



Universitat  
de Barcelona

# 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

## DISCUSSION



### ❖ **Contribució del TNF a la fibrosi: pro- o anti-fibrogènic**

Malgrat que està ben establert que el TNF està implicat en el desenvolupament de nombroses malalties cròniques del fetge, i fins i tot s'ha vist que en la fibrosi hepàtica és un marcador de progressió de la mateixa (Bradham et al. 1998), (Schwabe & Brenner 2006), la seva contribució específica a l'activació de les CEH i a la fibrogènesi hepàtica no està ben definida i segueix sent controvertida. En la literatura podem observar la controvèrsia en quan al paper anti- o pro-fibrogènic que se li atorga al TNF. En aquest sentit, estudis experimentals *in vivo* duts a terme amb animals deficients pels receptors de TNF després de l'administració de CCl<sub>4</sub> van mostrar que l'absència tant del TNFR1 (TNFR1-KO) (Sudo et al. 2005), o dels dos receptors (TNFR-DKO) (Simeonova et al. 2001), no afectaven el dany hepàtic induït per CCl<sub>4</sub> però inhibien la fibrosi hepàtica acompanyat d'una expressió reduïda de pro-col·lagen tipus 1, suggerint així un paper pro-fibrogènic per al TNF. D'altra banda, un estudi recent mostra que la inhibició, amb marismatat, de l'enzim convertidor del TNF o TACE (*TNF- $\alpha$ -converting enzyme*) i de les MMPs atenua el dany hepàtic i la necroinflamació després del tractament crònic amb CCl<sub>4</sub>, però aquesta menor inflamació venia acompanyada d'un augment de la deposició de col·lagen, probablement degut a la inhibició a llarg termini de les MMPs (Houglum et al. 1998). En aquest mateix estudi van observar en ratolins TNFR-DKO, però no en ratolins deficients en MMP-9, que la necroinflamació derivada d'un tractament agut, no crònic, amb CCl<sub>4</sub> estava reduïda demostrant-se així que l'efecte sobre la necroinflamació observat amb el tractament crònic de CCl<sub>4</sub> i marismatat era possiblement mediat pels receptors de TNF (Houglum et al. 1998). Aquest estudi però no va analitzar què succeïa, ni en el mal hepàtic ni a la fibrosi, en ratolins TNFR-DKO després d'un tractament crònic amb CCl<sub>4</sub>.

Respecte a estudis *in vitro* emprant CEH en cultiu on s'avalués la participació del TNF, únicament s'ha descrit que aquesta citocina és capaç d'inhibir l'expressió gènica del pro-col·lagen tipus 1 (Hernández-Muñoz et al. 1997; Houglum et al. 1998), a través d'un mecanisme que implica estrès oxidatiu i la depleció de glutatió (Varela-Rey et al. 2007), apuntant així cap a un paper anti-fibrogènic de TNF.

En vista dels antecedents, el nostre estudi, doncs, es va centrar per un costat en valorar si el TNF i la seva unió als receptors 1 o 2 de TNF (TNFR1 i TNFR2) regula la naturalesa biològica de les CEH, i per altra banda varem voler avaluar *in vivo* en el model de lligadura del conducte biliar (LCB) si existia alguna correlació entre els nivells de TNF i els paràmetres que, segons els nostres resultats *in vitro* en CEH, eren dependents de TNF. Així doncs, varem aïllar CEH procedents d'animals TNFR1-KO, TNFR2-KO i TNFR-DKO per analitzar el paper de TNF i els seus receptors en l'activació i proliferació de les CEH, processos crítics en la cascada de successos que condueixen a una fibrosi hepàtica. Els resultats que varem obtenir indiquen que tot i que TNF no participa en trets fonamentals del procés de transdiferenciació de les CEH, com són l'expressió d' $\alpha$ -SMA o TGF- $\beta$ , sí que ho fa, i a través de TNFR1, en la proliferació i en l'expressió de MMP-9 i TIMP-1, i indirectament en la síntesi de pro-col·lagen tipus 1, com ja havien indicat estudis anteriors (Hernández-Muñoz et al. 1997; Houghlum et al. 1998). Aquests resultats van ser validats en la línia cel·lular humana LX2, on varem antagonitzar els receptors de TNF amb anticossos bloquejants específics. Els resultats que varem obtenir eren molt similars als obtinguts amb el cultiu primari, excepte en l'expressió de TIMP-1. Així com en el cultiu primari es veia una clara participació de TNF en la inducció de l'expressió de TIMP-1, en les LX2 no veiem tal inducció en resposta al TNF. Aquest comportament diferencial podria ser explicat per varies possibilitats com per exemple que la regulació de TIMP-1 difereix fonamentalment pel fet de que l'origen de les cèl·lules és diferent (ratolí/humà). Una altre explicació podria ser el fet de que les cèl·lules LX2, una línia generada a través d'immortalització amb l'antigen SV40 seguida de selecció sota baixa concentració de sèrum, expressen una quantitat pràcticament negligible de TIMP-1 comparat amb les CEH primàries, o amb la línia parental LX1, que indicaria que l'expressió de TIMP-1 s'hauria perdut durant la seva selecció en condicions de baix sèrum en el medi (Xu et al. 2005).

Els nostres resultats *in vitro* mostren que el receptor TNFR1 és un requeriment selectiu en alguns aspectes de l'activació de les CEH, i per aquest motiu varem voler complementar aquestes observacions analitzant *in vivo* la rellevància d'aquest receptor en la fibrogènesi hepàtica. En la literatura no hi ha gaires articles que versin sobre aquest tema, però d'aquests pocs, la gran majoria, si no tots, inclouen estudis *in vivo* duts a terme, però, amb els models de fibrosi

induïda per toxicitat al fetge ja sigui amb un tractament de  $\text{CCl}_4$  (Sudo et al. 2005; Simeonova et al. 2001; Yamada & Fausto 1998), o dimetilnitrosamina (Kitamura et al. 2002). Per aquest motiu, i perquè el dany en el model de lligadura del conducte biliar s'ha descrit que va a través de TNF (Whiting et al. 1995; Plebani et al. 1999), i no per radicals lliures generats pel metabolisme del  $\text{CCl}_4$  (Manibusan et al. 2007), varem decidir dur a terme el nostre estudi *in vivo* amb animals control, TNFR1-KO, TNFR2-KO i TNFR-DKO, amb el model de LCB. Malgrat que els ratolins deficients en TNFR1 i els TNFR-DKO tenien menys mal o inflamació, i per tant menys fibrosi que els ratolins salvatges o els deficients en TNFR2, com era d'esperar, sí que varem poder observar una correlació entre els nivells de TNF en aquests fetges i l'expressió de MMP-9, TIMP-1, i pro-col·lagen tipus 1.

Així doncs, en conjunt, els nostres resultats *in vitro* i *in vivo* apunten a TNF, no només com a inductor del dany hepàtic, sinó també com a factor pro-fibrogènic en el fetge, fent que tant el propi TNF com el seu receptor TNFR1 siguin una diana terapèutica a tenir en compte per aconseguir una preservació de la integritat hepatocel·lular i prevenir la proliferació de les CEH i la fibrosi hepàtica.

#### ❖ ***TNFR1 i les metal·loproteases gelatinases***

En estudiar el paper del TNF en relació amb les metal·loproteases en la fibrosi hepàtica varem observar un paper diferencial dels receptors de TNF en quan a la regulació de l'expressió de les gelatinases, en particular, al requeriment de TNFR1 en l'expressió de MMP-9, però no de MMP-2. En estudis previs s'havia descrit, en els models de fibrosi i dany hepàtic induït per  $\text{CCl}_4$  o tioacetamida, que la MMP-9 colocalitzava majoritàriament amb les cèl·lules desmin-positives, suggerint així que les CEH eren la font de MMP-9 *in vivo*, la seva expressió era dependent de IL-1, i s'incrementava a mesura que augmentava la fibrosi (Salguero Palacios et al. 2008; Gieling et al. 2009). Cal dir, no obstant, que nosaltres també hem mostrat que IL-1 és un potent inductor de MMP-9, en especial IL-1 $\alpha$ , però ho és en magnitud similar al TNF, tant en CEH de ratolí com en cèl·lules humanes. A més, els models d'inducció de fibrosi per  $\text{CCl}_4$  o tioacetamida, s'acompanyen d'un increment de nombroses citocines inflamatòries, entre elles IL-1 i TNF. Així doncs, caldrien estudis addicionals per a poder explorar la contribució relativa de IL-1 i TNF a l'activació de MMP-9 *in vivo*. En aquest aspecte, posterior al nostre estudi, s'han

publicat uns resultats, amb el model d'administració crònica de CCl<sub>4</sub> i fent servir animals deficients en TNFR1, que donen suport a la teoria de que l'expressió de MMP-9 es dona a través del receptor de TNFR1 (Hisanaga et al. 2011). Aquests autors però no han avaluat si el mal hepàtic, en aquest model, difereix entre animals salvatges i TNFR1-KO restant doncs el dubte de si l'efecte observat sobre la MMP-9 és només un indicatiu de menor mal sobre el fetge d'aquests animals.

En qualsevol cas, la importància de la MMP-9 com a mediador pro-fibrogènic es posa de manifest per l'observació feta en ratolins deficients en MMP-9 els quals mostren una protecció parcial enfront el dany hepàtic i l'activació de les CEH (Gieling et al. 2009).

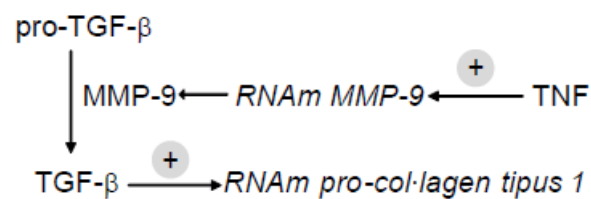
Per altre banda, i referent a la MMP-2, tot i que aquesta gelatinasa forma juntament amb la MMP-9 la família de les metal·loproteases gelatinases i tindrien així la gran majoria de substrats en comú, l'expressió de MMP-2 no sembla ser dependent de TNF. Malgrat que en diversos estudis s'havia observat que la MMP-2 estava sobreexpressada en les malalties cròniques del fetge, i se la considerava per tant un mediador pro-fibrogènic (Gardi et al. 2002; Núñez et al. 2004; Milani et al. 1994), a dia d'avui encara no s'ha mostrat cap estudi amb un model *in vivo* que estableixi de forma definitiva un paper patogènic per la MMP-2 en el desenvolupament i progressió de la fibrosi hepàtica. De fet estudis molt recents emprant ratolins deficients en MMP-2 apunten a un rol més aviat protector que patogènic per aquesta metal·loproteasa (Radbill et al. 2011; Onozuka et al. 2011), fet que contrasta amb el paper pro-fibrogènic atorgat a MMP-9. Així doncs, caldran més estudis per esclarir quina funció concreta, i quins mediadors participen en la inducció d'aquestes dues gelatinases *in vivo*.

