimes coses, tant en el terreny professional com personal. Ets la única persona que és capaç d'arreglar un " PLC a la vegada que configura una Real Time, mentre fa unes tincions, i li queda temps per destetar ratolins a l'estabulari i fer comandes. Ets una lluitadora nata, i la teva paciència, prudència i fortalesa m'han ensenyat a ser una persona més forta i decidida. Espero seguir compartint estones amb tu i la Irene i les nenes del lab.

Tot i que això s'està allargant, no puc evitar mirar fora del meu món del laboratori per mirar cap a tots els amics i familiars que m'heu estat ajudant animant i apoiant tot aquest temps. Primer de tot a tots els amics i col·legues de la UB, tant de la carrera de Biologia com del laboratori d'Adenos al departament de Bioquímica i Biologia Cel·lular. Als primers per formar una colla tant maca, i seguir-nos veient, i per suposat per seguir mantenint llargues converses amb els neguits científics de cada un...Ens esperen moltes tesis aquests anys que venen! I en segon lloc, al laboratori Adenos, a la Marta, la Emma i l'Anna per ser realment les primeres en ensenyar-me com usar una pipeta o a plaquejar línies cel·lulars. Gràcies a vosaltres sóc on sóc ara.

La família i amics també han estat importants en aquest trajecte. Primer de tot donar les gràcies a la incondicionalitat de la meua iaia Lola (encara t'anyoro una mica cada dia, iaia) i de la meua germana Anna. Tot hauria estat molt més difícil sense el vostre suport i

ànims. Mai podré agrair-vos prou tot el vostre seguiment, encoratjament i calor que m'heu donat des de que tinc memòria. Als meus pares, als meus tiets, avis, cosins i fins i tot al meu nebot segon (el Martí!), gràcies per estar allà, per estimar-me com a filla, neboda, cosina, néta i tieta segona. Que sapiguen que aprecio de tot cor el suport i ànims que m'heu donat. Als meus amics de tota la vida, i als més recents (Marina, Olga, Maria, Anna, Tània, Albert, Nadal, Roger, " elena, Ferran, Jen, les petites Berta i Liona) gràcies per ser la meva segona família, la família que he escollit per formar part de la meva vida. Cada un de vosaltres ha contribuït a la seva manera en aquest procés, i tot i que potser no m'heu pogut ajudar en la part científica (un *western* sí que sabeu el que és, e?), m'heu ajudat en la part personal, animant-me, i alegrant-vos per tots els petits èxits que he anat obtenint aquests 4 anys. Mil gràcies per ser-hi i continuar sent-hi.

Per acabar, donar les gràcies al Victor. Ell ha estat l'únic i real espectador de tot el meu procés, i encara més des de fa 2 anys i mig quan ens en vam anar a viure junts. És el suport, l'amor, el carinyo, els ànims, i perquè no, els seus acudits, el que el fan ser la meva meitat. Gràcies per aixecar-me els ànims en els moments de desesperació, angoixa i incertesa, i gràcies per compartir amb mi fins a l'últim esdeveniment important fins al dia d'avui. I com que això ja ha estat prou nyonyo, el reste me'l reservo per la intimitat.

Gràcies de nou, a tots.

Barcelona, Abril 2012



# ÍNDEX

## ABREVIATURES

<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	1
<b>1. LA FIBROSI " EPÀTICA</b> .....	3
1.1. Patogènesi de la fibrosi hepàtica .....	4
1.1.1. Principals insults al fetge .....	5
1.1.2. Desequilibri en la degradació de la MEC .....	7
1.2. Aproximacions terapèutiques per a la fibrosi hepàtica .....	7
1.3. Miofibroblasts hepàtics .....	9
1.3.1. Cèl·lules estrellades hepàtiques .....	10
1.3.2. Fibroblasts portals .....	10
1.3.3. Cèl·lules derivades del moll de l'òs .....	10
1.3.4. " epatòcits i colangiòcits .....	11
<b>2. LA CÈL·LULA ESTRELLADA " EPÀTICA (CE" )</b> .....	11
2.1. " istòria i nomenclatura .....	11
2.2. Morfologia i origen .....	13
2.2.1. Ultraestructura .....	13
2.2.2. Els retinoids .....	14
2.3. El cicle vital de les CE" .....	14
2.4. " eterogeneïtat i plasticitat de les CE" .....	15
2.5. Activació de les cèl·lules estrellades hepàtiques .....	16

2.5.1.	Iniciació	17
2.5.2.	Perpetuació	18
2.5.2.1.	<i>Proliferació</i>	18
2.5.2.2.	<i>Quimiotaxi</i>	19
2.5.2.3.	<i>Fibrogènesi</i>	20
2.5.2.4.	<i>Contractilitat</i>	20
2.5.2.5.	<i>Degradació de la matriu extracel·lular</i>	21
2.5.2.6.	<i>Pèrdua de retinoids</i>	22
2.5.3.	Resolució	23
2.5.3.1.	<i>Reversió de l'activitat de les CE"</i>	23
2.5.3.2.	<i>Eliminació per apoptosi de les CE"</i>	23
3.	LES METAL·LOPROTEASES	24
3.1.	Estructura i activació de les MMPs	25
3.2.	Les diferents famílies de MMPs	27
3.3.	Les metal·loproteases i la fibrosi hepàtica	27
3.3.1.	La MMP-2 i la MMP-9 en les malalties hepàtiques	29
4.	TNF- $\alpha$ i ELS SEUS RECEPTORS	30
4.1.	El lligand TNF i els seus receptors	31
4.2.	Vies de senyalització de TNF-R1 i TNF-R2	33
4.2.1.	Via de senyalització de NF- $\kappa$ B	34
4.2.2.	Via de senyalització de mort cel·lular	35

4.3. TNF- $\alpha$ i els seus receptors en la fibrosi hepàtica	35
5. LES CATEPSINES	36
5.1. Les cistein catepsines	38
5.1.1. La catepsina B	39
5.1.1.1. <i>Estructura i funcions fisiològiques</i>	39
5.1.1.2. <i>Implicacions patològiques</i>	40
5.2. Les aspartil catepsines	41
5.2.1. La catepsina D	42
5.2.1.1. <i>Estructura i funcions fisiològiques</i>	42
5.2.1.2. <i>Implicacions patològiques</i>	43
6. L'ESFINGOMIELINASA ÀCIDA	44
6.1. Els esfingolípid	44
6.1.1. El metabolisme dels esfingolípid	45
6.2. L'esfingomielinasa àcida	47
6.2.1. Implicacions patològiques	48
6.2.2. La malaltia de Nemann-Pick	49
<b>OBJECTIUS</b>	53
<b>RESULTATS</b>	57
- OBJECTIU 1	61
Article: Tarrats, et al. " <i>epatology</i> 2011 Jul; 54(1):319-27	63

- OBJECTIU 2 -----	73
Article: Moles, et al. <i>Am J Pathol</i> 2010;177(3):1214-24 -----	79
Article: Moles, Tarrats, et al. <i>J Biol Chem.</i> 2012;287(2):1178-88 -----	91
<b>DISCUSSIÓ -----</b>	<b>103</b>
<b>CONCLUSIONS -----</b>	<b>119</b>
<b>Annex: MATERIALS i MÈTODES -----</b>	<b>123</b>
1. Animals d'experimentació -----	125
2. Cultiu cel·lular -----	125
2.1. Aïllament de CE" -----	125
2.2. Cultiu de CE" -----	127
2.3. Línies cel·lulars -----	127
2.4. Tractaments -----	128
3. Obtenció de proteïnes -----	128
3.1. Obtenció de lisats a partir de CE" -----	128
3.2. Obtenció d'homogenats a partir de fetge total -----	128
3.3. Quantificació de proteïnes -----	129
4. Detecció de proteïnes per <i>Western-blot</i> (WB) -----	129
4.1. Electroforesi en gels de SDS-poliacrilamida -----	129
4.2. Transferència de proteïnes -----	130
4.3. Incubació amb Anticossos -----	130
5. Zimografia de gelatina -----	132

6. Assaig de proliferació amb <sup>3</sup> H -timidina	133
7. Aïllament d'extractes nuclears	133
8. Silenciament de proteïnes amb RNAi	134
9. Determinació de l'activitat CtsB i CtsD	135
10. Determinació de l'activitat esfingomielinasa àcida	136
11. Estudis <i>in vivo</i> per induir fibrogènesi hepàtica en ratolins	136
11.1. Model de fibrogènesi <i>in vivo</i> : CCl4	137
11.2. Model de fibrogènesi <i>in vivo</i> : LCB	138
11.3. Sacrifici i recollida de mostres	139
12. Anàlisi de les transaminases	139
13. Histologia	140
13.1. Fixació i parafinat de les mostres	140
13.2. Micròtom	140
13.3. Tincions histològiques	140
13.3.1. Hematoxilina-Eosina	140
13.3.2. Picro-Sirius Red	141
13.3.3. Nissl	141
14. Immunohistoquímica	142
14.1. Mieloperoxidasa o $\alpha$ -SMA	142
15. Immunocitoquímica	143
16. Quantificació d'hidroxiprolina	144
17. Extracció d'RNA	146
18. PCR quantitativa a temps real (RT-PCR real time)	147



19. Estudi amb pacients amb NAS" -----	148
19.1. Cohort de pacients amb NAS" -----	148
20. Estadística -----	149
<b>BIBLIOGRAFIA</b> -----	151

## ABREVIATURES



## ABREVIATURES

**$\alpha$ -SMA:** *alpha Smooth Muscle Actin*; Actina de múscul llis alfa

**ALD:** *Alcoholic Liver Disease*; Malaltia alcohòlica hepàtica

**ASMasa:** *Acid Sphingomyelinases*; Esfingomielinasa àcida

**ASMasa<sup>-/-</sup>:** Ratolins deficients en ASMasa

**ASMasa<sup>+/-</sup>:** Ratolins heterozigots per l'ASMasa

**ASMasa<sup>+/+</sup>:** Ratolins control per l'ASMasa

**CCl<sub>4</sub>:** Tetraclorur de carboni

**CEH:** Cèl·lules estrellades hepàtiques

**CEH-MF:** CE<sup>''</sup> en la seva forma activa tipus miofibroblast

**CtsB:** Catepsina B

**CtsD:** Catepsina D

**EGF:** *Epithelial Growth Factor*; Factor de creixement epitelial

**ET-1:** Endotelina-1

**IKK:** *I $\kappa$ B Kinase*; Cinasa de I $\kappa$ B

**IL-1:** *Interleukin 1*; Interleuquina 1

**LCB:** lligadura del conducte biliar; *Bile duct ligation (BDL)*

**LMP:** *Lysosomal membrane permeabilization*; Permeabilització de la membrana lisosomal

**MCF:** Malaltia crònica del fetge

**MCP-1:** *Monocyte Chemoattractant Protein-1*; Proteïna quimioattractant de monòcits

**MEC:** Matriu extracel·lular

**memTNF:** TNF integrat a la membrana

**MF:** Miofibroblast

**MMPs:** Metal·loproteases

**mRNA:** RNA missatger

**NAFLD:** *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*; Malaltia fetge gras no alcohòlic

**NASH:** *Non-alcoholic steatohepatitis*; Esteatohepatitis no alcohòlica

**NF- $\kappa$ B:** *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; Factor Nuclear  $\kappa$ B

**NPD:** *Niemann-Pick disease*; Malaltia de Niemann-Pick

**NSMasa:** *Neutral Sphingomyelinase*; SMasa neutra

**PDGF:** *Platelet Derived Growth Factor*; Factor de creixement derivat de plaquetes

**REr:** Reticle endoplasmàtic rugós

**SMases:** *Sphingomyelinases*; Esfingomielinases

**sTNF:** TNF soluble

**TACE:** *TNF-alpha converting enzyme*; Enzim conversor de TNF-alfa

**TEM:** Transició epitelial-mesenquimal

**TGF- $\beta$ :** *Tumor Growth Factor beta*; Factor de creixement tumoral beta

**TIMPs:** *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*; Inhibidor tissular de la metal·loproteases

**TNF-R1:** Receptor 1 de TNF o p55/60

**TNF-R2:** Receptor 2 de TNF o p75/80

**TNF-R1 KO:** Ratolins deficients en el TNF-R1

**TNF-R2 KO:** Ratolins deficients en el TNF-R2

**TNFR-DKO:** Ratolins deficients pels 2 receptors de TNF

# INTRODUCCIÓ



## 1. LA FIBROSI HEPÀTICA

La fibrosi hepàtica es defineix com l'excessiu cúmul de matriu extracel·lular (MECp) que es dona en la majoria de les malalties cròniques del fetge a causa d'un dany persistent sobre el mateix. Aquest dany crònic té lloc en resposta a una varietat d'insults com la infecció pels virus de l'Hepatitis B i C, el consum crònic d'alcohol, obstrucció biliar, esteatohepatitis no alcohòlica, desordres autoimmunes, infeccions helmíntiques, intoxicacions amb Ferro o Coure, o consum de drogues (Friedman 2003p)

La fibrosi representa així un problema mèdic greu, ja que si el dany crònic es manté en el temps, la fibrosi pot progressar a una cirrosi, malaltia que va associada a la formació de nòduls, la contracció de l'òrgan, així com a una disfunció hepatocel·lular i augment de la resistència al flux sanguini intrahepàtic, que pot resultar en insuficiència hepàtica i hipertensió portal respectivament (Ginès et al. 2004p Així doncs, la morbiditat i mortalitat associada es dona majoritàriament després del desenvolupament de la cirrosi. En la majoria de pacients aquest progrés cap a una cirrosi succeeix, en terme mitjà, després de 15-20 anys aproximadament (Poynard et al. 2000; Davis et al. 2003; Bataller & Brenner 2005p)

Les manifestacions clíniques de la cirrosi són molt àmplies, i poden ser des d'asimptomàtiques fins desenvolupar una fallida hepàtica, i venen determinades tant per la naturalesa i la severitat de la malaltia hepàtica subjacent, com per l'abast de la fibrosi hepàtica. Fins al 40% dels pacients amb cirrosi són asimptomàtics i poden romandre així fins a una dècada, però el deteriorament progressiu és inevitable un cop es desenvolupen les complicacions tal com ascitis, fallida renal, varius hemorràgiques o encefalopatia hepàtica (Fattovich et al. 1997p)



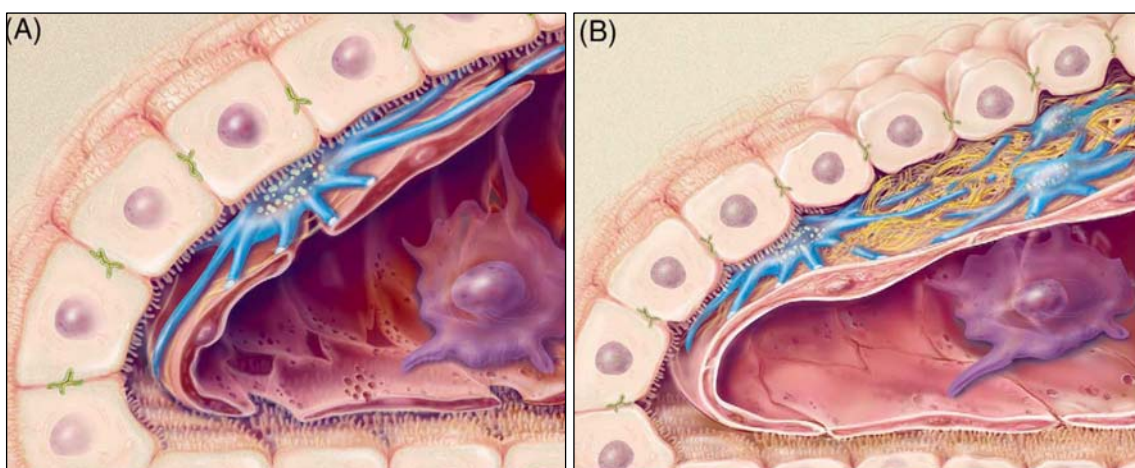
## 1.1. Patogènesi de la fibrosi hepàtica

Un fetge normal i sa conté un component epitelial majoritari representat pels hepatòcits, una coberta endotelial, els macròfags tissulars residents del fetge anomenats cèl·lules de Kupffer, i les cèl·lules estrellades hepàtiques (CEH) en l'espai perivascular. L'espai subendotelial de Disse separa els hepatòcits de l'endoteli sinusoidal i conté una malla subendotelial formada per molècules de la MEC que donen suport cel·lular i senyals per mantenir la funció diferenciada de les cèl·lules del voltant, mentre permeten un transport facilitat de substàncies i factors de creixement (Friedman 2003p

La fibrosi hepàtica és el resultat d'una resposta de "tancament de ferida" (o *wound healing*) del fetge davant un dany constant. Després d'un dany hepàtic agut les cèl·lules parenquimals es regeneren i substitueixen les cèl·lules apoptòtiques. Aquest procés s'associa amb una resposta inflamatòria i una limitada deposició de MEC. Si el dany hepàtic persisteix, finalment el procés de regeneració acaba fallant i els hepatòcits són substituïts per abundant MEC. La distribució de les fibres dependrà de l'origen del dany hepàtic. Així doncs en:

ap Hepatitis viral crònica i desordres colestàtics crònics: la fibrosi estarà inicialment localitzada al voltant del tracte portal.

bp Desordres induïts pel consum d'alcohol: Les fibres estaran localitzades en les àrees pericentrics i perisinusoidals del fetge (Pinzani 1999p



**Figura 1:** Canvis subendotelials durant l'activació de les CEH degut a dany hepàtic. (A) Arquitectura normal del fetge amb una CEH (en blau) que conté gotetes de vitamina A, i rodejada només de matriu de baixa densitat. (B) Durant el dany hepàtic, les CEH proliferen i s'envolten de la matriu fibrosil·lar acumulada. Aquests canvis contribueixen a la pèrdua del microvili dels hepatòcits i el tancament de les fenestracions endotelials (figura adaptada de (Friedman 2003pp

La fibrosi doncs, es caracteritza per una deposició excessiva de proteïnes de la MEC tals com glicoproteïnes, proteoglicans, i col·làgens és a dir, que la qualitat, quantitat i distribució dels components de la MEC en el fetge pateix uns canvis dramàtics durant la fibrogènesi. L'acumulació dels components de la MEC que col·lectivament formen la cicatriu hepàtica, substituirà el component normal majoritari de l'espai de Disse, representat pel col·lagen tipus IV de baixa densitat. Els col·làgens que el substituirà (majoritàriament col·lagen tipus I o III) tindran una densitat més elevada i es distribuïran inicialment pel voltant del septe connectiu, envoltant els nòduls hepàtics regeneratius. Com a idea de la magnitud de MEC dipositada en un fetge malalt comentar que un fetge cirròtic pot contenir sis vegades més col·lagen i proteoglicans que un fetge sa (Guo & Friedman 2007p)

### 1.1.1. Principals insults al fetge

Els principals insults que poden conduir a una fibrosi hepàtica són: consum crònic d'alcohol, infecció pels virus de l'Hepatitis B i C, esteatohepatitis no alcohòlica (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) i obstrucció biliar.