#### ❖ **TNFR1 i l'expressió de pro-col·lagen tipus 1 en les CEH**

Un dels resultats més singulars dels nostres estudis és la observació de que en CEH procedents de TNFR-DKO o TNFR1-KO hi havia una menor expressió de pro-col·lagen tipus 1, comparat amb l'expressió basal de les CEH control. Aquests resultats van poder ser reproduïts en les LX2 usant anticossos bloquejants contra TNFR1. El fet que aquesta observació sigui singular rau en el fet que l'addició de TNF en el cultiu primari de CEH no induïx l'expressió de pro-col·lagen tipus 1 a nivell de RNAm (dades no mostrades), consistent amb estudis previs (Solís-Herruzo et al. 1988; Varela-Rey et al. 2007), i descartant així un efecte directe de



TNF sobre la regulació del pro-col·lagen tipus 1. Així doncs, un fet que podria explicar la disminució observada en l'expressió de pro-col·lagen tipus 1 en les CEH de TNFR-DKO i TNFR1-KO, seria la potencial participació de MMP-9 en l'activació del TGF- $\beta$  latent a la seva forma activa, com ja s'ha descrit (Yu & Stamenkovic 2000), que el TGF- $\beta$  juga un paper essencial en l'estimulació de la producció de col·lagen en els estadis primerencs de la fibrogènesi hepàtica (Cao et al. 2002). Com es resumeix en el següent esquema:



Aquesta hipòtesi explicaria perquè les CEH procedents de TNFR-DKO i TNFR1-KO mostren uns nivells inferiors de pro-col·lagen basal, ja que al tenir també uns nivells basals inferiors de MMP-9, el TGF- $\beta$  s'expressaria normalment, però no seria activat en la mateixa mesura per MMP-9, resultant així en una inducció i expressió inferior de pro-col·lagen tipus 1.

#### ❖ ***Cross-talk entre la via de senyalització de TNF i PDGF***

Una observació prou sorprenent va ser la disminució de la proliferació que observarem en les CEH TNFR-DKO en comparació amb les CEH control. En quan al mecanisme d'aquesta observació, podem dir que aquesta disminució és conseqüència d'una defectuosa via de senyalització PI3K-AKT en les CEH TNFR-DKO, que es reproduïa en ratolins TNFR1-KO però no en ratolins TNFR2-KO. En efecte, malgrat que la unió lligand PDGF-receptor i conseqüent degradació del receptor (PDGFR) es donava correctament, les CEH provinents de ratolins TNFR-DKO com TNFR1-KO mostren una menor fosforilació d'AKT i una menor proliferació en resposta a PDGF (un potent mitògen de les CEH). Aquestes observacions suggereixen que proteïnes o mediadors necessaris per a la senyalització de PDGF localitzades per sobre d'AKT dependrien d'una senyalització a través de TNFR1 indicant un *cross-talk* entre el receptor de PDGF i TNFR1. Malgrat que estudis anteriors en cèl·lules de musculatura llisa vascular indicaven una superposició similar de les vies de PDGF i TNF necessàries per a la migració i la proliferació cel·lular (Peppel et al. 2005), encara no hem pogut

establir quina proteïna o proteïnes estan involucrades en aquest procés. En aquest aspecte, Ceccarelli *et al.* proposaven a la proteïna cinasa R (*PKR*, *Protein Kinase R*) com a una potencial candidata per a ser el mediador del *cross-talk* entre PDGF i la senyalització del receptor 1 de TNF, ja que s'ha vist que aquesta proteïna està involucrada d'alguna manera en la via de senyalització de PDGF, i que la proliferació induïda per TNF es veu suprimida en les cèl·lules deficientes en PKR (Ceccarelli *et al.* 2011). De forma paral·lela, observacions recents també indiquen que PKR es fosforila ràpidament després de la unió dels receptors de TNF en resposta a TNF (Sharma *et al.* 2011). Tot i que el grup italià argumentava una major expressió de la proteïna PKR en resposta a TNF en les LX2, nosaltres no observarem cap diferència en l'expressió d'aquesta proteïna en les CEH primàries procedents de TNFR1-KO i TNFR-DKO (Tarrats *et al.* 2011). Així doncs, malgrat que aquestes observacions inicials no donen suport a un paper crític per PKR en els efectes proliferants de TNF en les CEH murines, altres intermediaris desconeguts involucrats en l'activació de NF- $\kappa$ B podrien participar també en el *cross-talk* entre TNF i PDGF.

#### ❖ **L'ASMasa en la transdiferenciació de les CEH**

La regulació a l'alça de l'ASMasa ha estat descrita en processos tan diversos com la diferenciació de monòcits a macròfags (Langmann *et al.* 1999), i la diferenciació induïda per drogues de les cèl·lules leucèmiques (Murate *et al.* 2002). Per altra banda, la participació de la ceramida generada per l'ASMasa s'ha relacionat amb múltiples processos cel·lulars d'impacte fisiològic o patològic com l'apoptosi induïda per radiació (Santana *et al.* 1996), la malaltia de Wilson (Lang *et al.* 2007), l'hepatitis fulminant (García-Ruiz *et al.* 2003), fibrosi quística (Teichgräber *et al.* 2008), emfisema (Petrache *et al.* 2005), o altres malalties comuns (Smith & Schuchman 2008). Fins i tot hi ha observacions recents que suggereixen que l'activació de CEH de rata per àcids biliars hidrofòbics vindria donada per les NADPH oxidases de forma ASMasa i PKC dependent (Sommerfeld *et al.* 2009). Tot i així, la contribució *per se* de l'ASMasa en l'activació de les CEH i en el procés fibrogènic no s'havia estudiat específicament. Així doncs, emprant CEH *in vitro* i models *in vivo* de fibrosi hepàtica hem descrit un paper fins ara desconegut de l'ASMasa en l'activació de les CEH i la fibrosi hepàtica, i hem establert una relació causal entre l'activitat ASMasa i les catepsines en la biologia de les CEH. Així, els nostres resultats indicaven que la inhibició farmacològica o el silenciament de

l'ASMasa disminueixen el fenotip pro-fibrogènic de les CEH, donant suport a una participació de l'ASMasa en la transdiferenciació de les CEH. A més a més, la implicació de l'ASMasa en l'activació i proliferació de les CEH va ser validada en les LX2, indicant que la regulació de l'activació de les CEH per l'ASMasa podria tenir una rellevància potencial en la fibrosi hepàtica humana. Mentre que la participació de les catepsines B i D en l'activació de les CEH i la fibrogènesi ja havia estat revelada en estudis del nostre mateix grup (Moles et al. 2009), els estudis actuals van una mica més enllà posicionant a l'ASMasa per sobre de les catepsines.

#### ❖ ***La jerarquia de l'ASMasa i les catepsines en la transdiferenciació de les CEH***

Tot i que les dianes de la ceramida derivada de l'ASMasa no estan encara ben definides, diversos estudis previs relacionen la ceramida amb el procés de mort cel·lular (Morales et al. 2007). Per exemple, en el dany hepàtic, s'ha observat que l'activació de l'ASMasa promou l'apoptosi dels hepatòcits mitjançant TNF (García-Ruiz et al. 2003; Marí et al. 2004), isquèmia-reperfusió (Llacuna et al. 2006) o la malaltia de Wilson (Lang et al. 2007). Els nostres resultats afegeixen una altra faceta de l'ASMasa a la fisiopatologia del fetge: l'ASMasa promou l'activació de les CEH i la fibrosi hepàtica mitjançant la regulació del processat de les catepsines B i D. Tot i que les catepsines, i possiblement altres proteases àcides, participen en el seu processat (Moles et al. 2009), les nostres observacions indiquen que l'ASMasa és essencial pel processat de la CtsB/D, però no *vice versa*, suggerint així que l'ASMasa es troba per sobre de les dues catepsines. A diferència de la inhibició farmacològica de l'ASMasa, que impedeix la maduració de la CtsB/D i en conseqüència condueix a una menor activació de les CEH, la inhibició de la CtsB no afecta a l'activitat de l'ASMasa durant l'activació *in vitro* de les CEH, indicant que l'ASMasa és necessària i està per sobre la via del processat proteolític de les CtsB/D, i que la regulació a la baixa gradual de l'ASMasa, com en els ratolins heterozigots de l'ASMasa, resulta en un menor processament i activació de les CtsB/D. D'aquesta manera, l'ASMasa tindria un paper directe en la fibrogènesi hepàtica determinat per la regulació de l'activació i proliferació de les CEH a través del processat de la CtsB/D.

És important recalcar que malgrat que ambdues catepsines, CtsB i CtsD, participen en l'activació de les CEH, el fet que ens centréssim en la inhibició únicament de la CtsB tan en els estudis *in vitro* amb CEH (Moles et al. 2010) com *in vivo* amb pacients amb NPD, (Moles et al. 2012) ve motivada per diferents arguments:

- L'inhibidor de la CtsB, Ca074Me, és altament específic. No hi ha però un inhibidor selectiu de CtsD donat que la Pepstatin A inhibeix aspartil proteases en general.
- La inhibició de la CtsB amb Ca074Me condueix de forma paral·lela a una disminució del processat de CtsD.
- Els nostres estudis *in vivo* amb models de fibrosi indiquen a més, que a diferència de la CtsD, l'expressió de la CtsB sembla estar més subjecte i restringida a les CEH activades, suggerint així que la CtsB podria ser una millor diana per estudiar el seu paper en la fibrosi hepàtica.