#### 1. Consum crònic d'alcohol:

Aquest tipus de fibrosi és causada per l'acetaldehid, un metabòlit oxidat de l'alcohol. La incidència de la malaltia hepàtica crònica (*Alcoholic Liver Disease* o ALD) va directament relacionada amb la quantitat d'alcohol que es consumeix a països occidentals. El total de casos de fibrosi alcohòlica és quasi 3 vegades superior als casos d'Hepatitis C. La majoria de manifestacions patològiques per dany hepàtic induït per l'alcohol es poden resumir en 3 lesions: esteatosi (fetge gras) esteatohepatitis (fetge gras i inflamació) i cirrosi (Lefkowitz 2005p)

#### 2. Infecció pel virus de l'Hepatitis:

Més de 400 milions de persones al món estan crònicament infectats pel virus de l'Hepatitis B, i és responsable de més de 300000 casos de càncer de fetge cada any i nombrosos casos d'hemorràgies gastrointestinals i ascitis (Lai et al. 2003p) Tant la fibrosi, com l'hepatitis que es desenvolupen en aquests malalts són causades pels virus de l'Hepatitis B, C o D. Amb una menor incidència, la infecció crònica pel

virus de l'hepatitis C afecta més de 170 milions de persones al món i causa unes 300000 morts l'any pel desenvolupament de cirrosi o hepatocarcinoma (Poynard et al. 2003p)

3. Malaltia hepàtica no alcohòlica i esteatohepatitis no alcohòlica:

La malaltia de fetge gras no alcohòlic (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* o NAFLD) representa un espectre que engloba esteatosi, NASH, i cirrosi en absència d'abús crònic d'alcohol. Recentment s'ha reconegut aquesta malaltia com la causa més comú de disfunció hepàtica en els països desenvolupats. Així com la ALD es desenvolupa per un consum excessiu i crònic d'alcohol, la NAFLD està fortament associada amb obesitat, resistència a l'insulina/diabetis tipus 2 o dislipèmia, entre d'altres manifestacions hepàtiques del síndrome metabòlic (Anstee et al. 2011p) La esteatohepatitis no alcohòlica és una malaltia hepàtica que pot conduir a una fibrosi d'estat avançat. Varis estudis mostren que entre el 26-37% dels pacients amb NASH mostren progressió a fibrosi al llarg del temps, amb un 9% d'incidència cap a cirrosi (Hayashi & Sakai 2011p)

4. Fibrosi biliar:

Dins de la fibrosi o cirrosi biliar s'en defineix dos tipus: la cirrosi biliar primària i la secundària. La primària és una malaltia crònica, progressiva i autoimmune que predomina en dones de mitjana edat (40-60 anys) Es caracteritza per la destrucció autoimmune dels conductes biliars intrahepàtics (mitjans i petits) per inflamació portal, i per cicatrització progressiva que sense un tractament adequat pot conduir a fibrosi i fallida hepàtica. La secundària es dona per una obstrucció dels conductes biliars que resultarà en una fibrosi progressiva de les àrees periportals (Hu et al. 2010p)

5. Infecció per paràsits:

La fibrosi que es desenvolupa a causa de la infecció per paràsits és freqüent en països en desenvolupament i acostuma a ser causada pel paràsit *schistosoma*. La *Schistomiasis* és una malaltia parasitària que afecta a més de 207 milions de persones al món, i predomina en les poblacions més pobres i subdesenvolupades (King 2009p) Un cop infectat, els cucs adults produeixen centenars d'ous al dia, i algun d'aquests ous pot quedar atrapat en algun vas sanguini del fetge.

Aquest fet induirà una resposta granulomatosa i la fibrosi associada (Chu et al. 2011p)

### 1.1.2. Desequilibri en la degradació de la MEC

En el procés de fibrogènesi hepàtica també s'ha de tenir en compte un altre factor que juga un paper fonamental en la progressió de la fibrosi: la degradació de la matriu. Es pot dir doncs, que la fibrosi hepàtica no es dona únicament per un augment de la síntesi de col·làgens i altres components de la MEC, sinó que alhora es produeix una disminució en la degradació de la MEC. Així doncs, la fibrosi hepàtica és el resultat d'un increment net en la síntesi de MEC en contrast amb la degradació de matriu. En realitat, tant la degradació com la síntesi de MEC estant induïdes durant el dany hepàtic, però a la llarga, el ritme de degradació acaba sent més baix que el de fibrogènesi i s'acaba acumulant matriu (Guo & Friedman 2007p)

La degradació de la MEC és dependent de les metal·loproteases (MMPs) i els seus inhibidors o TIMPs (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*). Durant la fibrosi s'expressaran TIMPs que seran capaços d'inhibir MMPs encarregades de degradar la matriu patològica, i alhora s'expressaran altres tipus de MMPs que s'encarregaran de degradar la matriu sana perquè pugui ser substituïda per fibres de col·lagen.

Aquest procés és més rellevant en la perpetuació de la fibrosi, com es descriu més endavant.

## 1.2. Aproximacions terapèutiques per a la fibrosi hepàtica

Els punts d'atac contra la fibrosi hepàtica deriven del coneixement actual del dany hepàtic, la inflamació, i l'activació de les CEH. La teràpia ideal seria aquella que:

ap es pogués administrar oralment

bp fos ben tolerada durant usos crònics

cp que no només previngués l'aparició de fibrosi, sinó que revertís la cicatriu fibrosa ja formada.

Mentre que el desenvolupament de teràpies dirigides únicament a la fibrosi pot ser atractiu, en realitat també s'investiguen altres teràpies desenvolupades per a altres malalties, els mecanismes d'acció de les quals també podrien ser antifibròtics. Alguns exemples serien els antioxidants o els bloquejants dels receptors d'angiotensina, entre d'altres (Ghiassi-Nejad & Friedman 2008p

L'ampli rang d'objectius de les teràpies antifibròtiques es poden dividir en diverses categories:

1. Curar la malaltia primària: Fins a la data, l'antifibròtic més efectiu segueix sent l'eliminació de la causa principal de la malaltia hepàtica. Trobem un bon exemple en la hepatitis viral, on cada cop hi ha més evidències que indiquen que la eliminació del virus no només milloraria el teixit, sinó que també podria reduir la pressió portal (Roberts et al. 2007p
2. Reduir la inflamació i la resposta immune: S'han descrit diverses teràpies antifibròtiques basades en l'activitat antiinflamatòria dels agents terapèutics. Com a exemples trobem l'interferó- $\alpha$ , i altres agents antiinflamatoris com els corticoides (Czaja & Carpenter 2004p o els antagonistes de TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor* ap com la pentoxifilina (Raetsch et al. 2002p
3. Agents hepatoprotectors: Està àmpliament descrit que l'apoptosi dels hepatòcits és un estímul inflamatori pro-fibrogènic (Canbay, Friedman et al. 2004; Canbay et al. 2005p Com a resultat, s'han desenvolupat petites molècules que bloquegen específicament les caspases, efectors clau de la senyalització apoptòtica (Canbay, Feldstein, et al. 2004p Tot i així, la inhibició de les caspases no significa necessàriament protegir de la mort hepatocel·lular.
4. Prevenició i inhibició de l'activació de les CEH: La capacitat de reduir la transformació de les CEH a la seva forma activa tipus miofibroblast (CEH-MF) és un objectiu particularment atractiu donat el seu paper central en la fibrogènesi. Possibles teràpies serien l'administració d'antioxidants, així com interferó- $\gamma$  (Rockey & Chung 1994; Weng et al. 2007p
5. Estimular l'apoptosi de les CEH-MF: L'apoptosi és el principal mecanisme pel qual es redueix el nombre de cèl·lules estrellades durant la recuperació espontània després d'un dany hepàtic (Iredale et

- al. 1998p La gliotoxina i sulfasalazina exerceixen el seu efecte proapoptòtic mitjançant la inhibició de NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) en les CEH i s'ha vist que acceleren la resolució espontània de la fibrosi en models animals (Oakley et al. 2005; Douglass et al. 2008p)
6. Promoure la degradació de MEC: Tot i que moltes de les drogues candidates són capaces d'inhibir la fibrogènesi, seria necessari desenvolupar altres agents capaços d'estimular la degradació de la matriu cicatritzant acumulada, sobretot en pacients amb la malaltia ja avançada. Aquest procés de degradació podria ser facilitat per la manipulació local del balanç entre les MMPs i els seus reguladors. Un dels inconvenients, però, seria que el recanvi de MEC es dona constantment a tot el cos, i la modulació de les MMP, TIMPs, o altres activadors, hauria de ser específic de fetge per evitar efectes sistèmics adversos com cataractes o dolors musculars (Fallowfield 2011p)
  7. Reduir la fibrogènesi: La inhibició de la producció de MEC ha estat de les primeres dianes per la majoria de teràpies antifibròtiques fins la data. Aquest objectiu s'ha abordat tant directament mitjançant el bloqueig de la síntesi de la matriu, com indirectament a través de la inhibició de l'activitat de TGF- $\beta$  (*Tumor Growth Factor beta*) la principal citocina fibrogènica.

### 1.3. Miofibroblasts hepàtics

Es defineix com miofibroblasts (MF) hepàtics la població heterogènia de cèl·lules profibrogèniques, majoritàriament  $\alpha$ -SMA (*alpha Smooth Muscle Actin*) positives, que poden ser fàcilment identificades en fetges danyats crònicament (com és en la fibrosi o la cirrosi) tant en condicions experimentals com clíniques. Amb base al seu perfil antigènic o a la seva localització tissular, es podran descriure diferents poblacions de MF (Novo et al. 2009p)

- ap MF portal/septal (MFs/PSp) expressen un ampli repertori antigènic i es troben normalment en el teixit connectiu al voltant dels tractes portals (MF portals) com també en la part interna del septum fibròtic (MF septals)

- bp MF interfase (MFs/IFp es troben fonamentalment allà on la fibrogènesi és activa, és a dir en el llindar entre el septe fibròtic i el parènquima circumdant.
- cp CEH tipus MF activades (CEH-MFsp cèl·lules  $\alpha$ -SMA positives que es troben principalment en els sinusoids capil·laritzats o al seu voltant, dels fetges fibròtics o cirròtics.

Els MF hepàtics profibrogènics es poden originar a partir de diferents fonts, amb una contribució relativa que pot variar depenent de la etiologia de la malaltia crònica del fetge (MCFpi/o de la prevalença del mecanisme fibrogènic. Aquestes fonts i mecanismes es descriuen a continuació (Friedman 2008b; Parola et al. 2008p

### **1.3.1. Cèl·lules estrellades hepàtiques**

Les CEH són cèl·lules perisinusoidals responsables de la síntesi dels components de la MEC de l'espai subendotelial de Disse on resideixen. També són responsables de l'emmagatzematge i metabolisme de la vitamina A i els retinoids. Les CEH encara són considerades la font més important de cèl·lules profibrogèniques tipus MF i s'ha vist que estan involucrades en quasi totes les malalties cròniques del fetge, mostrant normalment el patró de fibrosi perisinusoidal/pericel·lular.

### **1.3.2. Fibroblasts portals**

Aquestes cèl·lules estan situades en el teixit connectiu de les àrees portals, i la seva activació cap a miofibroblasts es creu que és rellevant en condicions d'isquèmia i en obstrucció colestàtica (patró de fibrosi biliarp També es creu que els fibroblasts portals originarien els MFs septals.

### **1.3.3. Cèl·lules derivades del moll de l'os**

Estudis recents han mostrat evidències de que en condicions de dany hepàtic crònic, MF profibrogènics com els MFs/IF o alguns MFs portals, poden ser originats a partir del reclutament de cèl·lules derivades del moll de l'os (Forbes et al. 2004p com cèl·lules mesenquimals (Li et al. 2009p o fibròcits circulants

(Kisseleva et al. 2006) Estudis recents però posaven de manifest que la contribució efectiva de cèl·lules mesenquimals varia depenent de si són humanes o murines, o segons el protocol, i fins i tot es suggeria que la deposició de col·lagen que produïen era quasi negligible. Amb tot això les conclusions estan encara a debat (Higashiyama et al. 2009; Kallis & Forbes 2009)

#### **1.3.4. Hepatòcits i Colangiòcits:**

Estudis recents han suggerit que les cèl·lules profibrogèniques podrien originar-se a partir de colangiòcits o hepatòcits per un procés de transició epitelial-mesenquimal (TEM) Aquest procés descrit originalment en el desenvolupament embriològic i fetal, també està involucrat en invasió i progressió cel·lular en el càncer, així com en el desenvolupament de malalties fibrogèniques i inflamatòries cròniques de diferents òrgans o teixits (Zeisberg et al. 2007) Actualment la contribució real de la TEM a la progressió fibrogènica de les MCF és una qüestió d'intens debat.

## **2. LA CÈL·LULA ESTRELLADA HEPÀTICA (CEH)**

Tot i que hi ha evidències de que hi ha altres tipus cel·lulars implicats en el procés de fibrogènesi, les cèl·lules estrellades hepàtiques (CEH) són considerades les principals responsables de la producció en excés de proteïnes de la MEC durant el procés fibrogènic.

### **2.1. Història i Nomenclatura**

Les CEH van ser descrites per primer cop pel Dr. Kupffer l'any 1876. Va identificar les gotetes que contenien vitamina A mitjançant un mètode on usava clorur d'or, i va anomenar a aquelles cèl·lules "sternzellen" (cèl·lula estrellada en alemany) La seva identitat va ser confirmada al 1882 pel Dr. Rothe. Tot i el descobriment, les primeres observacions de Kupffer van fracassar a l'hora de distingir entre les CEH i els macròfags residents del fetge (ara anomenades cèl·lules de Kupffer) ja que hi havia confusió en si les CEH tenien o no capacitat fagocítica.