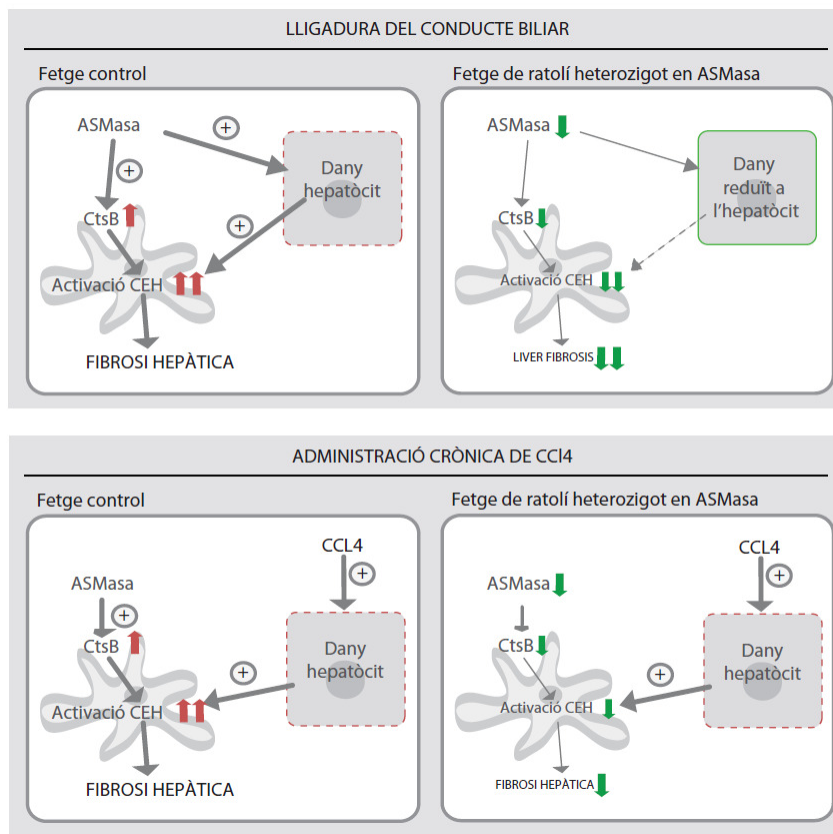
Així doncs, tot i que els resultats que presentem donen suport a un paper crític per a la CtsB, no podem descartar una potencial contribució d'altres catepsines com ara la CtsD.

#### ❖ ***Paper dual de l'ASMasa en malalties hepàtiques: pro-fibrogènic i pro-apoptòtic***

Com ja hem comentat, els nostres resultats obtinguts amb els ratolins heterozigots de l'ASMasa (ASMasa<sup>+/-</sup>) mostren la participació de l'ASMasa en la regulació de l'activació i proliferació de les CEH *in vitro* així com en la fibrogènesi hepàtica *in vivo* mitjançant la modulació del processat de les CtsB/D. Tot i que el paper de l'ASMasa en la fibrosi hepàtica *in vivo* induïda per LCB i CCl<sub>4</sub> és consistent amb les nostres observacions *in vitro*, l'impacte de l'ASMasa en el dany als hepatòcits causat per la colèstasi és sorprenent i inesperat i mereix ser comentat amb més detall. L'abast del dany hepàtic causat per la LCB, dany mediat predominantment per l'acumulació d'àcids biliars tòxics, era extens en animals control i acompanyat per infiltració de cèl·lules inflamatòries, trets que estaven clarament reduïts en els animals ASMasa heterozigots. Així doncs, la pèrdua d'activitat ASMasa i en conseqüència de processat de les CtsB/D, condueixen a un fenotip protegit davant la fibrogènesi induïda per LCB, i mostren un nou paper per a l'ASMasa en el dany hepatocel·lular mediat per colèstasi. Recentment, un estudi avaluava el rol

específic de l'ASMas en les cèl·lules de Kupffer durant la colèstasi induïda per LCB. Un tant en contra de les nostres observacions, el silenciament de l'ASMas en les cèl·lules de Kupffer, però no en els hepatòcits, impedia l'activació d'AKT mediada per LCB en els hepatòcits, la qual cosa era essencial per a la supervivència cel·lular i la regeneració hepàtica (Osawa et al. 2010). Per altre banda, s'ha descrit que l'àcid deoxicòlic activa la proteïna c-Jun cinasa NH<sub>2</sub>-terminal (cinasa activada per estrès que regula la mort cel·lular) mitjançant un mecanisme que involucra l'ASMas i el receptor Fas (Gupta et al. 2004). Així, tot i que estava fora de l'àmbit del nostre estudi, les nostres observacions apunten a un nou paper per l'ASMas en el dany a l'hepatòcit induït per colèstasi produïda per la LCB.

Paral·lel al menor dany per colèstasi observat en els hepatòcits dels ratolins ASMas<sup>+/-</sup>, també observàvem una disminució significativa de l'expressió de col·lagen i una menor fibrosi hepàtica, d'acord amb la noció de que el dany hepatocel·lular és un important desencadenant de l'activació de les CEH i d'aquí la fibrosi observada en altres estudis com el de Canbay *et al.* (Canbay et al. 2003). Per altre banda, en el model experimental de fibrosi hepàtica induïda per l'administració crònica de CCl<sub>4</sub>, els ratolins heterozigots de l'ASMas mostren un dany hepàtic similar al dels ratolins control, però que va acompanyat d'una menor fibrosi, fent més forta així l'evidència de la contribució de l'ASMas en l'activació de les CEH de manera independent al dany hepatocel·lular. La contribució diferencial de l'ASMas al dany hepàtic i la fibrogènesi en els dos models de fibrosi emprats, es resumeix en el següent esquema:



En general, els nostres resultats indiquen una funció dual de l'ASMasa en la fibrogènesi hepàtica amb un paper directe principalment determinat per la regulació de l'activació/proliferació de les CEH via el processat de la CtsB/D, i un paper indirecte a través de la modulació de la susceptibilitat dels hepatòcits a l'apoptosi induïda per colèstasi, i potser també altres formes de dany hepàtic. En vista dels nostres resultats que indiquen que l'ASMasa està per sobre de la CtsB en les CEH, i el paper crític de la CtsB en la mort dels hepatòcits induïda per LCB (Canbay et al. 2003), la relació funcional entre l'ASMasa i la CtsB en la susceptibilitat hepatocel·lular a colèstasi mereix una investigació més profunda. Donat que en varis estudis se li atribueix a l'ASMasa un paper en el dany hepatocel·lular (García-Ruiz et al. 2003; Marí et al. 2004), i en la fibrosi hepàtica en l'estudi que presentem (Moles et al. 2010), aquest enzim seria una diana prou atractiva per les malalties hepàtiques cròniques. Per tant, una teràpia basada en l'antagonisme de l'ASMasa podria induir un efecte beneficiós dual, per una banda limitant l'activitat ASMasa en els hepatòcits i protegint-los així del dany hepatocel·lular, i per altre banda interferint en l'activació de les CEH i reduint la fibrosi hepàtica.

Finalment, els nostres resultats indiquen que pacients amb esteatohepatitis no alcohòlica (*non-alcoholic steatohepatitis, NASH*) exhibeixen uns nivells d'expressió augmentats d'ASMasa i CtsB a nivell d'RNAm, comparats amb pacients control. Aquestes dades, malgrat ser importants, indiquen una sobreregulació de CtsB i ASMasa en un context patològic crònic, però són limitades en interpretació perquè no podem excloure la contribució d'altres característiques pròpies del NASH, diferents a la presència de fibrosi, com l'apoptosi. Per tant, es necessita aprofundir més per identificar la població cel·lular amb l'expressió augmentada de CtsB i ASMasa en aquests pacients i els mecanismes responsables per aquests successos en els fetges humans, i validar si aquest augment en l'RNAm de ASMasa/CtsB es dona en la fibrosi hepàtica de diferents etiologies, com seria una hepatitis viral crònica, entre d'altres.

❖ ***La pèrdua total d'activitat ASMasa sensibilitza a la fibrosi hepàtica i serveix com a model per a la NPD***

La malaltia de Niemann-Pick (NPD) és un desordre lisosomal poc comú causat per mutacions en el gen *sphingomyelin phosphodiesterase 1 (SMPD1)*, que codifica per l'ASMasa i resulta en una disminució important en l'activitat de la mateixa. Els pacients amb aquesta malaltia exhibeixen, en funció del grau d'afectació, neurodegeneració (la forma més severa o tipus A), disfunció pulmonar, hepatoesplenomegàlia, i malaltia hepàtica (la forma visceral o tipus B). Tot i que totes les malalties de desordres lisosomals es caracteritzen per l'acumulació intralisosomal de substrats sense metabolitzar, sent aquesta la principal causa de la malaltia, la gran varietat de símptomes indiquen que moltes vies cel·lulars i bioquímiques secundàries poden contribuir a la sobreabundància de diferents fenotips (Futerman & van Meer 2004). Actualment no existeix cap tractament pels pacients amb NPD, i el grau d'afectació depèn de l'activitat ASMasa romanent.

Els resultats de l'estudi publicat recentment al *Journal of Biological Chemistry* (Moles et al. 2012) contrasten amb el que havíem establert prèviament per l'ASMasa i les CtsB/D en les CEH i la fibrosi en l'estudi anterior (Moles et al. 2010). Sorprenentment, hem observat que l'ablació genètica de l'ASMasa, observada en els ratolins *knockout* (ASMasa<sup>-/-</sup>), condueix a un increment paradoxal dels nivells basals i activitat de la CtsB i CtsD, fet que confereix un potencial proliferatiu i fibrogènic major a les CEH procedents d'aquests ratolins, conduint finalment a

una fibrosi hepàtica augmentada. Com que havíem observat que l'ASMasa és crítica pel processat proteolític de les CtsB/D (Moles et al. 2010), aquests nous resultats indiquen que la pèrdua total d'ASMasa condueix a un guany de funció compensatori per part de les catepsines, les quals al seu torn, agreugen la fibrosi hepàtica després del tractament crònic amb CCl<sub>4</sub>. Com està ben descrit en la literatura, la pèrdua total d'ASMasa és patològica i serveix com a model per a la malaltia de Niemann-Pick tipus A, i tot i que aquesta malaltia està caracteritzada per una ràpida neurodegeneració, aquests pacients també solen exhibir deteriorament hepàtic, amb alguns casos de pacients que moren de fallida hepàtica dins dels 3 anys abans de l'inici dels símptomes neurològics (Schuchman 2007). De manera interessant, la introducció d'un gen parcialment funcional (~8 % d'activitat ASMasa residual) en ratolins *knockout* de l'ASMasa, prevé el fenotip neurològic, i els ratolins mostren una mitjana de vida normal (Marathe et al. 2000). Per tant, aquestes observacions donen evidències de que nivells molt baixos d'activitat ASMasa són suficients per eliminar l'estat patològic induït per a la deficiència total d'ASMasa, il·lustrant així el paper paradoxal de l'ASMasa en la fisiopatologia (Schuchman 2007).

#### ❖ ***La CtsB com a diana per la fibrosi en la NPD tipus A***

Degut al paper crític de la CtsB en la fibrosi hepàtica (Moles et al. 2009), la relació directa proporcional entre la regulació a la baixa d'ASMasa i la CtsB dicta una menor susceptibilitat dels ratolins heterozigots de l'ASMasa (ASMasa<sup>+/-</sup>) a la fibrosi hepàtica. Per altre banda, la pèrdua d'ASMasa per sota d'un llindar crític resulta en un augment adaptatiu dels nivells basals d'algunes catepsines i un augment del processat proteolític durant l'activació de les CEH *in vitro* que sensibilitza els ratolins ASMasa<sup>-/-</sup> a la fibrosi hepàtica *in vivo*. Els resultats obtingut en aquest estudi tornen a posar de manifest que és la CtsB, i no l'ASMasa, la responsable de l'augment de la fibrosi hepàtica observat *in vivo*, ja que la seva inhibició farmacològica, en un context d'absència d'activitat ASMasa, redueix la fibrosi en el fetge (Moles et al. 2012). L'inesperat efecte "rebot" entre la pèrdua d'ASMasa i l'activació de la CtsB podria ser d'especial rellevància pels pacients amb NPD tipus A, ja que, si com hem observat, la inhibició farmacològica de la CtsB disminueix l'activació *in vitro* de les CEH procedents dels ratolins ASMasa<sup>-/-</sup> i la fibrosi hepàtica *in vivo*, suggeriria que la CtsB podria ser una nova diana



terapèutica pel tractament de la fibrosi hepàtica subjacent dels pacients amb NPD.

Similar al fenotip NPD, els pacients amb la malaltia de Niemann-Pick tipus C1 (NPC1), causada per mutacions en NPC1, una proteïna endo/lisosomal que regula el tràfic de colesterol intracel·lular, mostra canvis bioquímics similars incloent acumulació de colesterol lliure, esfingolípid i bis-(monoacilglicerol) fosfat, en els compartiments intracel·lulars com lisosomes i mitocòndries dels òrgans afectats com el fetge o el cervell (Yu et al. 2005; Marí et al. 2006). De manera interessant, similar als estudis presentats en aquesta tesi, Amritraj *et al.* descriuen un augment de l'activitat CtsB en neurones de cerebel de ratolins *knockout* per NPC1 (NPC1<sup>-/-</sup>) (Amritraj et al. 2009). Consistent amb la falta de degeneració neuronal en l'hipocamp dels ratolins NPC1<sup>-/-</sup>, no s'observava l'activació de la CtsB en aquesta població particular de neurones, establint així una correlació entre l'augment de l'activitat de CtsB i la disfunció neurològica selectiva en la malaltia NPC1.

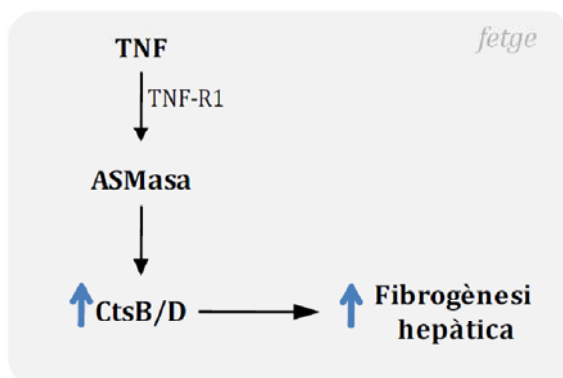
❖ ***La CtsB i la CtsD augmenten també a altres òrgans afectat pel fenotip NPD***

Una característica important de l'estudi que presentem és que la regulació a l'alça de les CtsB/D deguda a la falta d'ASMas no està restringida al fetge sinó que també l'observem en altres òrgans afectats com el cervell o el pulmó en un mecanisme edat-depenent. Cal fer esment que en el fenotip sever neurològic o tipus A de la malaltia, hi ha un llindar d'activitat ASMas per sota del qual apareixen els símptomes. Com ja hem comentat, emprant el ratolí deficient en ASMas s'ha vist que una mutació específica que dóna una activitat ASMas tant petita com un 8%, pot prevenir completament l'aparició de la malaltia neurològica (Jones et al. 2008). A més, mentre que l'activitat residual d'ASMas d'un 5% aproximadament resulta en la NPD visceral o de tipus B, una reducció una mica més gran, entre l'1-2% o menys, induïx el fenotip més sever del tipus A (Graber et al. 1994). Aquestes observacions posen de manifest el fet de que tot i que baixos nivells d'activitat ASMas són suficients per a mantenir intacta la funció neurològica, l'absència d'aquesta activitat té conseqüències devastadores en el cervell (Ledesma et al. 2011). D'aquesta manera, malgrat que la teràpia ideal per NPD seria poder restablir l'activitat ASMas, l'extrapolació de les nostres observacions, un augment de CtsB secundari a la pèrdua d'ASMas a teixits

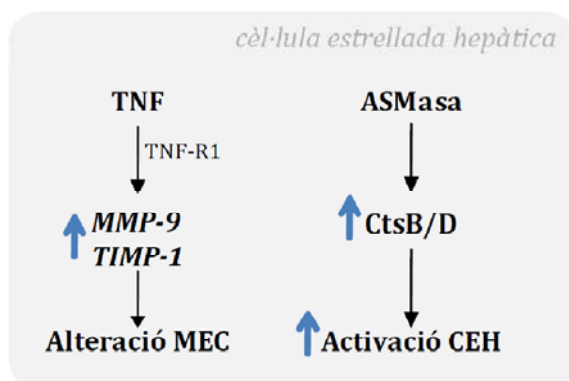
extrahepàtics, obre noves dianes o vies d'estudi en la malaltia de NPD. Consistent amb aquest concepte de tractament d'un enzim secundari al causant de la malaltia, s'ha vist que els defectes observats en el fenotip de la malaltia NPC1, incloent l'acumulació del colesterol lliure entre d'altres, podria ser corregida mitjançant la sobreexpressió d'ASMasa, l'expressió de la qual també està disminuïda en la malaltia NPC1 (Devlin et al. 2010).

### ❖ *Consideracions finals*

En un principi, i basant-nos en estudis previs del nostre grup, la nostre hipòtesi pretenia relacionar TNF, a través de TNFR1, amb l'ASMasa i les catepsines en el procés d'activació de les CEH i la fibrogènesi hepàtica, relacionant així els OBJECTIUS 1 i 2 d'aquesta tesi, seguint el següent esquema:



Però, després de la nostra recerca, vam poder constatar que aquesta hipòtesi inicial no era vàlida donat que, tot i que TNF activa l'ASMasa en l'hepatòcit contribuint així al dany hepàtic, no tenim evidències que aquesta activació tingui lloc en el context de les cèl·lules estrellades hepàtiques, o si més no, no ho fa de manera directa. Així doncs, podríem resumir que:



## CONCLUSIONS



Les conclusions d'aquests estudis són:

1. El TNF participa en el procés de fibrogènesi mitjançant la inducció de l'expressió de MMP-9 i TIMP-1 a les cèl·lules estrellades hepàtiques, i ho fa a través del receptor 1 de TNF.
2. De la mateixa manera, el TNF és essencial per a la proliferació de les cèl·lules estrellades hepàtiques controlant l'activació d'AKT per PDGF.
3. L'esfingomielinasa àcida participa en la fibrosi hepàtica mitjançant la regulació a l'alça del processat de les CtsB/D. La disminució de l'activitat ASMasa condueix a una reducció de CtsB/D, fet que protegirà davant la fibrosi hepàtica.
4. La deficiència total d'ASMasa indueix un efecte "rebot" en l'expressió de la CtsB, fent que s'expressi de forma exagerada, i susceptibilitza l'individu a una fibrosi hepàtica. La catepsina B, i no la ASMasa, és doncs la responsable directe de l'inducció de la fibrogènesi hepàtica.
5. L'ablació de l'ASMasa en ratolí, model animal de la malaltia de Niemann-Pick tipus A, condueix a una sobreexpressió de CtsB no només en el fetge sinó també en òrgans extrahepàtics com pulmó i cervell, suggerint la CtsB com a possible diana terapèutica per la malaltia.



Annex:

## MATERIALS i MÈTODES





\*Tots els reactius són de *Sigma-Aldrich* excepte si s'especifica el contrari

### **1. Animals d'experimentació**

Com a animals control o *wild type* (WT) es van utilitzar ratolins de 12-20 setmanes de la soca C57BL/6 procedents de Charles River Laboratoris. També varem emprar ratolins deficients pel receptor 1 de TNF (TNFR1-KO), pel receptor 2 (TNFR2-KO) i deficients pels dos receptors (TNFR-DKO), també de la soca C57BL/6, generós obsequi del Dr. Horst Bluethmann (*Discovery Technologies, Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Suïssa*), que es van propagar mitjançant parelles homozigotes; i ratolins salvatges, heterozigots i deficients en esfingomielinase àcida (ASMas KO), donats pel Dr. Richard Kolesnick (*Laboratory of Signal Transduction, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York*), que es van propagar mitjançant el creuament d'heterozigots.

Tots els animals van ser cuidats d'acord amb les directrius marcades en el Decret 214/1997. Els ratolins estan ubicats a l'estabulari de la Facultat de Medicina (Universitat de Barcelona, Hospital Clínic), en un règim horari de 12 h de llum/12 h de fosc, amb disponibilitat d'aliment i aigua de beguda *ad libitum*.

### **2. Cultiu cel·lular**

Les condicions de cultiu per tots els tipus cel·lulars van ser en incubadors a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>, amb medi DMEM (*Gibco*) complementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS, *Gibco*), 100 U/mL de penicil·lina (*Gibco*) i 100 U/mL de estreptomicina (*Gibco*). Addicionalment, quan fem servir CEH primàries també s'hi afegia 0,25 µg/mL de Fungizona (*Invitrogen*).