Altres investigadors van anar usant altres tècniques i tincions per caracteritzar les CEH. Uns exemples van ser el Dr. Zimmerman que va usar un mètode amb plata per identificar "pericits hepàtics", o bé una tinció de greixos que emprà el Dr. Ito al 1951 per definir les "cèl·lules emmagatzemadores de greix o cèl·lules d'Ito", o bé una tècnica amb impregnació de plata usada pel Dr. Suzuki per descriure les "cèl·lules intersticials". Al cap d'uns anys, al 1966, tres doctors, Bronfenmajer, Schaffner i Popper van proposar el nom de "lipòcits", que reflectia així el rol en l'absorció de greix en forma de Vitamina A, i també apuntaven la semblança d'aquestes cèl·lules amb els fibroblasts (Bronfenmajer et al. 1966p)

Finalment, el Dr. Nakane al 1963, i el Dr. Wake al 1971 definien la cèl·lula estrellada com a una cèl·lula diferenciada capaç d'emmagatzemar vitamina A. El Dr. Wake, usant la tinció de clorur d'or originalment usada per Kupffer, va postular les descripcions definitives de les cèl·lules estrellades hepàtiques, i va establir que les "cèl·lules perisinusoidals" eren les mateixes que el Dr. Kupffer havia descrit quasi 100 anys enrera (Wake 1971p)

Del 1972 al 1986, autors com Kent, McGee, o Okanoué, entre d'altres, van mostrar en els seus treballs, estudis fonamentals on atribuïen a les CEH un rol funcional molt important en la fibrosi hepàtica. Revelaven doncs que les CEH apareixien molt pròximes a les fibres de col·lagen observades en dany hepàtic. Els seus estudis també proposaven que les cèl·lules estrellades eren les precursoras dels "fibroblasts" que sovint s'observaven i es descrivien en el fetge danyat. La consistent associació morfològica entre les CEH i la MEC va començar a despertar interès a principis dels '80, que va ser quan es van començar a desenvolupar mètodes d'aïllament i cultiu de CEH (Kent et al. 1976; McGee & Patrick 1972; Okanoué et al. 1983p)

A mesura que l'estudi de la fibrosi hepàtica, i en conseqüència l'estudi de les CEH, va anar creixent, es va fer evident la confusió que es creava a causa dels molts noms diferents que les CEH havien rebut al llarg dels anys pels diferents investigadors que les havien descrit. Així doncs, al 1996 els investigadors es van posar d'acord en estandarditzar el nom, i des d'aquell moment referir-se a aquestes cèl·lules com a "cèl·lules estrellades hepàtiques" (Anón 1996p)

## 2.2. Morfologia i origen

Les CEH representen un terç de la població cel·lular no parenquimal, i un 10-15% del total cel·lular hepàtic. Estan localitzades en l'espai subendotelial, entre la superfície basolateral dels hepatòcits, i el costat anti-luminal de les cèl·lules endotelials sinusoidals.

L'origen de les CEH ha estat un tema controvertit des dels inicis del seu descobriment. Actualment les evidències apunten a un origen endodèrmic o bé a un origen a partir del *septum transversum*. 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. Per altre banda, en suport a l'origen a partir del *septum transversum*, les CEH expressen Foxf1, un factor de transcripció del mesoderm, el qual es localitza típicament en el mesènquima del *septum transversum* durant el desenvolupament del fetge (Friedman 2008ap

Recentment també s'ha hipotetitzat sobre un origen a partir de la cresta neural basat en l'expressió de diversos marcadors de la cresta neural com la nestina, neurotrofines i els seus receptors, la N-CAM, la proteïna àcida fibrilar de la glia o GFAP, entre d'altres. Tot i aquestes evidències, un estudi de mapatge de cèl·lules derivades de la cresta neural en fetges murins en desenvolupament no van ser capaços de localitzar CEH durant la gestació tardana. Aquest fet invalidava doncs la possibilitat d'un origen neural (Geerts 2004p

### 2.2.1. Ultraestructura

En un fetge normal, les CEH tenen un cos fusiforme amb nuclis ovalats. Tenen un reticle endoplasmàtic rugós (REr) discretament desenvolupat, i un complex de Golgi petit. Les CEH presenten nombroses microprojeccions en forma d'espina que els confereixen avantatge per sensar senyals quimiotàctiques que transmetran cap a l'aparell mecànic de la cèl·lula per generar forces contràctils.

Una sola CEH acostuma a estar envoltant dos o més sinusoids propers, i alhora estar en contacte amb els hepatòcits a la cara anti-luminal. Aquest contacte íntim entre les CEH i els tipus cel·lulars de l'entorn veí facilitaria el transport cel·lular de mediadors solubles i citocines.

### 2.2.2. Els retinoids

Un dels trets més característics de la CEH en un fetge normal i sa és la seva capacitat d'emmagatzemar vitamina A en forma de retinoids en el citoplasma. El número de gotetes de vitamina A varia segons l'espècie i l'organisme. Quan les CEH estan en cultiu, les gotetes de retinoids mostren autofluorescència al excitar-les amb llum ultraviolada (UVp

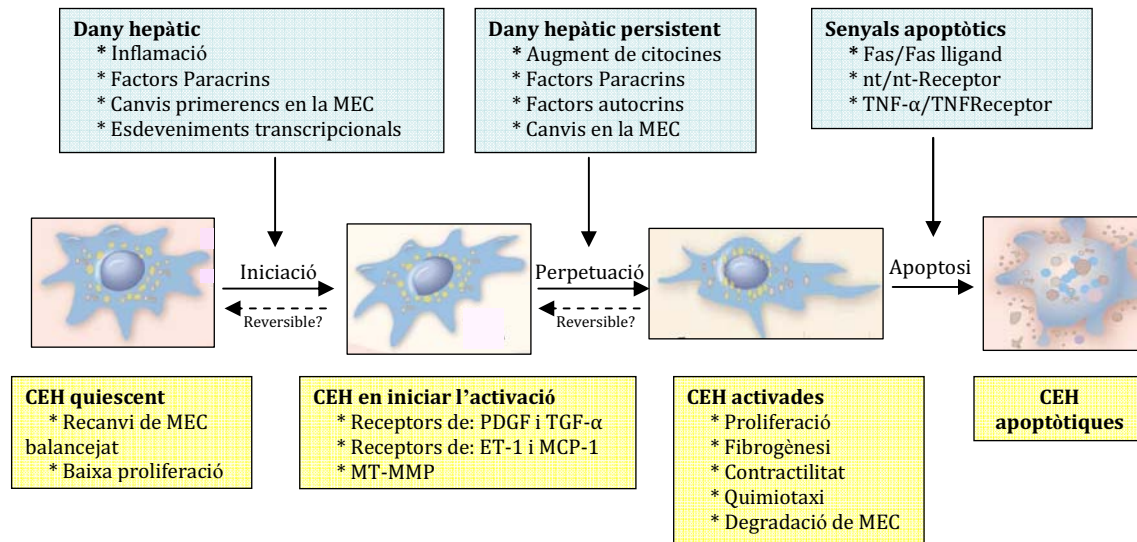
El requeriment de l'emmagatzematge de vitamina A en les CEH sembla ser un tret evolutiu fonamental, ja que s'ha pogut identificar fins i tot en vertebrats primitius. Durant el dany hepàtic, l'estructura de les CEH canvia considerablement ja que perden el seu tret característic, perden les gotetes de vitamina A, el REr es fa més gran, i l'aparell de Golgi es desenvolupa i es fa més complex (suggerint una síntesi de proteïnes activap És així com les CEH esdevenen activades. Un cop activades evolucionen cap a cèl·lules tipus miofibroblast amb un perfil d'expressió gènica totalment diferent al del seu estat quiescent.

### 2.3. El cicle vital de les CEH

Les CEH tenen la capacitat de dividir-se tant *in vivo* com *in vitro*. En un fetge normal i sa de rata però, és estrany observar proliferació (Geerts et al. 1991; Johnson et al. 1992p indicant que la majoria de CEH són cèl·lules amb una vida mitja llarga i arrestades a G<sub>0</sub> del cicle cel·lular. Tot i així, no hi ha evidències que ens indiquin quina vida mitja tenen realment les CEH. Serà després d'un dany hepàtic com una hepatectomia parcial, desenvolupament de granulomes, o altres condicions que condueixin a una fibrosi, quan es detectarà activitat proliferativa de les CEH *in vivo*.

Així doncs, sota condicions patològiques serà quan les CEH es transdiferenciaran cap a cèl·lules tipus miofibroblast amb capacitat proliferativa i productores de matriu. Durant aquest procés d'activació les CEH entren al cicle cel·lular, de manera que la matriu acumulada és el resultat d'un increment global del número de CEH conjuntament amb els canvis en l'expressió gènica de les mateixes. Aquest estadi però no serà el definitiu ja que encara hi haurà més canvis fenotípics causats pel dany hepàtic crònic. Les CEH activades són resistents a l'apoptosi, i

només quan l'insult al fetge desapareix serà quan les CEH es tornaran sensibles a estímuls apoptòtics i seran fagocitades, desapareixent així del teixit malalt (Issa et al. 2001p



**Figura 2:** El cicle vital de les CEH. Les CEH tenen la capacitat de dividir-se tant *in vivo* com *in vitro*, però aquest procés es dona rarament en un fetge normal. Seguint els varis insults que poden conduir a una fibrosi hepàtica, es detecta proliferació d'aquestes cèl·lules, juntament amb la seva transdiferenciació cap a cèl·lules tipus miofibroblast, les quals respondran a estímuls apoptòtics i per tant seran susceptibles a ser fagocitades i eliminades del teixit. (figura adaptada de (Geerts 2001pp

## 2.4. Heterogeneïtat i plasticitat de les CEH

L'anàlisi i caracterització del fenotip de les CEH ha posat al descobert la seva enorme heterogeneïtat i plasticitat en el fetge adult depenent de la seva localització lobular, l'espècie, o si el fetge està danyat o no.

Al 1984, el Dr. Yokoi va detectar desmina a les cèl·lules estrellades de rata (Yokoi et al. 1984p fet que les diferenciava dels altres fibroblasts. La desmina és un bon marcador per identificar cèl·lules estrellades en fetges de rosegadors, mentre que en humans les CEH són desmina negatives (Kawada 1997; Friedman et al 1992p Altres estudis mostraven una heterogeneïtat en l'expressió de desmina ja que mentre que un 70-80% de cèl·lules estrellades de rata expressen desmina, un 20-30% no (Ballardini et al. 1994p

L'actina de múscul llis o  $\alpha$ -SMA és una de les 6 isoformes expressades en teixits de mamífers, i la seva presència és típica de cèl·lules vasculares de múscul llis i de miofibroblasts (Gabbiani et al. 1981p La inducció de l'expressió d' $\alpha$ -SMA és el marcador més senzill i fiable per a l'activació de les cèl·lules estrellades ja que no es troba en cap altre població cel·lular resident del fetge, tant en fetges sans com danyats a excepció de les cèl·lules de múscul llis que es troben envoltant els grans vasos sanguinis (Friedman 2008ap

Degut a les observacions en que es posava de manifest la plasticitat de les cèl·lules estrellades, es va arribar a la conclusió de que aquest tipus cel·lular conté quantitats variables de vitamina A al seu interior, així com combinacions variables de filaments intracel·lulars depenent de la seva localització cel·lular, l'espècie en estudi, si el fetge està sa o danyat, o la pròpia naturalesa del dany. A més, s'ha descrit un continu de canvis en l'expressió gènica durant l'activació de les CEH que continua evolucionant cap a un model de cèl·lula tipus miofibroblast. Tot i això, les CEH activades es diferencien dels miofibroblast en el seu contingut vitamínic, la seva activitat contràctil, i en la seva capacitat de resposta enfront citocines com TGF- $\beta$ . Fins i tot quan les CEH arriben a una senescència replicativa, el patró d'expressió gènica continua evolucionant cap a un fenotip més inflamatori i menys fibrogènic (Friedman 2008a; Schnabl et al. 2002p

## **2.5. Activació de les cèl·lules estrellades hepàtiques**

La identificació de l'activació de les CEH com un esdeveniment clau en la fibrogènesi va proporcionar un marc per la conceptualització de la resposta hepàtica enfront un dany al fetge.

L'"activació" de les CEH es refereix a la conversió d'un estat quiescent cap a un estat proliferatiu, contràctil i fibrogènic. Tot i que hi ha evidències de que existeixen altres tipus cel·lulars que contribueixen a l'acumulació de MEC en el fetge, l'activació de les CEH és la via predominant que condueix a una fibrosi hepàtica.

El procés d'activació es pot subdividir en tres estadis:

1p Iniciació: o estat pre-inflamatori, es refereix als canvis primerencs que es donen en l'expressió gènica i el fenotip que converteix a les cèl·lules sensibles a altres citocines i estímuls.

2p Perpetuació: resulta dels efectes d'aquests estímuls per mantenir el fenotip activat i generant fibrosi. Comprèn processos com proliferació, contractilitat, fibrogènesi, degradació de la MEC, pèrdua de retinoids i alliberament de quimioquines que induiran el reclutament de cèl·lules inflammatòries.

3p Resolució: es donarà si el dany remet, i es refereix a les vies que conduiran a les CEH cap a l'apoptosi o bé que contribuiran a la seva reversió cap a un fenotip quiescent.

### 2.5.1. Iniciació

En la Iniciació, els estímuls paracrins que promouran els canvis primerencs en les CEH provenen majoritàriament dels tipus cel·lulars veïns com són els hepatòcits malmesos, les cèl·lules de Kupffer, les cèl·lules endotelials, i les plaquetes.

Les cèl·lules endotelials i les plaquetes seran una important font d'estímuls paracrins, les primeres per la seva participació en la conversió de TGF- $\beta$  latent a la seva forma activa, i les segones per l'alliberament de citocines com PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) TGF- $\beta$  i EGF (*Epithelial Growth Factor*). A més a més, les cèl·lules endotelials són capaces d'estimular la producció de fibronectina, la qual tindria un efecte activador i donaria senyals de supervivència a les CEH (Jarnagin et al. 1994; Rodríguez-Juan et al. 2009p

L'activació de les cèl·lules de Kupffer i la seva infiltració també contribueixen a l'activació de les CEH ja que estimularan la síntesi de matriu, la proliferació cel·lular, i la pèrdua de retinoids per part de les CEH a través de l'acció de TGF- $\beta$  principalment i d'intermediaris d'oxigen reactiu o peròxids lipídics (Bilzer et al. 2006p L'efecte d'aquests peròxids lipídics sobre la síntesi de col·lagen i proliferació de les CEH seria dosi dependent (Novo et al. 2006p

Els hepatòcits que entren en apoptosi després del dany hepàtic, també promouen la iniciació de l'activació de les CEH a través d'un procés mediat per

Fas i que també involucraria TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (Canbay, Friedman, et al. 2004p)

Amb aquesta petita mostra dels processos que es donen durant la Iniciació, podem dir que les CEH pateixen canvis fenotípics i d'expressió gènica al sensibilitzar-se a citocines i altres estímuls paracrins, canvis en la composició de la MEC, o per l'efecte disruptiu en les cèl·lules veïnes causat pel dany hepàtic.

### **2.5.2. Perpetuació**

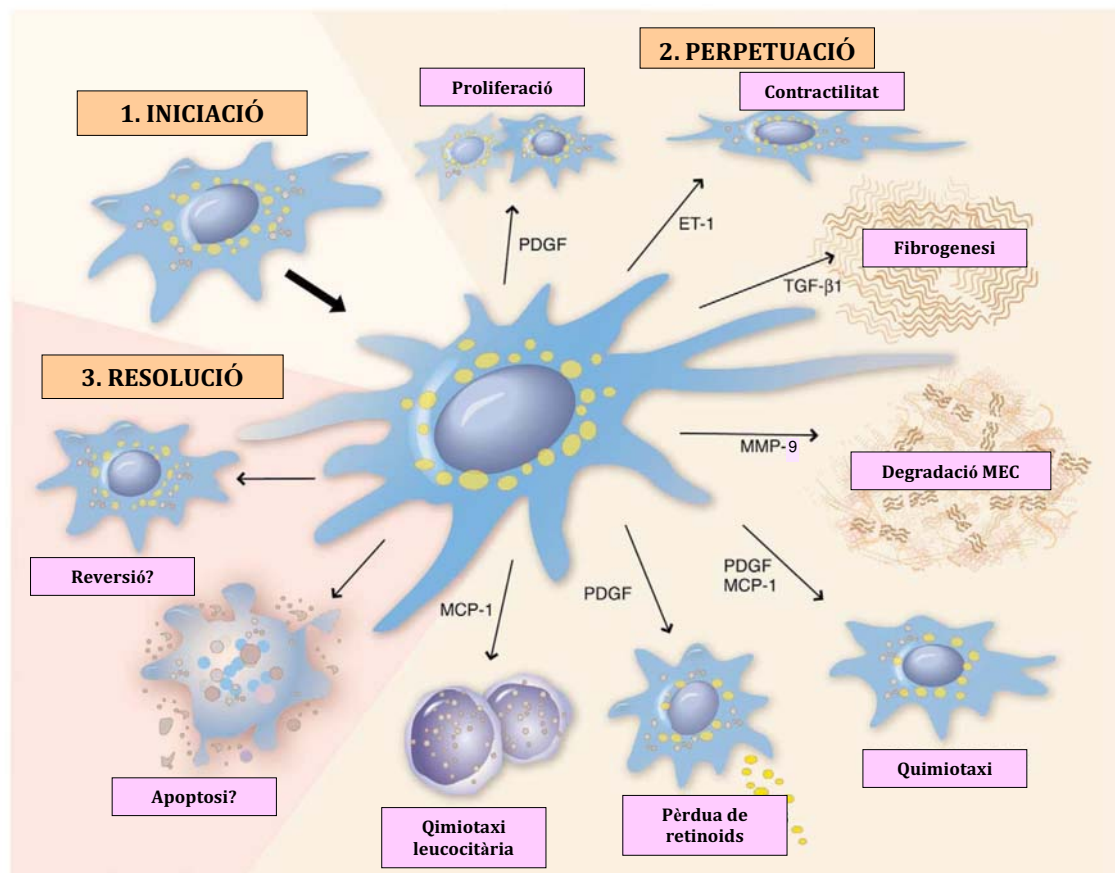
La perpetuació de l'activació de les CEH desencadena canvis fenotípics clau mediat per un augment dels efectes de les citocines i la remodelació de la MEC. Al donar-se una baixa densitat de matriu subendotelial, aquest espai anirà sent substituït progressivament per una matriu rica en col·lagen fibril·lar. Aquests canvis en la MEC afectaran al comportament de l'endoteli sinusoidal, dels hepatòcits, i de les pròpies CEH.