#### *2.1. Aïllament de CEH*

Les CEH van ser aïllades a partir de ratolins, mitjançant la perfusió del fetge amb una bomba de flux peristàltic. Primer es neteja el fetge amb tampó Hanks-I temperat a 37°C, complementat amb EGTA que evitarà la cascada de coagulació, i seguidament es digereix el fetge amb tampó Hanks-II igualment temperat, que duu la col·lagenasa i el calci necessari perquè l'enzim s'activi. Un cop digerit el fetge el disgreguem en tampó Krebs i obtenim les CEH per centrifugació diferencial.

*Procediment:*

- Tot el material que s'utilitza ha d'estar autoclavat i estèril, per tal d'evitar contaminacions posteriors en el cultiu.
- Preparar els tampons Hanks I, II i Krebs. El tampó Hanks es prepara a partir d'una solució mare 10X (1.4 M NaCl, 53.6 mM KCl, 8.1 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 8.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), base de la solució 1X (10% solució 10X, 12.6 mM Hepes, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>) que es deixarà bombollejant amb carbògen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) durant 20 min. Al mateix temps es prepara la solució Krebs (9.5 g/L Krebs-Henseleit (*Sigma*, *Cat# K3753*), 16.8 mM Hepes, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>) i també es bombolleja amb carbògen. Un cop bombollejats es comprovarà que el pH sigui 7.2-7.4, i si no està dins d'aquest rang es rectificarà amb NaOH.
- Es prepara la solució Hanks-I (Hanks 1X bombollejat, 0.5% BSA, 0.90 mM EGTA), la solució Hanks-II (Hanks 1X bombollejat, 160 U/mL col·lagenasa, 4 mM CaCl<sub>2</sub>), i la solució Krebs (Krebs bombollejat, 2.7 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O). Filtrar els tampons i escalfar el Hanks-I i -II a 37°C.
- Anestesiàr al ratolí amb pentobarbital al 5% (dosi de 1 µL/g animal).
- Un cop comprovat que el ratolí ha perdut tots els reflexes, obrir l'animal per la zona distal del peritoneu i retirar el paquet intestinal cap a una banda deixant a la vista la vena porta i la vena cava.
- Introduir dues sutures: una per sota la vena porta, i l'altre per sota la vena cava inferior.
- Introduir el catèter per la vena porta i tancar la primera sutura.
- Connectar el catèter a la bomba, tallar la vena cava per sota la sutura i començar a perfondre amb Hanks-I a un flux de 8-10 mL/min.
- Obrir la cavitat toràcica pel diafragma i tallar la vena aorta que va al cor. Tancar la sutura de la vena cava.
- Un cop el fetge estigui completament net de sang (aprox. 5min) canviar la bomba al tampó Hanks-II i observar el fetge fins que es fa evident la digestió (el fetge es torna pàl·lid, perd turgència i és sensible al tacte).
- Extreure el fetge i disgregar-lo amb solució de Krebs fent sortir les cèl·lules hepàtiques amb l'ajuda d'unes pinces.
- Centrifugar a 4°C, 4 min a 60g. El pelet que obtenim són les cèl·lules parenquimals o hepatòcits, que descartarem.

- Recollir el sobrenedant i el centrifuguem a 450g 10 min a 4°C. En el pelet que obtindrem hi haurà les cèl·lules no parenquimals.
- Ajuntarem 2 o 3 pelets de cèl·lules no parenquimals (procedents de 2 o 3 ratolins) en una solució Nycodenz al 17% en Krebs portant el volum fins a 30 mL.
- Centrifugar 20 min a 1400g a 4°C. Les CEH quedaran en la banda superior més tèrbola. Recollirem les CEH en un falcon de 50 mL i pujarem el volum fins a 50 mL amb Krebs-Henseleit.
- Centrifugar 10 min a 450g a 4°C. El pelet que obtenim es resuspendrà en DMEM complementat.

### *2.2. Cultiu de CEH*

Està descrit que les CEH s'adhereixen al plàstic, i que un cop adherides, inicien la seva activació (Weiskirchen & Axel M Gressner 2005). Una manera de valorar la puresa de les CEH aïllades és la observació del seu contingut en retinoids (Vitamina A) sota llum ultraviolada. Aquest procés es pot observar des de l'inici de l'aïllament fins al cap d'unes 24-48h. La contaminació amb cèl·lules de Kupffer es determinarà puntualment mitjançant immunocitoquímica amb l'anticòs F4/80. Al cap de 2 dies aproximadament, aniran perdent els retinoids i començarà el procés d'activació canviant d'una forma esfèrica a una forma tipus miofibroblast. La puresa de les preparacions, un cop fet el primer rentat, està entre el 90-95%.

#### *Procediment:*

- Resuspendre el pelet en medi DMEM complementat
- Plaquejar i deixar en cultiu de 4 a 5 h perquè s'adhereixin les cèl·lules.
- Rentar amb PBS 1X i canviar el medi. Repetir aquesta acció l'endemà al matí, i deixar créixer.

### *2.3. Línies cel·lulars*

La línia cel·lular de cèl·lules estrellades humanes LX2 (Xu et al. 2005), va ser cedida amablement pel Dr. Ramón Bataller de l'Hospital Clínic de Barcelona.

#### 2.4. Tractaments

Tots els experiments de senyalització es van fer en condicions de concentració baixa de sèrum, concretament amb DMEM complementat amb 100 U/mL penicil·lina/estreptomicina i 0.5% FBS. Els productes i dosis que hem fet servir per als tractaments van ser els aquí especificats:

- LPS (serotip 0128:B12) a 50 ng/mL
- TNF- $\alpha$  a 10 ng/mL o bé 50 ng/mL (*PeprroTech*)
- PDGF- $\beta$  a 10 ng/mL o bé 20 ng/mL (*PeprroTech*)
- IL-1 $\alpha$  a 50 ng/mL (*PeprroTech*)
- IL-1 $\beta$  a 50 ng/mL (*PeprroTech*)
- Anticossos bloquejants contra el TNFR1 (#MAB625) i TNFR2 (#MAB726) humans a 10  $\mu$ g/mL (*R&D Systems*)
- Ca074-Me a 10 o 20  $\mu$ M

### 3. Obtenció de proteïnes

#### 3.1. Obtenció de lisats a partir de CEH

*Procediment:*

- Aspirar el medi i rentar amb PBS 1x. Descartar el PBS.
- Afegir a la placa 150-200  $\mu$ L de tampó RIPA (50 mM Tris-HCl (*Fluka*), 1% Igepal, 0.25% Na-deoxicolat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, complementat amb antiproteases (Complete, *Roche*), i rascar la placa o els pous.
- Recollir tot el volum en un eppendorf, i deixar en gel 15 min. Anar vortejant.
- Centrifugar a 12000g 10 min a 4°C. Descartar el pelet.
- Recollir el sobrenedant i guardar una alíquota per quantificar proteïna. La resta es congela a -20°C.

#### 3.2. Obtenció d'homogenats a partir de fetge total

*Procediment:*

- Pesem entre 150-200 mg de fetge i l'homogeneïtzem en 1.5-2.0 mL (mantenint la relació 100 mg fetge per mL) de tampó Homobuffer (70 mM Sacarosa, 220 mM Manitol, 3 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% BSA lliure d'àcids grassos, complementat amb antiproteases).
- Fer una relació 1:1 amb RIPA i vortejar.
- Deixar en gel 15 min i anar vortejant.

- Centrifugar a 12000g 10 min a 4°C. Descartar el pelet.
- Recollir el sobrenedant i guardar una alíquota per quantificar proteïna. La resta es congela a -20°C.

### 3.3. Quantificació de proteïnes

Es va determinar la quantitat de proteïna pel mètode de Bradford basat en el canvi de coloració (de vermell a blau), i per tant d'absorbància, que experimenta el tint *Coomassie Brilliant Blue G-250* al unir-se a proteïnes. L'absorbància de la dilució de la nostre mostra amb el reactiu Bradford (*BioRad*) es llegeix a l'espectrofotòmetre, a 595 nm. A partir de l'absorbància es calcula la concentració respecte a una recta d'estàndards de concentració coneguda. Els estàndards es preparen a partir d'una solució d'Albúmina bovina, i comprenien des de 0 fins a 0.5 µg/µL.

## 4. Detecció de proteïnes per Western-blot (WB)

Les mostres s'obtenien com s'especifica en l'apartat 3, i es barregen amb tampó de càrrega 2x (4% SDS, 20% glicerol, 10% β-mercaptoetanol, 0.004% blau de bromofenol i 0.125 M Tris HCl, pH 6.8). Es bullen les mostres durant 3-5min i es procedeix a carregar els gels (6, 8 o 12% d'acrilamida) amb una quantitat de proteïna aproximada de 5-20 µg.

### 4.1. Electroforesi en gels de SDS-poliacrilamida

Aquest és un tipus d'electroforesi desnaturalitzant ja que les mostres es desnaturalitzen per calor en presència d'agents desnaturalitzants, com el β-mercaptoetanol afegit a les mostres en el tampó de càrrega 2x, i el SDS (Sodi Dodecil Sulfat) que envolta les molècules de càrrega negativa. Així doncs les proteïnes es separen segons el seu pes i migren cap al pol positiu creat per un camp elèctric a través d'una matriu porosa d'acrilamida (a % d'acrilamida més elevat, porus més petit). Es podrà doncs determinar el pes molecular de cada proteïna comparant-les amb un patró de pesos moleculars coneguts.

#### *Procediment:*

- Preparar els gels d'acrilamida amb Solució 1 (0.75 M Tris-HCl, 0.2% SDS a pH 8.8), Acrilamida al 30%, Solució 3 (0.25 M Tris-HCl, 0.2% SDS a pH 6.8), aigua destil·lada, TEMED (*Fluka*), i Persulfat d'Amoni (APS) al 13%.

Resolving	6% acril.	8% acril.	12% acril.	Stacking (10%)
Sol. 1 pH 8.8	5 mL	5 mL	5 mL	0
Acilamida	2.05 mL	2.7 mL	4.08 mL	0.54 mL
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	2.95 mL	2.3 mL	1 mL	1.8 mL
Sol. 3 pH 6.8	0	0	0	2.25 mL
TEMED	14 µL	14 µL	14 µL	11.25 µL
APS 13%	50 µL	50 µL	50 µL	45 µL

- Un cop barrejades les mostres amb el tampó de càrrega, les bullim durant 4 min. Vortegem i fem un spin.
- Carreguem les mostres i el marcador de pesos moleculars Novex (*Invitrogen*).
- Procedir a córrer els gels en tampó d'electroforesi (25 mM Tris, 192 mM glicine, 0.1% SDS, pH 8.3, a partir de solució Tris-Glicina-SDS 10X (*BioRad*)). Posar el voltatge a 80 V fins que el front sobrepassa el gel concentrador o *Stacking*. Llavors es puja el voltatge a 110-120 V fins que surt el front del gel separador o *Resolving*.