La perpetuació de les CEH inclou fins a 6 canvis en el comportament cel·lular: proliferació, quimiotaxi, fibrogènesi, contractilitat, degradació de la matriu extracel·lular, i pèrdua de retinoids.

#### **2.5.2.1. Proliferació**

El PDGF és el mitogen més potent per les CEH cultivades obtingudes de fetge de rata, ratolí i d'humà. La inducció primerenca del receptor de PDGF durant l'activació de les CEH augmenta la seva resposta cap al potent mitogen (Wong et al. 1994p Les fosfotirosines del receptor activat de PDGF serviran com a llocs d'unió d'alta afinitat per diverses molècules involucrades en la propagació del senyal, incloent l'activació seqüencial de Raf-1, MEK, i ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinase*). La translocació d'ERK al nucli anirà associada amb la fosforilació de factors de transcripció com Elk-1 i SAP, i representa un pas fonamental i imprescindible per a desencadenar la resposta proliferativa. PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) és una altra molècula reclutada pel receptor de PDGF activat. En les CEH humanes en cultiu, l'activació de PI3K és necessària tant per la mitogènesi com la quimiotaxi induïda per PDGF (Pinzani 2002p

Es coneixen altres compostos amb acció mitogènica per les CEH i amb un paper potencial en la fibrogènesi. Entre ells trobem EGF, TGF- $\beta$ , la trombina i els seus receptors, entre d'altres. Les vies de senyalització per aquests i altres mitògens han estat molt estudiats en les CEH oferint així molts punts per a potencials intervencions terapèutiques (Friedman 2008ap



**Figura 3:** Vies d'activació de les CEH durant el dany hepàtic i la seva resolució. Les CEH s'activen en resposta a dany hepàtic, i aquest procés comença amb la iniciació, que predisposa la cèl·lula a respondre davant citocines i estímuls de l'hoste. L'estadi de perpetuació comprèn una sèrie d'esdeveniments (mostrats en el dibuix que condueixen a un augment de la degradació de la matriu normal i l'acumulació de matriu fibril·lar. Durant la resolució de la fibrosi, el nombre de CEH disminueix per apoptosi i possiblement per reversió cap a un estat més quiescent (figura adaptada de (Friedman 2003pp

### 2.5.2.2. Quimiotaxi:

Les CEH s'acumulen en regions de dany hepàtic mitjançant una migració dirigida o quimiotaxi. S'han identificat diversos quimioatracients implicats, però els més destacats són el PDGF (Ikeda et al. 1999; Kinnman et al. 2000p



MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) (Marra et al. 1999p i CXCR3 (Bonacchi et al. 2001p entre d'altres. La quimiotaxi induïda per PDGF s'ha vist que va associada amb un augment de la formació de protrusions i un moviment del cos cel·lular cap al quimioattractant, juntament amb una retracció de les protrusions associades amb una fosforilació transitòria de la miosina (Melton & Yee 2007p Per altre banda, la producció de MCP-1 per part de les CEH serà capaç de reclutar monòcits, limfòcits i CEH activades. Aquest efecte és mediat per la via de senyalització de PI3K i requereix un influx de  $Ca^{2+}$  (Marra et al. 1999p

### **2.5.2.3. Fibrogènesi:**

Les CEH generen fibrosi no només proliferant i augmentant en número, sinó també augmentant la producció de MEC per cèl·lula. El component més estudiat de la MEC dipositada per les CEH és el col·lagen tipus I, l'expressió del qual és regulada tant transcripcionalment com post-transcripcionalment per un gran nombre d'estímuls i vies de senyalització (Lindquist et al. 2000; Tsukada et al. 2006p Tot i així, l'estímul més potent per la producció de col·lagen tipus I i altres components de la matriu per part de les CEH és el TGF- $\beta$ , que provindrà tant de fonts paracrines com autocrines. Les CEH són la font més important de TGF- $\beta$  en la fibrosi hepàtica (Gressner 1995p però altres tipus cel·lulars com les cèl·lules de Kupffer o les plaquetes també secreten aquesta citocina.

Així doncs, l'activació de les CEH va associada a un augment de la resposta a TGF- $\beta$ , i en conseqüència, a un augment de la síntesi de MEC .

### **2.5.2.4. Contractilitat:**

Durant l'activació de les CEH s'observa un augment de la capacitat contràctil d'aquestes cèl·lules, i això induïx un augment en la resistència portal del fetge. Així, les CEH activades impediran el flux sanguini portal per la constricció dels sinusoids i per la constricció del fetge cirròtic. L'adquisició del fenotip contràctil durant l'activació de les CEH deriva en part de receptors que interactuen amb la MEC. Tot i que molts estudis han implicat la senyalització de calci com a resposta a contractilitat induïda per

endotelina-1 (ET-1) (Pinzani et al. 1992) estudis recents contradiuen aquesta observació demostrant una força contràctil en les cèl·lules estrellades independent de calci (Melton et al. 2006)

La ET-1 és la citocina contràctil clau en les CEH. Les cèl·lules estrellades així com les cèl·lules de Kupffer i les cèl·lules endotelials produeixen també Òxid Nítric (NO) que és l'antagonista fisiològic de la ET-1. L'activitat contràctil neta de les CEH serà doncs el resultat de la força relativa dels dos factors oposats amb el balanç a favor de la ET-1 mentre progressi la malaltia hepàtica ja que a més a més d'haver-hi un augment en l'expressió d'ET-1, també es dona una disminució en l'expressió d'NO (Gupta et al. 1998; Friedman 2003) Així doncs, aquests dos factors seran els responsables de controlar la contractilitat en les CEH, juntament amb una extensa llista d'altres mediadors com la angiotensina II o la somatostatina.

#### **2.5.2.5. Degradació de la Matriu Extracel·lular:**

La fibrosi hepàtica reflecteix el balanç entre la producció de matriu i la degradació d'aquesta. La disrupció primerenca de la matriu normal del fetge per les proteases degradadores de matriu accelera la seva substitució per matriu cicatritzant, la qual tindrà efectes deleteris en la funció cel·lular. En el fetge existeixen dos tipus de degradació de la matriu:

ap Degradació patològica: responsable de la degradació de la matriu de baixa densitat en un fetge normal, i que empitjora la malaltia hepàtica.

bp Degradació restauradora: responsable de la degradació de l'excés de matriu cicatritzant en un fetge danyat, que ajudarà a restablir l'arquitectura normal del fetge.

Un element crític en la remodelació de la matriu són la família de les metal·loproteases o MMPs. Aquests enzims són dependents de calci, i contribueixen tan a la degradació patològica com a la degradació restauradora ja que degraden específicament col·lagen i altres substrats (Benyon & Arthur 2001) Aquests enzims es poden classificar en 6 classes segons l'especificitat pel seu substrat: col·lagenases, gelatinases, estromelisines, matrilisines, tipus membrana (MT-MMP) i altres enzims. Les

CEH són la principal font de MMP-2, MMP-9, MMP-13 (l'equivalent a MMP-1 en humans)

El major determinant de la progressió de la fibrosi és el fracàs en el procés de degradació de la matriu intersticial i cicatritzant. La MMP-1 és la proteasa més important capaç de degradar el col·lagen tipus I, el principal col·lagen en el fetge fibròtic. Les fonts que secreten aquest enzim no són massa clares, i tot i que s'ha observat que les CEH expressen mRNA de MMP-1, només se'n detecta una quantitat quasi inapreciable (Milani et al. 1994p Durant la degradació patològica, les MMP-2 i -9 degradaran col·lagen tipus IV, aconseguint alterar la matriu normal del fetge.

La regulació de l'activitat de les MMPs es dona a molts nivells entre els quals trobem la inactivació per la unió als inhibidors tissulars de metal·loproteases o TIMPs (Iredale 2001p o la regulació jeràrquica per altres metal·loproteases. Les CEH poden produir TIMP-1 i TIMP-2 funcional, i aquesta producció sostinguda durant el dany hepàtic podria inhibir l'activitat de col·lagenases intersticials conduint a una degradació reduïda de la matriu que s'aniria acumulant a causa del procés fibrogènic. A més a més, s'ha descrit que el TIMP-1 també seria antiapoptòtic per les CEH (Murphy et al. 2002pi d'aquesta manera, la seva expressió sostinguda faria que la població de CEH augmentés al prevenir-ne la seva mort i desaparició. La producció sostinguda de l'expressió de TIMP-1 és doncs una de les raons clau perquè la fibrosi pot seguir progressant.

Com hem vist fins ara, totes aquestes evidències indicarien que les pròpies cèl·lules estrellades contindrien o expressarien la gran majoria de molècules necessàries per activar o inhibir les metal·loproteases.

#### **2.5.2.6. Pèrdua de retinoids:**

La pèrdua de vitamina A en forma de retinoids és característica de l'activació de les CEH. No es coneix bé la funció d'aquest emmagatzematge de vitamina A, ni si la pèrdua d'aquests cúmuls de retinoids són un requeriment per l'activació de les CEH o si la prevenció d'aquesta pèrdua podria alterar la cascada d'activació de les CEH (Friedman 2008ap

### 2.5.3. Resolució

Durant la recuperació d'un dany hepàtic agut experimental o *in vivo* en humans, el número de cèl·lules estrellades activades decreix a mesura que el teixit es restableix i recupera la seva integritat. La resolució es pot donar mitjançant dos mecanismes:

- ap La reversió de l'activació de les CEH
- bp Eliminació per apoptosi de les CEH

#### 2.5.3.1. Reversió de l'activació de les CEH

Encara no es coneixen els mecanismes pels quals *in vivo* una cèl·lula estrellada activada pot revertir el seu fenotip cap a un estat quiescent similar a l'inicial i anterior al dany hepàtic. Tot i així, estudis *in vitro* demostren que les CEH es mantenen quiescents quan són cultivades en matriu de membrana basal (Matrigel) i a més, s'inhibeix l'activació de les mateixes quan es plauegen sobre aquesta superfície en estat altament activat. Aquest fet evidencia que les CEH són altament sensibles a la composició de la MEC que les envolta (Sohara et al. 2002p

#### 2.5.3.2. Eliminació per apoptosi de les CEH

Donat que la supervivència (i per tant la inhibició de l'apoptosi) de les CEH activades durant dany hepàtic depèn de factors de creixement solubles, components de la matriu fibrosa i citocines (Iredale 2001p) l'apoptosi seria la via per defecte a seguir per les CEH activades en un fetge normal sense cap *input* danyí. Aquesta mort vindria donada probablement per la disminució del nombre de cèl·lules estrellades activades durant la resolució de la fibrosi hepàtica, o bé pel restabliment de la matriu, i per tant per la manca de factors inductors de supervivència. Factors de supervivència com IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*) o TNF- $\alpha$  promourien la supervivència de les CEH a través de la via de senyalització de PI3K-Akt o de NF- $\kappa$ B, respectivament, de manera que aquests factors regularien l'activitat apoptòtica de les CEH.

També s'ha observat que l'activitat MMP-2 correlaciona estretament amb l'apoptosi de les CEH. També s'ha vist que la inhibició de la MMP-2 per

l'acció de TIMP-1 bloquejaria l'apoptosi davant d'estímuls proapoptòtics (Preaux et al. 2002; Murphy et al. 2002) Un altre possible estímul es podria donar a través de la cinasa FAK (*Focal Adhesion Kinase*) que té un paper important en l'activació de les CEH a través de senyals provinents de la MEC, i la disminució de la qual jugaria un rol important en l'eliminació de les CEH mitjançant la inducció d'apoptosi a través de la via de senyalització de la caspasa-3 i Bcl-2/Bax (An et al. 2011)

Per altre banda, hi ha un nombre creixent d'estímuls que poden induir directament l'apoptosi de les CEH. Un dels estímuls proposats és l'aparició, en les CEH activades, de receptors de superfície com Fas (Saile et al. 1997) o bé l'aparició del receptor del factor de creixement nerviós (NGFR) (Trim et al. 2000) que al unir-se als seus respectius lligands estimularien l'apoptosi de les CEH. Un altre d'aquests estímuls s'induiria per les cèl·lules NK (*Natural Killers*) actives a través de TRAIL (Radaeva et al. 2006) També donen suport al paper antifibròtic de les NK altres estudis on s'observava una fibrosi molt més gran en ratolins deficients en cèl·lules NK (Melhem et al. 2006) i estudis fets en humans infectats amb el virus de la hepatitis C (Morishima et al. 2006)

Tots aquests estudis indiquen que una acceleració de l'apoptosi de les CEH activades seria un objectiu potencial per a teràpies anti-fibròtiques.

### 3. LES METAL·LOPROTEASES

Les malalties cròniques del fetge són causa de morbiditat i mortalitat arreu del món degut a complicacions hemodinàmiques i metabòliques de la cirrosi hepàtica. Durant aquestes patologies es dona un procés de remodelació de la matriu extracel·lular, al temps que es dona la formació i deposició de noves fibres de col·lagen. La remodelació del teixit hepàtic està regulat per mecanismes moleculars que involucra proteases, inhibidors i factors de creixement. El principal paper en la degradació de la matriu el protagonitzen les metal·loproteases (MMPs) i els seus inhibidors específics (TIMPs)

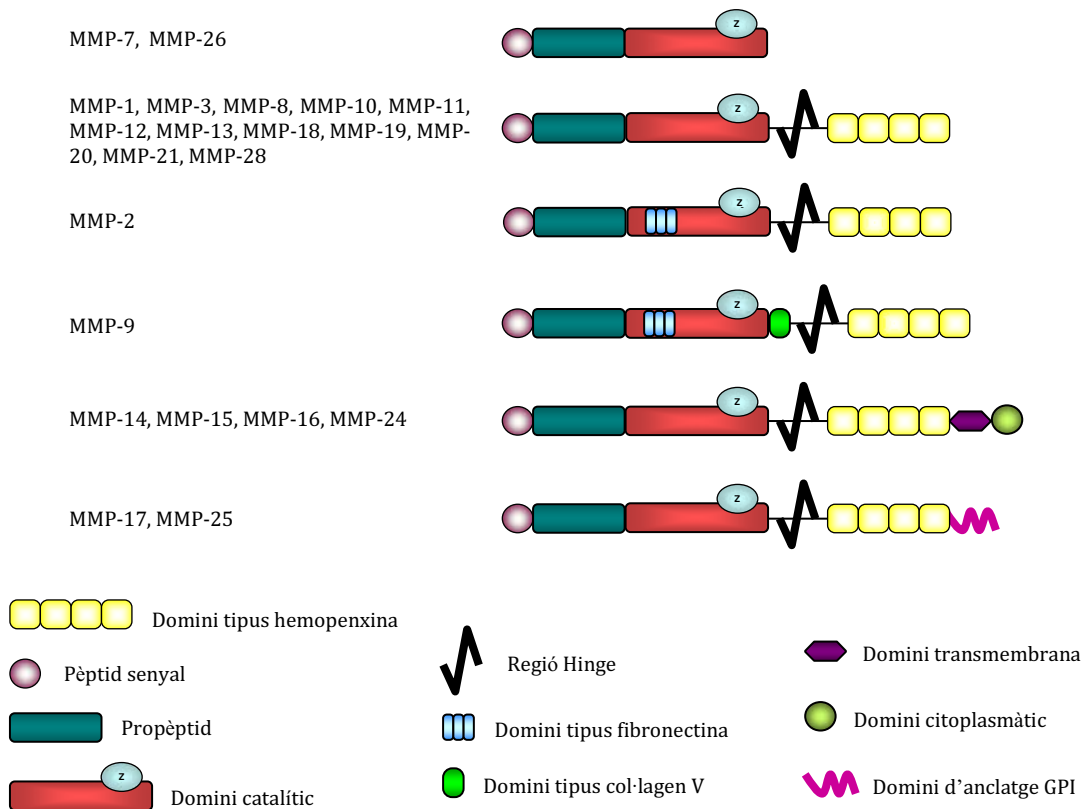
La MEC que s'observa durant malalties hepàtiques cròniques és diferent tant quantitativament com qualitativament respecte la matriu fisiològica present en un fetge sa. Entre els tipus cel·lulars que participen en la remodelació de la MEC, les CEH ocupen la primera posició. Un cop activades participen activament en la remodelació de la matriu produint diferents tipus de col·lagen per una banda, i per l'altre produint MMPs. D'aquesta manera les CEH influencien tant en la progressió de la fibrosi com en la seva resolució.

### **3.1. Estructura i activació de les MMPs**

Les metal·loproteases de matriu són una gran família d'enzims dependents de calci. Són endopeptidases responsables de la degradació de proteïnes de la matriu extracel·lular. Com moltes altres proteases, són produïdes com a formes inactives o zimògens sent activades finalment quan són alliberades des de la cèl·lula cap al citoplasma.

Les MMPs són secretades com a zimògens que seran activats mitjançant el trencament del seu propèptid. En la Figura 4 es mostra una visió general de l'organització de les diferents MMPs. Les MMPs tenen característiques estructurals comunes entre les que trobem un domini propèptid, un domini catalític que conté zinc, i un domini tipus hemopexina. En els zimògens el lloc catalític es troba inaccessible al substrat donat que el domini propèptid cobreix el lloc catalític prevenint la interacció amb el substrat. Durant l'activació del zimogen el propèptid es separa mitjançant trencament proteolític, i el lloc catalític queda descobert i accessible pel substrat. La majoria de MMPs tenen diferents dominis tipus hemopexina al costat del domini catalític. Aquesta estructura permet a les MMPs interactuar específicament amb els seus inhibidors o TIMPs.

S'han descrit fins al moment quatre TIMPs diferents: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, i TIMP-4. Totes les MMPs conegudes poden ser inhibides per al menys un dels quatre TIMPs descrits, amb diferències individuals en quan a la força d'unió i a la magnitud d'inhibició que poden exercir segons la MMP en particular. Entre els diferents TIMPs, s'ha descrit que TIMP-1 té un paper fonamental en la fibrosi hepàtica (Hemmann et al. 2007p



**Figura 4:** Organització dels diferents dominis de varis subtipus de MMPs. El domini catalític té unida una partícula de  $Zn^{2+}$  (bola blau clarp GPI (Glucosilfosfatidilinositol o *Glycosilphosphatidylinositol*) (figura adaptada de (Somerville et al. 2003; Hemmann et al. 2007))

Així doncs, els TIMPs s'uneixen a les MMPs mitjançant el reconeixement de dos llocs diferents: un localitzat al domini tipus hemopexina, i l'altre en el lloc catalític de la MMP. La funció dels TIMPs no és únicament bloquejar l'activitat proteasa de les MMPs, sinó que també poden modular la seva funció.

L'activació de les MMPs requereix un doble trencament proteolític en la regió N-terminal, on es troba el propèptid. El primer trencament el pot dur a terme qualsevol proteasa activada com la plasmina, o altres serin-proteases. En aquesta fase s'allibera un pèptid curt quedant al descobert una nova seqüència d'aminoàcids accessible pel segon trencament. Aquest segon trencament proteolític l'ha dur a terme una MMP ja activada, així s'allibera un nou pèptid curt i la MMP queda totalment activada amb el seu lloc catalític al descobert, i lliure per interaccionar amb el substrat (Consolo et al. 2009) Els TIMPs ajuden a aquest procés unint-se als dominis hemopexina de les diferents MMPs, permetent-les quedar prou a prop per poder interactuar i activar entre elles (Will et al. 1996)

La concentració d'inhibidors TIMPs i el quocient MMPs/TIMPs són crítics per determinar l'activitat proteasa. D'aquesta manera, baixes concentracions de TIMP o un quocient elevat MMPs/TIMPs permetria l'activació de MMPs, mentre que altes concentracions de TIMP conduiria a la inhibició de l'activació de MMPs (Nagase et al. 2006p)

### 3.2. Les diferents famílies de MMPs

Les diferents MMPs es poden classificar segons la seva especificitat de substrat. Tot seguit adjuntem una taula amb les MMPs descrites fins al moment, amb els seus noms alternatius i els principals substrats que degraden (Figura 5p)

### 3.3. Les metal·loproteases i la fibrosi hepàtica

Les MMPs són una família de proteases capaces de degradar qualsevol matriu extracel·lular. Moltes d'aquestes MMPs no s'expressen en teixits sans, però la seva expressió s'indueix en resposta a dany tissular causat per un traumatisme, una infecció o per toxines. Citocines inflamatòries com TNF- $\alpha$  i IL-1 (*Interleukin 1p*) són els inductors més potents per a la majoria de MMPs secretades (Yan et al. 2008p)

Les CEH activades a causa d'un dany hepàtic expressen una combinació de varies MMPs i TIMPs en les diferents fases de la malaltia. En les fases primerenques de la fibrosi les CEH expressen de manera transitòria MMP-3, MMP-13 i l'activador de l'uoplasminogen (uPAp) i mostren un fenotip de degradació de matriu (Benyon & Arthur 2001p). En estadis més avançats del dany hepàtic el patró d'expressió canvia i expressen una combinació de MMPs capaces de degradar la matriu normal del fetge (MMP-9, MMP-2, MT1-MMP, etc.) mentre que s'inhibeix la degradació del col·lagen fibril·lar que es va acumulant en la fibrosi hepàtica a través de l'expressió de TIMP-1 que inhibirà l'acció de les MMP-1/MMP-13. La regressió de la fibrosi es caracteritza per l'augment de les MMPs tipus col·lagenasa que induiran la degradació de la matriu dipositada durant la fibrosi, contribuint així a la regressió de l'afectació hepàtica (Kisseleva & Brenner 2006p)



<b>Classe</b>	<b>Nom alternatiu</b>	<b>Substrats (alguns, no tots)</b>
<b><i>Col·lagenases</i></b>		
MMP-1	Collagenase-1	Col·lagen III > I, II, gelatina, caseïna, agregans
MMP-8	Neutrophil collagenase	Col·lagen I > III, II, agregans, laminina, nidògen
MMP-13	Collagenase-3	Col·lagen II > III, I, X, agregans, fibronectina
<b><i>Gelatinases</i></b>		
MMP-2	Gelatinase-A	Col·lagen IV, V, I, gelatina, elastina, laminina
MMP-9	Gelatinase-B	Com la MMP-2
<b><i>Estromelisinés</i></b>		
MMP-3	Stromelysin-1	Col·lagen III, IV, V, IX, gelatines, fibronectina, laminina, proteoglucans, nidògen. Activa MMP-1
MMP-10	Stromelysin-2	Com la MMP-3
MMP-11	Stromelysin-3	Laminina. Activitat dèbil contra proteïnes de matriu
MMP-27	Homolog a Stromelysin-2	
<b><i>Matrilisines</i></b>		
MMP-7	Matrilysin PU MP	Proteoglucans, elastina, fibronectina, caseïna
MMP-26	Matrylisin-2	Col·lagen IV, fibronectina, caseïna, fibrinògen
<b><i>Tipus</i></b>		
<b><i>Membrana</i></b>		
MMP-14	MT1-MMP	Col·lagen I,II,III, fibronectina, fibrinògen. Activa MMP-2 i MMP-13
MMP-15	MT2-MMP	Fibronectina, laminina. Activa MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	Col·lagen III, fibronectina, agregans, caseïna
MMP-17	MT4-MMP	Gelatina, fibrinògen, fibrina. Activa TNF- $\alpha$
MMP-24	MT5-MMP	Gelatina, proteoglucans Activa MMP-2
MMP-25	MT6-MMP	Col·lagen IV, gelatina, fibronectina. Activa MMP-2
<b><i>Altres enzims</i></b>		
MMP-12	Metalloelastase	Elastina, laminina, col·lagen IV, gelatina
MMP-19	RASI 1	Col·lagen I, IV, agregans, laminina
MMP-20	Enamelysin	Amelogenina, agregans, proteïna del cartílag
MMP-21	MMP-23A	$\alpha_1$ -antitripsina
MMP-22	MMP-23B	
MMP-23	CA-MMP	Gelatina
MMP-28	Epilysin	Casseïna

**Figura 5:** Classificació de les metal·loproteases.

### 3.3.1. La MMP-2 i la MMP-9 en les malalties hepàtiques

La MMP-2 i la MMP-9 són les gelatinases més comuns, però tenen diferents característiques. Es poden distingir pel fet que la MMP-2 s'uneix preferentment amb l'inhibidor TIMP-2, el qual és necessari també per la seva activació, mentre que la MMP-9 és inhibida preferentment pel TIMP-1 (Baker et al. 2002p

La MMP-2 ha estat implicada en varies patologies com malalties cardíaques (Schulz 2007p aneurismes (Thompson & Cockerill 2006p o càncers de pròstata, estómac o de mama (Jezierska & Motyl 2009p i sempre amb implicacions negatives convertint-se així en una diana terapèutica o bé en un marcador de la malaltia en particular. En relació al fetge, tot i que se l'ha vist implicada, juntament amb la MMP-9, en la degradació patològica de la matriu extracel·lular, estudis recents l'han implicat en processos que serien més aviat beneficiosos per a l'organisme i la seva recuperació durant o després d'un dany hepàtic. Al 2009, Hartland *et al* observaven que la MMP-2 activa promovia, mitjançant el trencament de la N-cadherina, l'apoptosi de les CEH, i d'aquesta manera s'aturava el progrés de la fibrosi (Hartland et al. 2009p Al 2011, dos estudis independents, els quals usaven ratolins *knockout* de la MMP-2, mostraven que aquesta falta, aquesta pèrdua de la MMP-2 reduïa la incidència de la fibrogènesi en els animals, suggerint així un paper protector més que patològic per aquesta metal·loproteasa (Radbill et al. 2011; Onozuka et al. 2011p

La MMP-9 també ha estat implicada en malalties com pneumònia (Chiang et al. 2011p asma (Hong et al. 2011p o càncer (Zhang et al. 2011p (Al-Batran et al. 2011p (Kang et al. 2011p entre d'altres. En quan a hepatopatologies, varis són els estudis que s'han centrat en la MMP-9 com a factor a tenir en compte en la fibrogènesi o la fallida hepàtica aguda, entre d'altres.

Al 2008, Yan et al (Yan et al. 2008p mostraven en un estudi que la depleció de MMP-9 protegeix enfront de dany hepàtic i hepatitis fulminant. Aquests estudis van evidenciar que la MMP-9 s'expressa àmpliament en fetges d'animals control (*wild type*)p i que la seva presència disminuïa acusadament en fetges d'animals deficients en el receptor d'IL-1, però mostrava una disminució més moderada en ratolins deficients en els receptors de TNF (TNFR-DKO) p A més, demostraven

que les CEH són el principal tipus cel·lular productor de MMP-9 en el seu model de fallida hepàtica aguda.

Dos anys abans, al 2006, Roderfeld et al (Roderfeld et al. 2006) van provar fent servir uns ratolins mutants amb la MMP-9 inactivada proteolíticament, que la falta d'aquesta metal·loproteasa inhibeix la fibrosi hepàtica en ratolí i que aquest efecte antifibròtic era clarament causat per l'apoptosi de les CEH.

Al mateix any, Olle et al (Olle et al. 2006) van evidenciar en un estudi fet amb ratolins deficients en MMP-9 (MMP9-KO) que aquesta metal·loproteasa juga un paper molt important en la regeneració hepàtica després d'hepatectomia parcial, donat que els ratolins MMP9-KO evidenciaven un retard en la regeneració del fetge, i una menor expressió de citocines importants per aquest procés.

#### **4. TNF- $\alpha$ i ELS SEUS RECEPTORS**

Fa més de 100 anys, el doctor William B. Coley va descriure un inductor responsable de la resposta antitumoral del sistema immune que observava *in vivo* (Wajant et al. 2003) Més de mig segle després, es va identificar aquest inductor com a una citocina soluble anomenada Factor de Necrosi Tumoral o TNF produïda pel sistema immune, i capaç d'exercir citotoxicitat en diverses línies cel·lulars tumorals i causar necrosi tumoral en certs models animals (Wajant et al. 2003)

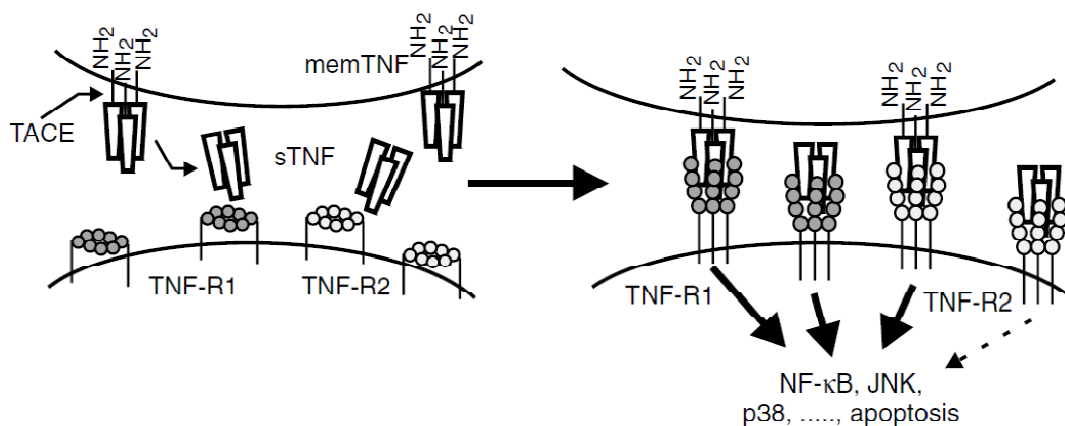
El TNF- $\alpha$  funciona com una espasa de doble tall en el fetge ja que pot tenir funcions tant anti-apoptòtiques com pro-apoptòtiques. Així doncs, es requereix TNF per a la proliferació normal dels hepatòcits durant la regeneració hepàtica, i també actuar tant com a co-mitogen o com a inductor de la transcripció de NF- $\kappa$ B el qual té efectes anti-apoptòtics. Per altre banda, el TNF és un mediador d'hepatotoxicitat habitual en molts models animals, i també s'ha vist implicat com a mediador patogènic en pacients amb malaltia hepàtica alcohòlica i hepatitis viral.

#### 4.1. El lligand TNF i els seus receptors

El TNF- $\alpha$  és una potent citocina produïda per molts tipus cel·lulars incloent macròfags, monòcits, limfòcits, queratinòcits i fibroblasts, en resposta a inflamació, infecció, dany i altres reptes de l'organisme. El TNF- $\alpha$  produeix un ampli espectre de respostes cel·lulars com ara l'activació i migració de limfòcits i leucòcits, febre, proliferació cel·lular, diferenciació i apoptosi (Baud & Karin 2001p

El TNF- $\alpha$  pertany a una família de lligands (entre ells: TNF- $\alpha$ , limfotoxina- $\alpha$ , limfotoxina- $\beta$ , lligand Fas, CD27L, etc.) que activen estructuralment a proteïnes receptores conegudes com a la superfamília de receptors de TNF.

El TNF- $\alpha$  es produeix principalment com una proteïna transmembrana de tipus II organitzada en homotrímerns estables (Tang et al. 1996p L'enzim TACE (*TNF-alpha converting enzyme*) amb acció metal·loproteasa, produeix un trencament proteolític del TNF integrat a la membrana (memTNF) de manera que es forma la citocina homotrimèrica soluble (sTNF) (Black et al. 1997p



**Figura 6:** Tant el TNF unit a membrana (memTNF) com el TNF soluble (sTNF) s'uneixen als dos receptors de TNF, TNFR1 i TNFR2. Mentre el memTNF activa els dos receptors, el sTNF estimula principalment al TNFR1, i té capacitat senyalitzadora limitada en el TNFR2 (figura modificada de (Wajant et al. 2003pp

Els membres de la família de lligands TNF exerceixen les seves funcions biològiques a través de la interacció amb els seus receptors de membrana entre els quals trobem la família de receptors de TNF (TNF-Rp). Tant el TNF ancorat a membrana com el TNF soluble interactuen amb dos receptors, el receptor 1 de TNF (TNFR1 o p55/60p) i el receptor 2 de TNF (TNFR2 o p75/80p).