#### 4.2. Transferència de proteïnes

Es transfereixen les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa.

##### *Procediment:*

- Fer la transferència amb el tampó de transferència (25 mM Tris, 192 mM glicine, pH 8.3, a partir de la solució Tris-Glicina 10X (*BioRad*) amb un 20% de metanol) prèviament refrigerat a 4°C, a un voltatge de 290 mA durant 1 h.
- Bloquejar la membrana amb solució de bloqueig a base de llet (8% llet, desnatada i en pols, en TBS-T), o a base d'albumina bovina (BSA; *bovine serum albumin*) (5% BSA en TBS-T) durant 1 h. La solució TBS-T conté: 0.05 M tampó Tris (NaCl - 0.138 M; KCl - 0.0027 M), i 0.1%, TWEEN® 20, pH 8.0.

#### 4.3. Incubació amb Anticossos

Aquest procés consisteix en la detecció indirecta de proteïnes utilitzant anticossos (primaris) contra les proteïnes transferides a la membrana de nitrocel·lulosa. El complex antigen-anticòs que es forma serà detectat per

un segon anticòs (secundari) portador de l'enzim peroxidasa que reaccionarà amb el substrat que li proporciona els líquids de revelat, produint una reacció de quimioluminiscència.

*Procediment:*

- Incubar la membrana amb l'anticòs primari o/n a 4°C o bé 2 h a temperatura ambient, el temps d'incubació dependrà de l'anticòs emprat.
- Rentar amb TBS-T, 4 rentats de 15 min, i posteriorment incubar la membrana amb l'anticòs secundari durant 1 h a temperatura ambient.
- Rentar amb TBS-T, 4 rentats de 15min. Temperar els líquids de revelat.
- Incubar 1 min la membrana amb el reactiu de revelat ECL (*Pierce*) i revelar amb films d'autoradiografia CL-XPosure™ Film (*Thermo Scientific*) o bé amb el LAS-4000.
- Taula d'anticòsos primaris:

<b>Anticòs</b>	<b>Dilució</b>	<b>Ref. #</b>	<b>Casa comercial</b>
p65 Nuclear Factor	1:250 en TBS-T	SC-109	<i>Sta. Cruz Biotech.</i>
$\alpha$ -SMA	1:1000 en TBS-T	A2547	<i>Sigma</i>
Fosfo-AKT	1:250 en TBS-T + BSA	SC-7985-R	<i>Sta. Cruz Biotech.</i>
AKT	1:250 en TBS-T + BSA	SC-1619	<i>Sta. Cruz Biotech.</i>
PDGFR- $\beta$	1:1000 en TBS-T + BSA	06-498	<i>Upstate</i>
MMP-9	1:250 en TBS-T	SC-6841	<i>Sta. Cruz Biotech.</i>
Fosfo-ERK 1/2	1:1000 en TBS-T + BSA	9101	<i>Cell Signaling</i>
ERK ½	1:1000 en TBS-T + BSA	9102	<i>Cell Signaling</i>
Fosfo-JAK2	1:1000 en TBS-T + BSA	3776	<i>Cell Signaling</i>
JAK-2	1:1000 en TBS-T + BSA	3230	<i>Cell Signaling</i>
Catepsina B	1:2000 en TBS-T	06-480	<i>Upstate</i>
Catepsina D	1:250 en TBS-T	SC-6486	<i>Sta. Cruz Biotech.</i>
Col·lagen tipus 1	1:500 en TBS-T	AB765P	<i>Millipore</i>
Pan-catepsines	1:250 en TBS-T	SC-365614	<i>Sta. Cruz Biotech</i>
LAMP-2	1:2000 en TBS-T	AB13524	<i>Abcam</i>
Hsp70	1:1000 en TBS-T	ADI-SPA-822	<i>Enzo LifeScience</i>
LC3B	1:1000 en TBS-T + BSA	2775	<i>Cell Signaling</i>
$\beta$ -actina-HRP	1:5000 en TBS-T	A3854	<i>Sigma</i>
$\alpha$ -tubulina-HRP	1:5000 en TBS-T	AB40742	<i>Abcam</i>
Anti-Conill (2 <sup>ari</sup> )	1:20000 en TBS-T	A0545	<i>Sigma</i>

Anti-Ratolí (2 <sup>ari</sup> )	1:20000 en TBS-T	A9044	<i>Sigma</i>
Anti-Cabra (2 <sup>ari</sup> )	1:80000 en TBS-T	A5420	<i>Sigma</i>
Anti-Rata (2 <sup>ari</sup> )	1:15000 en TBS-T	819520	<i>Invitrogen</i>

### 5. Zimografia de gelatina

Les metal·loproteases MMP-2 i MMP-9 tenen activitat gelatinasa, així doncs, al realitzar una electroforesi en un gel d'acrilamida complementat amb gelatina i obtenint i tractant la mostra en condicions no desnaturalitzants, les MMP podran degradar la gelatina. Mitjançant la tinció del gel, podrem observar quantitativament l'activitat gelatinasa.

#### Procediment:

- Preparació dels gels d'acrilamida complementats amb gelatina:

Resolving	6% acrilamida	Stacking
Solució 1 pH 8.8 (*)	5 mL	0
Acrilamida(*)	2.1 mL	0.54 mL
Glicerol (5%)	500 µL	0
Gelatina (0.1%)	1 mL stock 10mg/mL	0
H <sub>2</sub> O destil·lada	1.4 mL	1.8 mL
Solució 3 pH 6.8(*)	0	2.25 mL
TEMED	14 µL	11.25 µL
APS 13%(*)	50 µL	45 µL

(\*) Són les mateixes solucions que s'utilitzen per fer els gels del WB.

- Les mostres es preparem amb tampó de càrrega 4x (0.2M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 40% Glicerol, 50 mM EDTA, 0.02% blau de bromofenol) sense β-mercaptoetanol, és a dir en condicions no desnaturalitzants. Es deixen 15 min a temperatura ambient. No es bullen les mostres.
- Vortejar i spin de les mostres.
- Carregar les mostres al gel i correm l'electroforesi amb el mateix tampó que en el WB, a 90-100 V fins que surti el front.
- Posar el gel en una cubeta amb Tampó de rentat (2.5% Tritó X-100). Fer 2 rentats de 15 min amb agitació, per eliminar el SDS.



- Deixar 30 min rentant-se amb el Tampó d'incubació (50 mM Trizma Base pH 7.4, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 3.1 mM NaN<sub>3</sub>) a temperatura ambient per equilibrar el gel.
- Incubar el gel en Tampó d'incubació a 37°C tota la nit.
- Tenyir el gel amb la solució de tinció (40% Metanol, 7% Àcid acètic glacial, 0.5% Comassie brilliant blue) durant 1 h.
- Destenyir o Revelar el gel amb la solució de destinció (40% Metanol, 7% Àcid acètic) fins que s'observin les bandes on s'ha produït la degradació de gelatina.

### **6. Assaig de proliferació amb <sup>3</sup>H-timidina**

La timidina tritiada és una anàleg de la timina, marcat radiactivament, que permet detectar les cèl·lules que s'estan replicant, ja que al proliferar, les cèl·lules incorporen timina a la nova cadena de DNA, i al posar en excés la timidina tritiada, la cèl·lula incorporarà la forma radioactiva per la seva detecció.

#### *Procediment:*

- Afegir <sup>3</sup>H-timidina (0.5 µCi/mL) i deixar incubar les cèl·lules un temps fix, que en el nostre cas serà de 4 h.
- Descartar el medi i rentar 2 cops amb PBS 1X.
- Fixar les cèl·lules amb TCA fred (5% Àcid Tricloracètic), i ho deixem 30 min a 4°C.
- Fer 2 rentats amb TCA.
- Per solubilitzar les cèl·lules, afegir 0.5 N NaOH (2.5 mL/pou per plaques de 6 pous, o 1.5 mL/pou per plaques de 12 pous). Deixar 5 min a temperatura ambient.
- Transferir 2 mL o 1 mL (en el cas de plaques de 6 o 12 pous respectivament) en vial de centelleig que contenen 8 o 9 mL de líquid de centelleig (respectivament).
- Vortejar els vial i contar el triti, <sup>3</sup>H, incorporat en un *Wallac β-counter* durant 1 min per cada vial.
- Els residus resultants van ser tractats/eliminats pel Servei de Medicina Nuclear de l'Hospital Clínic de Barcelona.

### **7. Aïllament d'extractes nuclears**

Aquesta tècnica es basa en les propietats d'osmolaritat molt diferent que tenen els dos tampons emprats (A i C) per dur a terme l'aïllament dels nuclis. Així doncs,

les CEH s'obtenen amb el tampó A d'osmolaritat molt baixa juntament amb detergent iònic, que ajudarà a trencar les membranes de les cèl·lules fent que s'alliberi el contingut citoplasmàtic. Després de peletejar els nuclis, aquests es resuspendran amb el tampó C hiperosmòtic que trencarà la membrana nuclear obtenint l'extracte o lisat nuclear d'interès.

*Procediment:*

- Rentar les cèl·lules en PBS 1x. Eliminar el PBS.
- Lisar les CEH amb tampó A (10 mM Hepes, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT), 1 mL per  $10^6$  cèl·lules, i passar-ho a un eppendorf. Deixar 15 min en gel.
- Afegir 50  $\mu$ L de 10% de Nonidet (detergent iònic), per cada mL de tampó A, i vortejar.
- Fer un spin de 30 segons a 12000g. Agafar una alíquota de sobrenedant (serà el control citoplasmàtic) i descartar el resta.
- Afegir de nou 1 mL de tampó A, per tal de rentar les parets de l'eppendorf de proteïnes citosòliques, i fer un spin de 10 segons. Descartar totalment el sobrenedant. El pelet obtingut conté els nuclis.
- Resuspendre el pelet amb tampó C (20 mM Hepes, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT). Deixar en gel durant 15 min, i anar vortejant cada 5 min per trencar els nuclis.
- Centrifugar 5 min a 12000g, a 4°C.
- Recuperar el sobrenedant on hi haurà l'extracte nuclear.