Tant el TNFR1 com el TNFR2 contenen 4 repeticions riques en cisteïna en els seus dominis extracel·lulars, i formen unes estructures elongades que interactuaran amb el lligand trimèric. La trimerització dels receptors dependent de lligand va ser considerada durant molt de temps com l'esdeveniment clau per a l'inici de la senyalització. Tot i així, l'activació inicial dels receptors ara apareix com un procés més complicat ja que els dominis rics en cisteïnes distals dels dos receptors TNFR1 i TNFR2 medien interaccions homofíliques de molècules de receptor en absència de lligand. Aquests dominis d'assemblatge pre-unió del lligand o PLAD (*Preligand binding assembly domain*) mantindrien els receptors en un estat silenciós homomultimèric que antagonitzaria l'activació espontània (freqüentment observada durant una sobreexpressió) (Wajant et al. 2003)

El TNFR1 s'expressa constitutivament en la majoria de teixits, mentre que l'expressió de TNFR2 està altament regulada i es troba típicament en cèl·lules del sistema immune. Així doncs, en la gran majoria de cèl·lules el TNFR1 apareix com el mediador clau per a la senyalització de TNF, mentre que en el sistema limfoide el TNFR2 sembla jugar el paper més important. De tota manera, la senyalització a través de TNFR2 només pot tenir lloc mitjançant la unió del lligand TNF ancorat a membrana o memTNF, i no pel TNF soluble (Grell et al. 1995). De la mateixa manera que el memTNF, el TNFR2 també és proteolitzat per l'enzim TACE (Solomon et al. 1999). L'enzim proteolític responsable de la fragmentació de TNFR1 encara no està ben definit, però és un pas important en la regulació de la resposta al TNF cel·lular, ja que les mutacions que fan resistents a la proteòlisi de TNFR1 estan relacionades amb síndromes autoinflamatòries d'herència dominant (McDermott et al. 1999)

El TNF- $\alpha$  és produït principalment per macròfags, però també per una àmplia varietat d'altres teixits i tipus cel·lulars incloent les cèl·lules limfoides, mastòcits, cèl·lules endotelials, hepatòcits, fibroblasts i teixit neuronal. Grans quantitats de TNF soluble són alliberats en resposta a LPS i altres productes bacterians. En concert amb altres citocines el TNF és considerat el factor clau en el desenvolupament del xoc sèptic (Männel & Echtenacher 2000). Així doncs, mentre que altes concentracions de TNF indueix símptomes de tipus xoc sèptic, l'exposició prolongada a baixes concentracions de TNF pot resultar en una caquèxia (anorexia, astenia, anèmia)

TNF- $\alpha$  exerceix un ampli espectre d'activitats biològiques i la majoria de cèl·lules responen, encara i que sigui mínimament, davant de l'estimulació amb TNF. En general, TNF es pot considerar el mediador proinflamatori més important amb capacitat d'induir apoptosi, i tal i com es comenta, TNF mostra una dualitat funcional ben descrita estant fortament compromès tant en el procés regeneratiu com en l'apoptòtic.

#### 4.2. Vies de senyalització de TNFR1 i TNFR2

Després de la unió de TNF- $\alpha$ , els receptors de TNF experimenten un canvi conformacional que els permet el reclutament de molècules adaptadores que iniciaran l'activació de vies de senyalització intracel·lulars.

La regió intracel·lular de TNFR1 conté un motiu conservat d'interacció proteïna-proteïna d'uns 80 aminoàcids anomenat "domini de mort" (*death domain*) que interactua amb la molècula adaptadora TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) que conté un domini de mort similar. La unió de TNFR1 a TRADD serveix com a plataforma d'assemblatge per la unió de TRAF2 (*TNF- $\alpha$  receptor-associated factor 2*) i RIP (*receptor-interacting kinase*) i la molècula adaptadora FADD (*Fas-associated death domain*) (Wajant et al. 2003). En contrast, el receptor TNFR2 no conté el domini de mort i interactua directament amb TRAF2. L'activació de TNFR1 i el conseqüent reclutament de proteïnes adaptadores, pot conduir a l'activació de NF- $\kappa$ B, JNK i p38 a través de RIP i TRAF2, mentre que l'activació de caspases i l'apoptosi és donada a través de FADD (Schwabe & Brenner 2006).

Tot i que el TNFR2 activa exclusivament vies pro-inflamatòries i no indueix apoptosi, el *cross-talk* (intercomunicació) entre els senyals induïts per TNFR1 i TNFR2 poden modular els efectes induïts per TNFR1, com l'apoptosi. D'aquesta manera, el receptor TNFR2 pot influir en la mort cel·lular induïda per TNFR1 per varis mecanismes:

- ap disminuint la disponibilitat de TRAF2 després d'unir-se a TNFR2,
- bp induint la degradació de TRAF2 a través de mecanismes mediat per cIAP (*Cellular inhibitor of apoptosis*),
- cp activant de manera prolongada JNK a través de TNFR2,

de secreció de TNF- $\alpha$  induïda per TNFR2.

Tot i aquesta intercomunicació, el paper de TNFR2 en la fisiopatologia del fetge segueix sent motiu d'estudi.

L'apoptosi induïda per TNFR1 es creu que es dona a través del reclutament de FADD i caspasa-8 en el complex del receptor. TNFR1 també pot activar NF- $\kappa$ B i promoure supervivència. El mecanisme pel qual es pren la decisió entre mort cel·lular i supervivència no està del tot descrit. El grup de Micheau et al., descriuen que l'apoptosi induïda pel TNFR1 involucra dos complexos de senyalització seqüencials. El complex I unit a membrana consisteix en el TNFR1, TRADD, RIP1 i TRAF2, que senyalitzen ràpidament cap a l'activació de NF- $\kappa$ B. En un segon pas, TRADD i RIP1 s'associen amb FADD i la caspasa-8 formant el complex II citoplasmàtic. Quan NF- $\kappa$ B és activat pel complex I, el complex II recluta l'inhibidor de la caspasa-8, FLIP, i la cèl·lula sobreviu. Així doncs, la transducció de la senyal induïda per TNFR1 inclou un punt de control on el resultat pot ser la mort cel·lular (via complex II) en els casos en que la senyalització inicial (via complex I, NF- $\kappa$ B) no pugui ser activada (Micheau & Tschopp 2003)

#### 4.2.1. Via de senyalització de NF- $\kappa$ B

Les proteïnes de la família NF- $\kappa$ B estan involucrades en l'activació transcripcional d'un gran nombre de gens inflamatoris en resposta a citocines com TNF- $\alpha$  o IL-1, productes bacterians, llum UV o espècies reactives de l'oxigen (*Reactive oxygen species* o ROS). Totes les evidències indiquen que NF- $\kappa$ B induïx factors anti-apoptòtics.

En un estat no induït, les proteïnes cel·lulars I $\kappa$ B interactuen amb dímers NF- $\kappa$ B retenint-lo en el citoplasma. El TNF- $\alpha$ , juntament amb altres estímuls, pot estimular la degradació proteolítica d'I $\kappa$ B, i ho fa reclutant, a través de RIP/TRAF2, el complex IKK (*I $\kappa$ B Kinase*) que al seu temps fosforilarà I $\kappa$ B. Aquesta fosforilació marcarà a I $\kappa$ B per ser reconegut pel complex ubiquitinitzador que l'enviarà al proteosoma on serà degradat. Així doncs, al ser eliminat I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B quedarà lliure al citosol, podrà translocar-se al nucli i donarà el senyal perquè es transcrivin gens anti-apoptòtics com cIAP.

#### 4.2.2. Via de senyalització de mort cel·lular

La via més acceptada per la qual TNF- $\alpha$  pot desencadenar apoptosi és la que involucra FADD. El complex TRADD-RIP-TRAF2 reclutat per TNFR1, s'internalitzarà cap al citosol i reclutarà FADD. Aquest complex citosòlic desencadenarà apoptosi via l'activació de caspasa-8, caspasa iniciadora, amb la subseqüent disfunció mitocondrial, que produirà alliberament de citocrom *c* i desembocarà en mort cel·lular (Wullaert et al. 2006; Wajant et al. 2003p

La via de NF- $\kappa$ B pot intersecar amb la via d'apoptosi a través de la inducció d'inhibidors cel·lulars d'apoptosi (cIAPp els quals funcionen com a inhibidors específics de caspases efectores (caspasa-3 i -7p(Deveraux & Reed 1999p A més, un dels gens diana de NF- $\kappa$ B és c-FLIP (*cellular FLICE inhibitory proteimp* que un cop activat, és capaç d'inhibir el procés apoptòtic mitjançant la inhibició de caspasa-8. Tot i així, també hi ha evidències que indiquen que una activació prolongada de JNK (*c-Jun N-terminal kinases* induceix la ubiquïtinació de c-FLIP, i per tant la seva degradació pel proteasoma. En absència de c-FLIP la via citotòxica pot procedir, causant així apoptosi (Schwabe & Brenner 2006p

En alguns tipus cel·lulars (tipus I) la caspasa-8 processada activa directament altres membres de la família de les caspases disparant així l'execució de l'apoptosi a la cèl·lula. Per altra banda, en altres tipus cel·lulars (tipus II) el complex DISC comença un cicle de retroalimentació que condueix a l'alliberació de factors pro-apoptòtics de la mitocòndria i l'activació amplificada de la caspasa-8 (Scaffidi et al. 1998p

#### 4.3. TNF- $\alpha$ i els seus receptors en la fibrosi hepàtica

El TNF ha estat implicat en el desenvolupament de la majoria de malalties cròniques del fetge, i la fibrosi hepàtica és el tret distintiu de la progressió de la malaltia. S'han observat nivells elevats de TNF- $\alpha$  hepàtic tant en danys hepàtics aguts i crònics com en la fallida hepàtica fulminant, hepatitis viral, abús d'alcohol, síndrome metabòlic, obstrucció biliar, així com hepatotoxicitat induïda per agents químics com el tetraclorur de carboni (CCl<sub>4</sub>), dimetilnitrosamina, o tioacetamida. Així doncs es recolza la idea de que TNF- $\alpha$  seria el mediador d'hepatotoxicitat més important (Faubion & Gores 1999p però tot i que la contribució de TNF a la



inflamació i al dany hepatocel·lular s'ha estudiat àmpliament (Bradham et al. 1998; Schwabe & Brenner 2006; Wullaert et al. 2006; Han et al. 2009) la seva contribució específica a l'activació de les CEH i a la fibrogènesi hepàtica segueix sent controvertida.

En aquest sentit, estudis experimentals fets amb un model animal deficient en els receptors de TNF, indicaven que després de tractar aquests animals amb CCl<sub>4</sub>, els animals deficients en el TNFR1 (TNFR1 KO) o bé deficient pels dos receptors (TNFR1/R2 KO o TNFR-DKO) mostraven una fibrosi hepàtica reduïda, acompanyada per una reducció en l'expressió de pro-col·lagen tipus 1 (Simeonova et al. 2001; Sudo et al. 2005). Aquests experiments suggerien doncs un paper pro-fibrogènic pel TNF- $\alpha$ .

Per altre banda, un estudi molt recent mostra que la inhibició del processat de TNF fet per l'enzim TACE, atenua el dany hepàtic i la inflamació després de l'administració de CCl<sub>4</sub>, però augmenta la deposició de col·lagen, és a dir la fibrosi, i reproduïx aquests efectes en ratolins TNFR-DKO (de Meijer et al. 2010). A més a més, molts altres estudis que utilitzen com a model les CEH en cultiu, també apunten cap a un paper anti-fibrogènic de TNF mitjançant la inhibició de l'expressió gènica del pro-col·lagen tipus I (Hernández-Muñoz et al. 1997; Houglum, Buck, Kim & Chojkier 1998a; Solis-Herruzo et al. 1988) degut en part a la depleció de l'antioxidant glutatió (Varela-Rey et al. 2007).

## 5. LES CATEPSINES

Les proteases són enzims amb activitat proteolítica implicats en la regulació de diversos processos biològics com mort cel·lular, recanvi de proteïnes, proliferació, migració i invasió. Aquests enzims proteolítics es classifiquen en 5 grups en funció del seu mecanisme catalític: aspartat, cisteïna, metal·lo, serina i treonina proteases. Al seu temps també es poden subdividir en exopeptidases, enzims que poden actuar prop del final de la cadena polipeptídica, i endopeptidases, capaces de trencar unions internes (Chwieralski et al. 2006).

Des del 1920 el terme "catepsina" serveix per anomenar els enzims proteolítics lisosomals. La família de les catepsines inclou tres grups: les serin catepsines (catepsines A i G) les aspartil proteases (catepsines D i E) i les cistein catepsines (catepsines B, C, F, H, K, L, O, S, V, X i W). Algunes d'aquestes catepsines, com per exemple la catepsina B o la D, tenen una expressió constitutiva i ubiqüa, mentre que d'altres, s'expressen en tipus cel·lulars més específics, com la catepsina K en els osteoclasts (Costa et al. 2011) o la catepsina S en cèl·lules immunitàries (Staun-Ram & Miller 2011).

Les catepsines són sintetitzades com a proenzims inactius que seran glucosilats post-translacionalment i dirigits cap al compartiment lisosomal mitjançant receptors de manosa-6-fosfat. El processat del proenzim inactiu cap a l'enzim catalíticament actiu es dona normalment dins el lisosoma, i d'aquesta manera quan és alliberat del lisosoma ja és una catepsina totalment activa que no requerirà cap altre canvi conformacional (Conus & Simon 2008). La majoria de les catepsines són endopeptidases, amb l'excepció de les catepsines C i X que són exopeptidases.

A part de la seva principal funció en el reciclatge de proteïnes lisosomals, s'ha observat que les catepsines estan involucrades en diversos processos fisiològics i patològics com la diferenciació de queratinòcits, progressió tumoral i metastasis, artritis reumatoide, així com aterosclerosi (Vasiljeva et al. 2007). En contrast, el seu paper en apoptosi ha estat descobert més recentment (Vasiljeva et al. 2007; Guicciardi et al. 2000). Un requisit per la seva funció pro-apoptòtica és que la catepsina sigui alliberada del lisosoma al citosol tant per desestabilització lisosomal (LMP o *Lysosomal membrane permeabilization*) (Boya et al. 2003) El factor clau per determinar el tipus de mort cel·lular (apoptosi vs necrosi) mediada pels enzims lisosomals seria doncs la magnitud de la permeabilització lisosomal i en conseqüència, la quantitat d'enzims proteolítics alliberats en el citosol. Una completa disrupció dels lisosomes amb l'alliberament d'altres concentracions dels enzims lisosomals en el citosol resulta en necrosi, mentre que una permeabilització parcial i selectiva condueix cap a apoptosi (Guicciardi et al. 2004).

Així doncs, les catepsines poden ser perjudicials per les cèl·lules i els teixits si no estan sota control. És per això, que donat a que les catepsines poden mostrar una expressió alterada (com la regulació a l'alça observada en càncer i metàstasi) modificació de la seva localització original (secreció augmentada fora de les cèl·lules) i de l'activitat proteolítica, han estat sovint involucrades en diverses patologies (Conus & Simon 2008). Es creu que la desregulació de l'activitat de les catepsines seria la causa o un factor que contribuiria a malalties com el càncer, aterosclerosi, asma bronquial, malaltia d'Alzheimer, o fibrosi pulmonar, entre d'altres, mostrant així la importància biològica d'aquestes proteases lisosomals (Conus & Simon 2008).

En aquesta part de la introducció ens centrarem en la cisteïna catepsina B i en l'aspartil catepsina D, donat que són les catepsines que tenen una expressió més ubiqüa i en les que ens hem centrat en els nostres estudis.

### **5.1. Les cisteïna catepsines**

Les cisteïna catepsines van ser descobertes a la primera meitat del segle XX, quan Gutman i Furton al 1948 van descriure la catepsina C. No va ser fins a principis dels anys '70 quan es van identificar les catepsines B i H, i al cap de pocs anys la catepsina L (Turk et al. 2001). Durant els '90 es van proveir més pistes pel paper fisiològic de les cisteïna proteases gràcies a varis estudis fets amb animals deficients per les catepsines, que van posar de manifest que tenien una àmplia varietat de funcions, i no només de degradadors de proteïnes intracel·lulars, que és el que es creia fins llavors. Així, les cisteïna proteases que s'havien vist tradicionalment com a mediadors lisosomals de la degradació de proteïnes terminal, es va veure que tenien varis rols en apoptosi, en respostes immunes (MHC II) processat d'hormones, o remodelació de la matriu extracel·lular determinant pel desenvolupament dels ossos (Chapman et al. 1997; Turk et al. 2000).

Fins al moment, s'han descrit 11 cisteïna catepsines presents en el genoma humà, mentre que en ratolí se n'han descrit 19 (10 de les quals són ortòlegs) cada una amb diferents patrons d'expressió, nivells, i especificitats, i totes contribueixen als seus diferents papers fisiològics. Les cisteïna catepsines descrites formen part de la subfamília de les papàines, són predominantment endopeptidases, i es localitzen en les vesícules endolisosomals intracel·lulars (Mohamed & Sloane 2006).

Tot i desenvolupar funcions fisiològiques necessàries pel bon funcionament de l'organisme, s'ha demostrat que en un bon nombre de malalties es dona una desregulació de l'activitat proteolítica, desembocant en patologies com càncer o desordres neurodegeneratius. Així doncs, els inhibidors de les cistein proteases no són només importants per regular l'activitat proteasa endògena, sinó que a més tenen un paper protector enfront infeccions de patògens com virus o bacteris que utilitzarien les cistein catepsines per evadir els mecanismes de defensa de l'organisme. El terme "cistatina" es refereix a la família d'inhibidors de cistein proteases. En condicions fisiològiques normals existeix un balanç entre les proteases i els seus inhibidors, però quan aquest equilibri es trenca, es pot donar la progressió de patologies com la invasió tumoral (Leto et al. 1997p

Basant-se en els resultats dels diferents estudis fets amb ratolins deficientes en diferents catepsines, s'arriba a la conclusió de que la funció de degradació de proteïnes intraliosomals no depèn exclusivament de cap catepsina en concret, ja que en cap estudi es mostraven defectes en la degradació proteica (Deussing et al. 1998; Saftig et al. 1998; Shi et al. 1999; Roth et al. 2000p Tot i així, aquests estudis amb ratolins *knockouts* van revelar que les catepsines lisosomals tenen funcions específiques i individuals importants pel normal funcionament de l'organisme. Aquestes funcions específiques sovint van associades amb la localització tissular restringida de les catepsines. Tot i que moltes d'elles són ubiqües això no exclou el fet que estiguin involucrades en processos més especialitzats. D'aquesta manera la catepsina K seria crucial per la remodelació normal dels ossos, mentre que les catepsines S i L serien essencials pel funcionament normal del sistema immune (Turk et al. 2001p

### **5.1.1. La catepsina B**

#### ***5.1.1.1. Estructura i funcions fisiològiques***

Tot i que la preprocatepsina B és sintetitzada a partir d'un únic gen, es poden trobar més d'una espècie de RNAm, amb una mida que varia segons la llargada de les regions sense traduir. El RNAm es tradueix en ribosomes units a la membrana del reticle endoplasmàtic rugós (REr) i el pèptid senyal serà tallat llavors. El nou proenzim sintetitzat o procatepsina B passa a través del REr i després cap a l'aparell de Golgi. Allà, entre d'altres modificacions,

es fosforilen els residus manosa que seran reconeguts pels receptors de manosa-6-fosfat que hi ha en la xarxa trans-Golgi. Aquesta unió és la que dirigirà la proteïna cap al lisosoma. Durant aquest procés les vesícules de transport s'acidifiquen i permeten la dissociació del receptor, el qual serà reciclat, i bé el processat proteolític del proenzim amb l'alliberació del propèptid. Fins aquests estadi, l'enzim ha estat inactiu, prevenint així un dany en la maquinària biosintètica. La pèrdua del propèptid condueix a una inestabilitat de l'enzim a pH neutres-alcalins que conduiria a una desnaturalització irreversible, sent així un mecanisme innat pel qual l'organisme es protegeix del dany per una proteòlisi inapropiada (Mort & Buttle 1997p)

La catepsina B (Cts B, EC 3.4.22.1) és una proteïna de 30 KDa amb activitat endopeptidasa o exopeptidasa depenent del pH on es trobi. A pH neutre, típic en llocs d'unió de membrana, la catepsina B extracel·lular actuaria amb activitat endopeptidasa, mentre que a pH àcid (interior dels lisosomes) la catepsina B tindria activitat exopeptidasa (Khouri et al. 1991p). Aquestes observacions indicarien que depenent de la localització de la catepsina B, aquesta tindria substrats diferents.

La CtsB és ubiqüa a tots els teixits dels organismes superiors, i està implicada en funcions fisiològiques clau com la síntesi de tiroxina (Dunn et al. 1991p) pro-hormona implicada en el metabolisme cel·lular i desenvolupament, o en l'autoprotecció citotòxica dels limfòcits T en la degranulació (Balaji et al. 2002p)

#### **5.1.1.2. Implicacions patològiques**

A més de les seves funcions fisiològiques, la CtsB està involucrada en una varietat de malalties amb un espectre ben divers. En la bibliografia està descrit que l'expressió de CtsB està augmentada en processos malignes com el càncer, i que l'expressió d'aquesta catepsina també s'associa a un elevat potencial metastàtic ja que facilitaria la migració cel·lular i la invasió. Aquest fenomen s'ha descrit en molts tipus de càncer com el càncer de mama (Victor et al. 2011p) tiroides (Tedelind et al. 2011p) laringe (Chun Sun Li et al. 2011p) glioma (Malla et al. 2011p) còlon (Chan et al. 2010p) melanoma

(Matarrese et al. 2010p esòfag (Andl et al. 2010p o pròstata (Nalla et al. 2010p entre d'altres. A més a més, també s'associa l'expressió augmentada de catepsina B amb la progressió de malalties neurològiques com l'Alzheimer (Sundelöf et al. 2010; Schechter & Ziv 2011p o malalties neurològiques inflamatòries (Nagai et al. 2000p

També s'ha descrit que la catepsina B participa en la via d'apoptosi dels hepatòcits. La senyalització citotòxica de TNF- $\alpha$ , s'ha observat que provoca que la CtsB s'alliberi fora dels lisosomes, fet que provoca l'alliberament de citocrom C fora del mitocondri. Aquest alliberament activarà la cascada de caspases que conduirà cap a l'apoptosi (Guicciardi et al. 2000; Werneburg et al. 2002p

El paper de la CtsB en les afeccions hepàtiques ha estat descrit per varis autors. En la malaltia de fetge gras no alcoholic s'ha relacionat la catepsina B amb el mecanisme d'apoptosi induït per àcids grassos lliures (Feldstein et al. 2006; Feldstein et al. 2004p mentre que en la fibrosi, la catepsina B s'ha vist com empitjorava la seva progressió en els models experimentals de lligadura del conducte biliar (LCBp(Canbay et al. 2003; Kahraman et al. 2008p o de CCl<sub>4</sub> (Yamamoto et al. 1992; Moles et al. 2009p En un dels estudis fets amb ratolins deficients en catepsina B, als quals se'ls hi practicava una LCB, s'observava una relació directa entre la catepsina B i la fibrogènesi. Els resultats mostraven que el dany hepàtic produït per la LCB produïa un augment de l'expressió de molts gens profibrogènics com, TGF- $\beta$ , col·lagen tipus I, o  $\alpha$ -SMA, indicant una activació de les CEH en aquest model de colèstasi. En analitzar l'expressió d'aquests mateixos gens en els animals deficients en catepsina B amb LCB, s'observaven nivells similars al control, mostrant així que l'activació de les CEH en colèstasi és dependent en part de la catepsina B, i que aquest fet s'associa a fibrogènesi hepàtica (Canbay et al. 2003p

## 5.2. Les aspartil catepsines

Les aspartil proteases (EC 3.4.23p són un grup d'enzims proteolítics que comparteixen el mateix aparell catalític i són actius majoritàriament a pH àcid. Els

membres d'aquesta família poden ser trobats a diferents organismes, des dels éssers humans i mamífers en general, a les plantes, fongs o fins i tot retrovirus.

Les aspartil proteases duen a terme una gran varietat de funcions en l'organisme. La catepsina D i E s'encarreguen de la degradació proteica lisosomal, però mentre que la catepsina E es troba en el reticle endoplasmàtic (REp l'aparell de Golgi i altres compartiments citosòlics (Yamamoto et al. 2011p la catepsina D és ubiqua als lisosomes de la majoria de teixits de l'organisme com fetge o melsa (Zaidi et al. 2008p La pepsina i la quimiosina (gastricinap aspartil proteases també, són secretades a l'estómac dels individus, i la seva funció es basa en la digestió de les proteïnes procedents de la dieta (Fruton 2002p La renina es produeix en el ronyó, i està involucrada en la producció d'angiotensina, una hormona que estimula la contracció de la musculatura llisa. D'aquesta manera, tot i que indirectament, la renina regularia la pressió sanguínia (Zhuo & Li 2011p La beta secretasa és una altre aspartil proteasa que s'expressa en cervell, i se l'ha vist implicada en processos patològics relacionats amb la malaltia d'Alzheimer (Yan et al. 1999; Decourt & Sabbagh 2011p Per últim varis estudis han descrit una altre aspartil proteasa, la VIH-proteasa, la qual és essencial per a la formació i maduració dels nous virus de la immunodeficiència humana (VIH) Per aquest motiu aquesta aspartil proteasa s'ha convertit en una diana molt important per a la teràpia contra el virus de l'VIH (Castro et al. 2011; Martin et al. 1995; Moyle & Gazzard 1996p

Tal com he comentat en el paràgrafs anterior, aquesta família de proteases pot estar implicada en patologies com Alzheimer o invasió del virus VIH, però també se les ha relacionat amb apoptosi (Kim et al. 2011p la progressió de tumors i metastasi (Vetvicka & Vetvickova 2011; Chen et al. 2011; Sugimoto et al. 2011p

## **5.2.1. La catepsina D**

### ***5.2.1.1. Estructura i funcions fisiològiques***

La catepsina D (CtsD, EC 3.4.23.5) és una endopeptidasa lisosomal soluble que es troba en quasi bé totes les cèl·lules dels organismes mamífers, i té una localització típicament lisosomal (Saku et al. 1991p Aquesta aspartil proteasa es sintetitza en el REr com a preprocatepsina D. El pèptid senyal és eliminat durant la translocació de la catepsina a través de la membrana del

RE, generant la procatepsina D inactiva de 52 kDa, la qual serà redirigida cap a les estructures vesiculars intracel·lulars com lisosomes, endosomes i fagosomes. Aquest direccionament serà mediat pels receptors de manosa-6-fosfat. Un cop dins el compartiment endolisosomal, la procatepsina serà processada resultant un enzim actiu intermedi de 48 kDa. Després del processament d'aquesta forma intermèdia (dut a terme per proteases com la catepsina B o Lps'obté la forma madura i activa de la catepsina D, que consta d'una cadena pesada (34 kDa) i una cadena lleugera (14 kDa) (Benes et al. 2008; Zaidi et al. 2008p

La catepsina D està implicada en processos fisiològics de l'organisme com la degradació de proteïnes, l'apoptosi i l'autofagia. Experiments fets amb animals deficient en catepsina D posaven de manifest la importància d'aquesta proteasa en la regulació del creixement cel·lular i la homeòstasi tissular (Koike et al. 2003p així com també es suggeria que l'activitat enzimàtica de catepsina D era important en la regulació de la renovació i remodelació tissular postnatal, en la regulació de l'envelliment cel·lular i en la mort cel·lular programada (Koike et al. 2000; Shacka et al. 2007p

Així doncs, la catepsina D participaria en funcions fisiològiques fonamentals per l'organisme ja que com mostren molts estudis, l'absència d'aquesta catepsina, condueix a l'organisme a patir patologies com atrofia de la mucosa intestinal (Saftig et al. 1995p atrofia retinal (Koike et al. 2003p o neurodegeneració (Steinfeld et al. 2006p entre d'altres.

### ***5.2.1.2. Implicacions patològiques***

Tot i tenir una funció fisiològica "positiva" per a l'organisme, la presència o nivells elevats de catepsina D també s'han associat a patologies com càncer, aterosclerosi (Durán et al. 2007p o la malaltia d'Alzheimer (Schwagerl et al. 1995p Des de la primera observació d'alts nivells de catepsina D en teixit neoplàsic, ara ja fa 25 anys (Reid et al. 1986p molts han estat els estudis que mostraven una relació entre alts nivells de catepsina D amb l'agressivitat del tumor, la incidència de metàstasi, la prognòs (Thorpe et al. 1989p i el grau de quimioresistència en una gran varietat de tumors sòlids com neuroblastomes, gliomes, melanomes, càncer de còlon, ovari, pulmó, fetge,



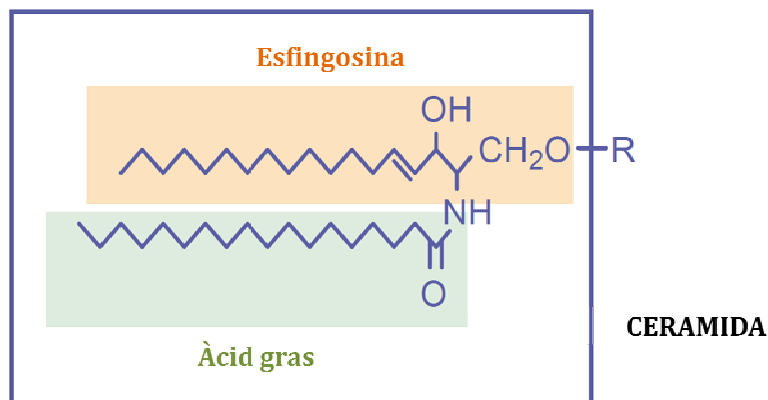
pròstata, etc (Lösch et al. 2004; Vetvicka & Vetvickova 2011; Nakata et al. 1994; Huang et al. 2000).

En les malalties hepàtiques, la catepsina D ha estat relacionada bàsicament amb l'hepatocarcinoma (Leto et al. 1996; Brouillet et al. 1991), però recentment en el nostre grup també es va descriure la participació de la catepsina D (juntament amb la catepsina B) en el procés d'activació de les CEH, i en el seu potencial profibrogènic (Moles et al. 2009).

## 6. L'ESFINGOMIELINASA ÀCIDA

### 6.1. Els esfingolípidis

Els esfingolípidis són lípids complexos derivats de l'aminoalcohol insaturat de 18 carbonis o esfingosina. Aquesta es troba unida a un àcid gras de cadena llarga mitjançant un enllaç amida formant la ceràmida.



**Figura 7:** Estructura de la ceràmida, formada per una esfingosina (taronja) unida a un àcid gras de cadena llarga (verd).

Aquests tipus de lípids es troben principalment a membranes cel·lulars d'animals i vegetals, i són els més abundants en els teixits dels organismes més complexos. Durant molt de temps, els esfingolípidis s'havien considerat com a mers components estructurals de membranes biològiques, fins que molts estudis van evidenciar que tenen un paper dinàmic en la regulació de varis processos com l'expressió gènica, la proliferació, el creixement o la mort cel·lular (Marí &

Fernández-Checa 2007p Entre els esfingolípid, la ceramida és la que ha atret més l'atenció degut al seu reconegut paper com a intermediari clau de molts estímuls com estrès o mort cel·lular. A més a més, l'activació de les esfingomielinases que hidrolitzen esfingomielina a les membranes per obtenir ceramida, mostra una via estratègica per la qual es produeix ceramida de manera molt ràpida en resposta a varis inductors, consistent amb la noció de que la generació de ceramida serveix com a segon missatger que participarà en la iniciació de vies de senyalització de mort cel·lular, (Marchesini & Hannun 2004p Per altre banda, la esfingosina 1-fosfat (S1P o *Sphingosine 1-phosphate*) senyalitza cap a la via de supervivència i d'aquesta manera pot antagonitzar els efectes citotòxics de la ceramida.