### **8. Silenciament de proteïnes amb RNAi**

El silenciament de proteïnes per RNA d'interferència consisteix en l'ús d'RNA de pocs parells de bases (*Small Interfering RNA* o RNAi (*Sta Cruz Biotechnology*)) que, de manera específica, s'hibriden amb l'RNA missatger (RNAm) diana. El producte de doble cadena resultant serà degradat per les RNases cel·lulars, i així s'aconsegueix disminuir els nivells d'expressió de la proteïna que volem inhibir. Per a la transfecció es va escollir el mètode de lipofecció pel qual es formen, a partir dels RNAi i lípids catiónics, uns complexos amb afinitat per la membrana que permeten l'entrada de l'RNAi al citosol de les cèl·lules.

*Procediment:*

- Barrejar l'Optimem (*Invitrogen*), el Plus Reagent (*Invitrogen*) i l'RNAi (*Sta. Cruz Biotech.*) en una relació 4:1:2 (v/v/v), seguint les instruccions de la casa comercial (*Invitrogen*). Vortejar.
- Incubar la barreja 15 min a temperatura ambient.
- Afegir la Lipofectamina LTX (*Invitrogen*) en una relació 0.6 respecte l'RNAi (36  $\mu$ L de Lipofectamina LTX per 60  $\mu$ L d'RNAi). Vortejar vigorosament per a facilitar la formació dels complexos de transfecció.
- Incubar 25 min a temperatura ambient.
- Afegir 200  $\mu$ L de la barreja a cada pou d'una placa de 6, amb 1 mL de DMEM al 10% FBS, on el dia abans s'han sembrat 250.000 cèl·lules.
- La transfecció es va portar de 24 h a 72 h, en funció del paràmetre a determinar.

**9. Determinació de l'activitat CtsB i CtsD**

Tan la catepsina B com la D es van mesurar fluorimètricament mitjançant substrats específics per cada enzim. La hidròlisi d'aquests substrats per les catepsines produeix una fluorescència a una longitud d'ona ( $\lambda$ ) determinada que es pot detectar amb un fluorímetre. Els substrats emprats i les longituds d'ona d'excitació i emissió són:

-Per la CtsB: Z-Arg-Arg-7-amido-4-metilcoumarina hidrocloorada.  $\lambda_{ex}=355$  nm,  $\lambda_{em}=460$  nm.

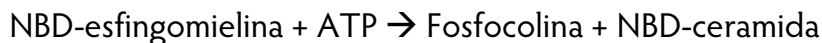
-Per la CstD: N-Acetyl-Arg-Gly-Phe-Phe-Pro-7-amido-4-trifluorometil-coumarina.  $\lambda_{ex}=400$  nm,  $\lambda_{em}=505$  nm.

*Procediment:*

- Escalfar a 37°C en un bany el tampó d'assaig (20 mM Hepes pH 7.4, 0.1% CHAPS, 2 mM EDTA, 5% Sucrosa, i en fresc s'afegeix 5 mM de DTT (*Fluka*) i 2 mM L-cisteïna per l'assaig de CtsB) amb els substrats a concentració de 60  $\mu$ M.
- Posar 20  $\mu$ g de proteïna per pou, en una placa de 96 pous, i pujar el volum fins a 150  $\mu$ L amb el tampó d'assaig temperat.
- Llegir en un fluorímetre durant 40 min, amb lectures puntuals cada 60 segons, a 37°C.
- Els resultats, pendents obtingudes a la cinètica, es referiran al valor obtingut a les mostres control.

### **10. Determinació de l'activitat esfingomielinasa àcida**

L'activitat esfingomielinasa àcida es va determinar utilitzant un anàleg fluorescent de l'esfingomielina (NBD-C<sub>6</sub>-esfingomielina). La reacció produïda per l'activitat esfingomielinasa és la següent:



El producte NBD-ceramida s'extreu amb cloroform-metanol i es determinen els seus nivells mitjançant cromatografia de capa fina (TLC). La TLC s'exposa a llum ultraviolada per visualitzar-ne les bandes.

#### *Procediment:*

- Les mostres, 75-100 µg, obtingudes amb el tampó de lisi (250 mM acetat sòdic, 0.2% Tritó X-100, pH 5.0) es van incubar a 37°C durant 60 min en 250 µL de tampó d'incubació (250 mM acetat sòdic, 0.1% Tritó X-100, pH 5.0) que conté 10 µM de NBD-esfingomielina (d'un stock 5 mM en etanol), en agitació constant (150 r.p.m.).
- Per tal d'extreure els lípids es van afegir 250 µL de metanol i 500 µL de cloroform. Barrejar bé (vòrtex durant 1min) i centrifugar 5 min a 5000g. La fase orgànica és la fase inferior obtinguda després de la centrifugació.
- La fase orgànica es va assecar en un *Speed-vac*.
- Els lípids es van resuspendre en 50 µL de Cloroform:Metanol (1/1, vol:vol) , dels quals 40 µL es van carregar en una placa de TLC. Les mostres es van separar en una cambra de TLC prèviament equilibrada (mínim durant 1 h) amb la fase mòbil o eluent (solució de cloroform: metanol: aigua; 65:25:4, v/v).
- La NBD-esfingomielina (Factor de Retenció, R<sub>f</sub>=0.15) i la NBD-ceramida (R<sub>f</sub>=0.85) es van poder veure sota llum UV, i les imatges es van adquirir i analitzar usant el Gel Doc XR System amb el software Quantity One de *BioRad*, i es van quantificar amb el programa ImageJ.

### **11. Estudis *in vivo* per induir fibrogènesi hepàtica a ratolins**

En aquesta tesis es va dur a terme el model d'administració crònica de tetraclorur de carboni (CCl<sub>4</sub>) i el de lligadura del conducte biliar (LCB). Tots els protocols animals utilitzats van ser aprovats pel Comitè Ètic i de Benestar Animal de la Universitat de Barcelona.

### 11.1. Model de fibrogènesi *in vivo*: CCl<sub>4</sub>

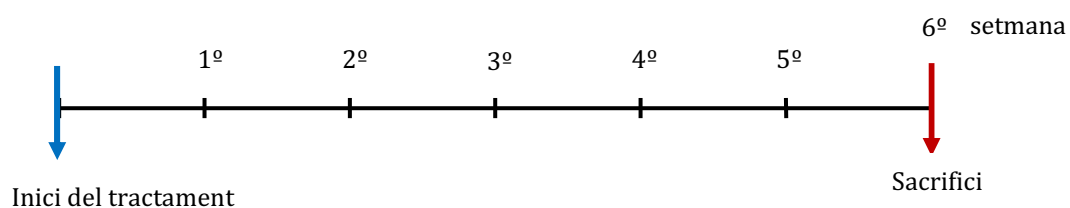
Està ben estudiat que el CCl<sub>4</sub> es metabolitza al radical lliure triclorometil ( $\cdot\text{CCl}_3$ ) pel sistema enzimàtic del Citocrom P450, principalment per la isoforma 2E1. Els radical lliures produïts es poden unir directament als lípids microsomals i altres estructures macromoleculares contribuint així al trencament de membranes i la disrupció dels processos energètics dins la cèl·lula.

Animals control (*wild-type*), ASMasa<sup>+/-</sup> i ASMasa<sup>-/-</sup> van ser tractats amb CCl<sub>4</sub> (10%, vol/vol, CCl<sub>4</sub> en oli de blat de moro o *corn oil*) a una dosi de 5 µL/g de ratolí, que s'administrava intraperitonealment dos cops per setmana durant 4 o 6 setmanes. Als animals control se'ls administrava el vehicle *corn oil*.

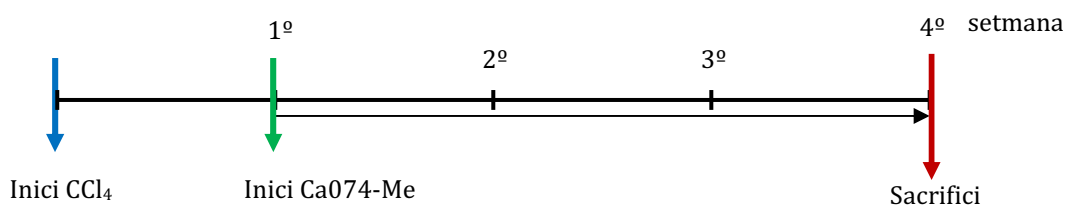
En el cas de l'*in vivo* amb els ratolins ASMasa<sup>-/-</sup>, després d'una setmana de tractament amb CCl<sub>4</sub>, se'ls va començar a administrar l'inhibidor de la CtsB (Ca074-Me), amb una pauta de 2 cops per setmana, 30 min abans de punxar el CCl<sub>4</sub>, durant les 3 setmanes restants. El Ca074-Me es va administrar intraperitonealment a una dosi d'acord amb l'expressió de la CtsB en el fetge 0.25 mg/ratolí control i 1 mg/ratolí ASMasa<sup>-/-</sup>).

A continuació mostro un resum dels protocols emprats en els estudis *in vivo* publicats.

#### 1. *In vivo* CCl<sub>4</sub> 6 setmanes: ratolins ASMasa<sup>+/+</sup> i ASMasa<sup>+/-</sup>.



#### 2. *In vivo* CCl<sub>4</sub> 4 setmanes amb o sense Ca074-Me: ratolins ASMasa<sup>+/+</sup> i ASMasa<sup>-/-</sup>.



### 11.2. Model de fibrogènesi in vivo: LCB

Un dels possibles orígens d'una fibrosi hepàtica és la colèstasi que es produeix a causa de l'obstrucció dels conductes biliars. Si aquesta obstrucció no es resol es dona una fibrosi biliar hepàtica en l'espai portal del fetge, que en cas de no ser resolta podria complicar-se en una cirrosi. Així doncs, per reproduir una fibrosi biliar hepàtica i obtenir un fetge amb fibrosi d'origen biliar, el model és la lligadura del conducte biliar o LCB.