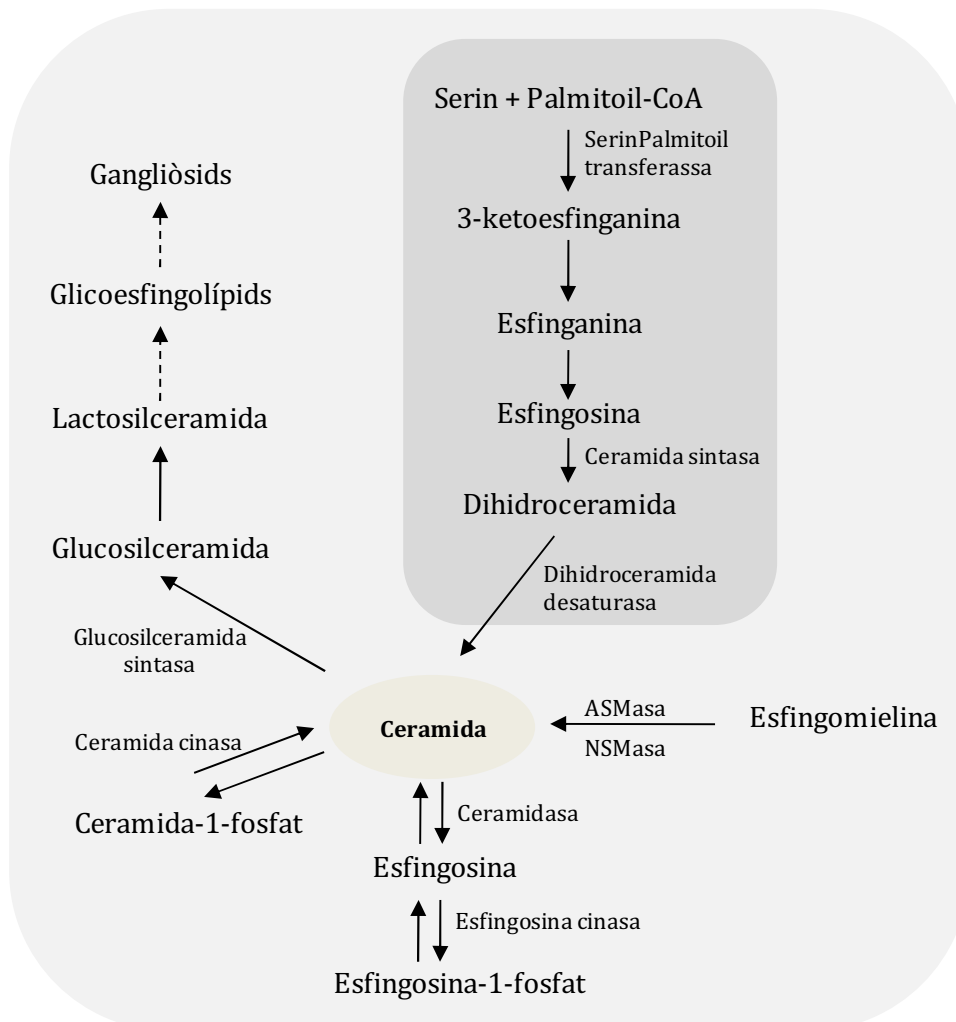
### 6.1.1. El metabolisme dels esfingolípid

La ceramida es pot generar a partir de dues vies diferents, la via de la síntesis *de novo*, i la via dependent de la hidròlisi d'esfingomielina per les esfingomielinases.

La síntesi *de novo* de ceramida es dona en el RE a partir de la condensació d'una L-serina i un palmitoil-CoA per formar la 3-cetoesfinganina. Aquest reacció la catalitza l'enzim serin palmitoil transferasa (SPT o *Serine palmitoyl transferase*) l'enzim limitant de la biosíntesi de ceramides (Merrill 2002p La 3-ketoesfinganina serà reduïda a esfinganina i acetilada per l'enzim (dihidroceramida sintasa per generar dihidroceramida. Aquesta molècula serà oxidada per formar ceramida per l'enzim dihidroceramida desaturasa (Figura 8p La síntesi *de novo* de ceramida és necessària per moltes funcions cel·lulars com mostren les conseqüències perjudicials que es donen degut a la seva inhibició. Com a exemple, s'ha observat que la inhibició de l'enzim (dihidroceramida sintasa causa processos malignes com càncer, edema pulmonar, i toxicitat hepàtica (Morales et al. 2007; Stockmann-Juvala et al. 2006; Merrill 2002p a causa, en part, de la conseqüent acumulació d'esfinganina.

L'altre via d'obtenció de ceramida, generació ràpida, es dona a través de la hidròlisi de l'esfingomielina catalitzat per les esfingomielinases (SMases o *Sphingomyelinases*) Tot i que s'han descrit diverses SMases, n'hi ha dues amb certa rellevància en les vies de senyalització. La SMasa neutra (NSMasa o *Neutral Sphingomyelinase*) que es troba unida a la membrana, i té un pH òptim de 7.4 (Krut et al. 2006p i la SMasa àcida (ASMasa o *Acidic Sphingomyelinase*) que

mostra un pH òptim de 4.8. Comparat amb la síntesi *de novo*, la generació de ceramida, a través de l'activació de SMases, és ràpida i transitòria, i varis estudis l'han implicat en l'apoptosis induïda per citocines o lligands de mort (Fas o TNF $\alpha$ ) agents ionitzants o quimioterapèutics (Kolesnick & Hannun 1999p



**Figura 8:** Metabolisme dels esfingolípids (figura adaptada de (Morales et al. 2007pp

La ceramida sintetitzada per les dues possibles vies pot ser convertida en altres molècules, fet que modularà el seu potencial paper apoptòtic. La deacilació de la ceramida per l'enzim ceramidasa (CDase) produeix esfingosina, que al seu temps pot ser fosforilada per l'esfingosina cinasa (SK o *Sphingosine kinase*) per formar esfingosina 1-fosfat (S1P) molècula important ja que dóna senyals de supervivència cel·lular. Per altre banda, la ceramida també pot ser fosforilada per la ceramida cinasa (CK o *Ceramide kinase*) per formar ceramida 1-fosfat, que al seu temps pot desfosforilar-se gràcies a l'enzim ceramida 1-fosfat fosfatasa (C1P *phosphatase*) per formar ceramida de nou. Igual com la S1P, la C1P té propietats

mitogèniques i promou la supervivència cel·lular (Marí & Fernández-Checa 2007p El balanç entre la generació de ceramida i la conversió a S1P o C1P determinaria el destí cap a supervivència o mort dels hepatòcits en resposta a TNF o estrès.

## 6.2. L'esfingomielinasa àcida

L'ASMasa (*ASMase*, EC 3.1.4.12) codificada pel gen *SMPD1* és sintetitzada com una preproteïna de 75 kDa que serà transformada en el RE/Golgi a la forma precursora monomèrica de 72 kDa. Aquest precursor serà processat en el compartiment endolisosomal a la forma madura lisosomal de 70 kDa. S'ha descrit, però, que una petita part de la forma precursora és processada en el RE/Golgi donant lloc a una forma secretable activa de 57 kDa (Lansmann et al. 1996p Una de les característiques del processament de la proASMasa a la forma endo/lisosomal es una sensibilitat a inhibidors de la família dels anti-depressius tricíclics com la imipramina o l'amitriptilina (Jenkins et al. 2010p

Fins al moment s'han descrit 3 isoformes de l'ASMasa (Morales et al. 2007p

- 1p l'ASMasa lisosomal/endosomal responsable del metabolisme de l'esfingomielina;
- 2p l'ASMasa secretada associada amb inflamació i respostes a estrès;
- 3p l'ASMasa activada per receptor, que es transloca a la membrana cel·lular externa en microdominis que serviran com a plataformes per receptors com Fas.

Biològicament, l'ASMasa ha estat implicada en diversos processos fisiològics i patològics. En concret, l'ASMasa s'ha vist que és activada en resposta a varis estímuls d'estrès com radiació, agents quimioterapèutics, patògens (virals, bacterians i paràsits) citocines i receptors de mort (TNF, CD95, TRAIL) Aquesta activació produeix un canvi de localització de l'ASMasa, ja que passa del compartiment lisosomal/endosomal, on es troba normalment, a la superfície cel·lular. En la membrana cel·lular serà on iniciarà la senyalització cel·lular i exercirà el seu impacte fisiològic o patològic en el creixement i diferenciació cel·lular, l'apoptosi o els mecanismes de defensa del sistema immune (Zeidan & Hannun 2007p En relació amb l'activació de l'ASMasa per TNF, s'ha observat una cascada de senyalització dins el receptosoma del TNF que involucra l'activació seqüencial

de la caspasa-8 i -7 en l'activació de l'ASMasa a partir del processament proteolític de la proASMasa (Edelmann et al. 2011p)

### 6.2.1. Implicacions patològiques

Des que als anys '60 es va descriure que la deficiència d'ASMasa era responsable de la malaltia de Niemann-Pick (*Niemann-Pick disease* o NPD) molts han estat els esforços per purificar o trobar inhibidors d'aquesta proteïna ja que al llarg dels anys molts altres estudis també l'han relacionat amb malalties tant diverses com aterosclerosi (Marathe et al. 1999p) diabetis (Strackowski et al. 2007; Górska et al. 2003p) emfisema pulmonar (Petrache et al. 2005p) càncer o malalties neurològiques (Kornhuber et al. 2005p)

La malaltia de Niemann-Pick tipus A i B, és una malaltia rara caracteritzada per un desordre en l'emmagatzement lisosomal, i és causada per mutacions en el gen SMPD1 que comporta una deficiència d'ASMasa. Aquesta patologia serà desenvolupada més extensament en el punt "6.2.2. La malaltia de Niemann-Pick".

L'ASMasa ha estat relacionada directament amb la mort cel·lular ja que quan s'activa i es transloca a la membrana cel·lular n'hidrolitza un dels seus components, l'esfingomielina, per formar ceramida que iniciarà la senyalització cap a mort cel·lular (Bezombes et al. 2001p) La generació de ceramida a través de l'activació d'ASMasa és induïda per estímuls apoptòtics com TNF (Osawa et al. 2005p) Fas, radiació, estrès (UV o radicals lliures) o agents quimioterapèutics, entre d'altres. En relació amb TNF, s'ha observat que el receptor TNFR1 s'internalitzaria formant una vesícula endocítica que contindria el complex activat de TNFR1 (receptosomes) Durant la endocitosis es recluten TRADD, FADD i la caspasa 8. Aquesta última és processada durant el tràfic del receptosoma fins que es fusiona amb una vesícula endolisosomal provinent del Golgi, que conté ASMasa (i catepsina D) per formar un endosoma multivesicular on es donarà l'activació de l'ASMasa i la catepsina D les quals iniciaran la cascada apoptòtica (Schneider-Brachert et al. 2004p) També s'ha observat que segons l'estímul que inicia la cascada apoptòtica, la mort cel·lular induïda per l'ASMasa pot ser dependent o independent de les caspases (Rotolo et al. 2005p)

El procés d'oncogènesi sovint inclou el desenvolupament de mutacions que permeten a la cèl·lula tumoral escapar de la cascada apoptòtica. D'aquesta manera, la inducció de la via apoptòtica és una estratègia terapèutica molt usada. S'ha de remarcar, que els nivells de ceramida estan clarament disminuïts en càncer de còlon (Selzner et al. 2001) i ovaris (Rylova et al. 1998) i en gliomes (Riboni et al. 2002). Aquesta disminució en els nivells de ceramida van sovint associades a la regulació a la baixa de l'ASMs, i fins i tot s'associa aquesta regulació a la baixa de l'ASMs i en conseqüència a la disminució de ceramida a una possible resistència a les drogues quimioterapèutiques.

Com a últim exemple, l'ASMs també se l'ha relacionat amb patologies hepàtiques. En el cas de malaltia hepàtica induïda per alcohol on la malaltia pot progressar cap a una cirrosi, l'apoptosi dels hepatòcits que té lloc en el fetge està mediada per TNF- $\alpha$ , via de senyalització on s'ha vist que l'ASMs és essencial (García-Ruiz et al. 2003). En hepatotoxicitat causada per coure (malaltia de Wilson) s'ha observat que els hepatòcits augmenten l'activitat ASMs i la formació de ceramida després de ser exposats a coure, induint així apoptosi. Aquest fet es confirma amb la observació de que pacients amb aquesta malaltia tenen en plasma una elevada activitat ASMs, i que la inhibició farmacològica o genètica de l'ASMs prevé l'apoptosi causada per la sobrecàrrega de coure als hepatòcits (Lang et al. 2007).

### **6.2.2. La malaltia de Niemann-Pick**

Com he comentat en l'apartat anterior, la malaltia de Niemann-Pick o NPD es tracta d'una malaltia lisosomal causada per mutacions recessives del gen SMPD1 que codifica per l'ASMs, fet que condueix a una deficiència d'aquest enzim. Existeixen dos tipus de NPD, la tipus A, i la B.

La NPD tipus A és la forma infantil de la deficiència d'ASMs, i es caracteritza per un procés neurodegeneratiu ràpid i progressiu que redueix l'esperança de vida a 2-3 anys. La NPD tipus B té una manifestació clínica més tardana on els pacients mostren petits o nuls símptomes neurològics, però amb implicacions severes i progressives en els òrgans viscerals (hepatoesplenomegàlia, insuficiència pulmonar, o malaltia cardiovascular). En aquest cas, els individus malalts poden

arribar a l'edat adulta, i presentaran una major o menor afectació segons el grau d'activitat ASMasa romanent (Schuchman 2007p)

El primer pacient amb NPD tipus A va ser descrit al 1914, i als anys '30 es va identificar el lípid que s'acumulava als teixits dels pacients com a esfingomielina. Avui en dia es sap que a part de l'esfingomielina, molts altres lípids com el colesterol o gangliòsids s'acumulen en els teixits, conduint a anomalies en la funció cel·lular.

Per entendre millor la fisiopatologia de la NPD, a mitjans dels anys '90 es va crear el ratolí *knockout* de l'ASMasa (Otterbach & Stoffel 1995; Horinouchi et al. 1995p) i de l'anàlisi d'aquests animals es va descobrir la importància inesperada del paper d'aquest enzim en la senyalització cel·lular, i es va aprendre molt sobre la fisiopatologia d'aquesta malaltia (Schuchman 2010p)

Les diferents representacions clíniques de la NPD tipus A i B són probablement degudes a petites diferències en la quantitat d'activitat ASMasa residual. Per exemple, mentre una efectiva activitat *in situ* del ~ 5% resulta en la NPD tipus B, una reducció més gran del ~ 1–2% o menys, indueix el fenotip més sever de la NPD tipus A (Graber et al. 1994p) Aquestes observacions posen de manifest el fet que tot i que nivells baixos d'activitat ASMasa són suficients per mantenir intacte la funció neurològica, l'absència d'aquesta activitat té conseqüències devastadores en el cervell.

Desafortunadament, malgrat aquestes relacions d'activitat enzimàtica residual amb diferents fenotips, assajos *in vitro* d'activitat ASMasa no són adequats per a una predicció totalment fiable de l'inici i extensió de la implicació del cervell en els pacients amb NPD. A més, encara que l'acumulació intralisosomal de substrats sense metabolitzar s'hagués considerat com a principal causa de la NPD, el mecanisme molecular conductor d'aquest succés a la patologia no seria del tot clar. Molt probablement, el defecte enzimàtic primordial resulta en múltiples anomalies cel·lulars i bioquímiques secundàries que efectivament podrien ser factors de major contribució, o fins i tot la causa principal, del dany tissular i la mort.

En aquests moments no existeix cap tractament per a la NPD tipus A. Els primers intents de transplant de moll de l'os, cèl·lules amniòtiques i transplantament de fetge, no van impactar en el curs de la malaltia neurològica dels pacients NPD tipus A, i clarament es necessiten noves aproximacions. A l'hora de considerar nous enfocaments s'han de tenir en compte varis factors. Primer, que aquesta és una malaltia amb un inici molt primerenc. Mentre que els pacients neixen sense evidències de disfunció neurològica, cap als 3-6 mesos de vida aquestes ja són clarament visibles. Mentre que és poc probable que el dany patit per la deficiència d'ASMas sigui reversible, qualsevol teràpia d'èxit hauria de ser iniciada al néixer o poc després. Segon, les teràpies haurien de ser encarades a una millora significativa de la qualitat de vida. Això és particularment important quan es tradueixen els resultats obtinguts en el model murí *ASMas<sup>-/-</sup>* a pacients. Per exemple, en ratolins, tot i que el fet d'aconseguir millores modestes en la funció neurològica pot ser consirat com un "èxit" científic, resultats similars en pacients poden, a la llarga, conduir a més dolor i patiment per les famílies disminuint (però no prevenint) la taxa de deteriorament neurològic, i a la llarga prolongant la malaltia. En el cantó positiu, i com es discutia anteriorment, per a la deficiència de l'ASMas es sap que nivells molt baixos d'activitat enzimàtica residual (5% aprox.) poden recuperar les funcions neurològiques. De fet, estudis recents usant ratolins amb mutacions específiques han vist que fins a un 8% d'activitat *ASMas* pot prevenir completament la incidència de la malaltia neurològica (Jones et al. 2008)