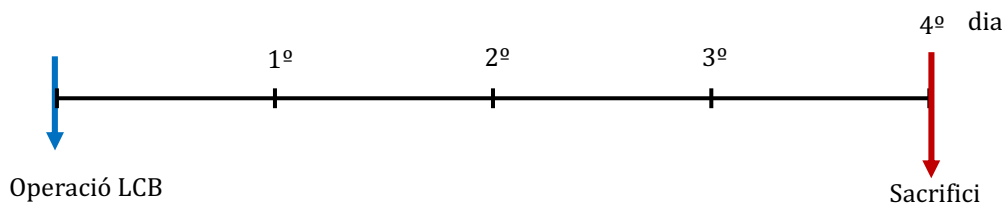
#### *Procediment:*

- Per dur a terme la LCB, ratolins control (*wild-type* i *ASMasa<sup>+/+</sup>*) i ratolins *ASMasa<sup>+/-</sup>*, *TNFR1-KO*, *TNFR2-KO* i *TNFR-DKO*, es van anestesiar per inhalació controlada d'isofluorà (3% inducció, 1-1,5% manteniment).
- Es desinfecta la pell de l'abdomen amb una solució antisèptica de Clorhexidina-alcohol (0.5%).
- Es fa una incisió a pell i múscul a meitat de l'abdomen d'aproximadament 1 cm fins a observar l'apòfisi del xifoides.
- Es cobreix la zona amb una gassa estèril deixant un forat per a visualitzar la incisió, i es treu amb cura i amb l'ajuda d'uns hisops estèrils, el paquet intestinal.
- Amb hisop mullat amb solució salina es tiba el duodè fins a visualitzar el conducte biliar.
- Un cop visualitzat el conducte, amb una gasa estèril mullada en salí cobrir el duodè i l'intestí prim per a mantenir a la vista el conducte biliar.
- Amb unes pinces afilades, amb una curvatura de 45°, aïllar el conducte biliar del teixit connectiu adjacent. Els animals *sham* se'ls torna a introduir el paquet abdominal i no se'ls secciona el conducte.
- Un cop aïllat el conducte, col·locar dues sutures del 5-0 a una distància de 0,5-1cm entre elles. Lligar-les fortament.
- Amb un bisturí elèctric es cauteritza el conducte biliar, seccionant-lo entre les dues lligadures.
- Introduir els budells a la cavitat abdominal, on s'administrarà 250 uL de salí (0,9%) per a rehidratar.
- Cosir primer la paret abdominal amb sutura del 5-0.
- Tancar la incisió a la pell abdominal amb sutura del 3-0.
- Un cop tancat l'abdomen, netejar la pell al voltant de la sutura amb solució de clorhexidina tòpica.

- Administrar un analgèsic (buprenorfina a 0.05 mg/Kg, per via i.p.).
- Col·locar el ratolí sobre una manta elèctrica a temperatura adient durant al recuperació (15-30 min).
- Passats 4 dies es procedirà a sacrificar l'animal amb extracció de sang i del fetge.

A continuació mostro un resum dels estudis *in vivo*.

1. *In vivo* LCB 4 dies: ratolins ASMasa<sup>+/+</sup> i ASMasa<sup>+/-</sup>, i ratolins control, TNFR1-KO, TNFR2-KO i TNFR-DKO.



### 11.3. Sacrifici i recollida de mostres

Els ratolins es sacrifiquen al final de l'estudi després de l'administració de pentobarbital i.p.. Un cop adormits es recullen les mostres:

- Sèrum sanguini: extracció de sang a partir de la vena cava. Es centrifuga i s'analitzen les transaminases i bilirubina (apartat 12.).
- Mostra per histologia: es posa un tros de 0.5-1cm de diàmetre dins un cassette histològic en formalina (apartat 13.)
- Mostra per RNA: trossos petits de fetge es posen en un eppendorf estèril amb 500 µL de RNA later (*Ambion*) i es congela a -20°C. (apartat 17.2)
- Mostra per homogenat/lisat: es tallen trossets petits de fetge que guardem en 2 eppendorfs i congelem a -20°C i -80°C. (apartat 3.2)

Hem tingut molta cura, durant els estudis realitzats, de ser consistents alhora de fer servir sempre els mateixos lòbuls per a la recollida d'espècimens hepàtics.

## 12. Anàlisi de les Transaminases

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

L'anàlisi dels sèrums es va fer en un analitzador bioquímic del Centre de Diagnòstic Mèdic de l'Hospital Clínic de Barcelona.

### **13. Histologia**

#### *13.1. Fixació i Parafinat de les mostres*

*Procediment:*

- Els teixits hepàtics van ser fixats amb Formalina al 10% durant 48h.
- Posteriorment van ser inclosos en parafina en un inclusor tipus (*Citadel 1000, Shandon*) i es van fer els blocs.

#### *13.2. Micròtom*

Es van fer talls de 5 i 7  $\mu\text{m}$  amb un micròtom *Leica RM2155* i es van dipositar en portes tractats prèviament amb Histogrip (*Zymed*).

#### *13.3. Tincions Histològiques*

##### *13.3.1. Hematoxilina-Eosina*

Aquesta tinció es basa en l'afinitat de les estructures per un o altre colorant. L'hematoxilina, és bàsica i tenyeix de color blau les estructures predominantment àcides com ara el nucli cel·lular. L'eosina, en canvi, és àcida i basòfila i tenyeix el citoplasma de la cèl·lula d'un color rosat. Aquesta tinció es va fer en seccions de 7  $\mu\text{m}$ .

*Procediment:*

- Desfer la parafina en una estufa a 100°C.
- Desparafinar amb Xilol 10 min i hidratar amb un banc d'etanols (100%, 90%, 70%, 30%, 5 min de cada) fins a aigua destil·lada.
- Tenyir amb Hematoxilina (*Sigma Cat# HHS32*) 4 min.
- Treure l'excés d'Hematoxilina rentant amb abundant aigua corrent.
- Posar les mostres amb Alcohol/HCl 96% (480 mL alcohol absolut (*Panreac*) + 20 mL HCl 12N) fins que aparegui una coloració vermellova.
- Traspasar les mostres a aigua amoniacal (aigua destil·lada amb 3-4 gotes d'amoniac al 25% (*Merck*)) fins que torni a aparèixer el color blau.



- Rentar amb aigua corrent durant 2 min.
- Rentar amb aigua destil·lada durant 2 min.
- Tenyir durant 1,5 min amb Eosina alcohòlica .
- Deshidratar amb un banc d'etanols (70%, 90%, 100%, 5 min de cada) i finalitzar amb 100% Xilol.
- Muntar amb medi de muntatge per a histologia DPX (*Fluka*).
- Observar les mostres amb llum transmesa al microscopi

### 13.3.2. Picro-Sirius Red

Aquesta tinció és de les més utilitzades per detectar fibres de col·lagen. El *Sirius red* tenyeix les fibres de col·lagen de color vermell mentre que el Píctic (mordent) deixa una coloració groga en el parènquima hepàtic. Aquesta tinció es va fer en seccions de 7 µm.

*Procediment:*

- Desfer la parafina en una estufa a 100°C.
- Desparafinar amb Xilol i hidratar amb un banc d'etanols (100%, 90%, 70%, 30%, 5 min de cada) fins a aigua destil·lada.
- Tenyir amb solució de Sirius-Píctic al 0.1% (Direct Red 80, *Fluka*) i àcid Píctic saturat (*Fluka*) durant 1 h.
- Rentar 2 cops amb solució d'aigua acidificada 1% (1 mL àcid acètic glacial (*Panreac*) en 100 mL d'aigua).
- Deshidratar amb un banc d'etanols (70%, 90%, 100%, 5 min de cada) i finalitzar amb 100% Xilol.
- Muntar amb medi de muntatge per a histologia DPX (*Fluka*).
- Observar les mostres amb llum transmesa al microscopi.

### 13.3.3. Nissl

Aquesta tinció es va usar en seccions de cervell (cerebel) per detectar els cossos de Nissl en el citoplasma de les neurones, que es tenyiran d'un color blau-lilós. Aquest mètode s'utilitza per identificar estructures bàsiques neuronals del cervell i el teixit de la medul·la espinal. Aquesta tinció es va fer en seccions de 7 µm.

*Procediment:*

- Desfer la parafina a 100°C a l'estufa.
- Desparafinar amb Xilol i hidratar amb un banc d'etanols (100%, 90%, 70%, 30%, 5 min de cada) fins a aigua destil·lada.

- Tenyir en 0.1% *Cresyl violet* prèviament escalfat a 37-50°C durant 8 min.
- Rentar ràpidament en aigua destil·lada
- Diferenciar en alcohol al 95% durant 10 min.
- Deshidratar amb un banc d'etanols (70%, 90%, 100%, 10 min de cada) i finalitzar amb 100% Xilol.
- Muntar amb medi de muntatge per a histologia DPX (*Fluka*).

#### **14. Immunohistoquímica**

La immunohistoquímica és un mètode pel qual es poden localitzar proteïnes en cèl·lules de talls histològics. Aquesta tècnica es realitza mitjançant anticossos altament específics que reconeixen la proteïna diana.

##### *14.1. Mieloperoxidasa o $\alpha$ -SMA*

Aquesta immunohistoquímica és cromogènica (l'anticòs conjugat amb un enzim talla un substrat, i el precipitat que se'n forma es pot observar), i està basada en la reacció del complex Avidina-Biotina. L'Avidina té una gran afinitat per la Biotina i es formen complexos on cada Avidina té 4 llocs d'unió per Biotina. Així doncs, l'anticòs primari s'uneix a la proteïna d'interès i posteriorment, l'anticòs secundari biotinitat s'uneix a l'anticòs primari. És llavors quan les molècules d'Avidina conjugades amb l'enzim HRP (*Horse Radish Peroxidase*), s'uneixen amb elevada afinitat amb la biotina. El tall del substrat tetrahidrocloruro de 3,3' diaminobencidina (DAB) per l'enzim HRP dóna una coloració marró permanent. Aquesta tècnica es va dur a terme en seccions de 5  $\mu$ m.

##### *Procediment:*

- Desfer la parafina en una estufa a 100°C.
- Desparafinar amb Xilol i hidratar amb un banc d'etanols (100%, 90%, 70%, 30%, 5 min de cada) fins a aigua destil·lada.
- Exposar els epítops del teixit o desemascarar les mostres a l'estufa a 120°C durant 10 min en tampó citrat sòdic 10 mM. Deixar refredar.
- Bloquejar l'enzim peroxidasa endògena del teixit amb Metanol al 3% de peròxid d'hidrogen.
- A partir d'aquí i fins a posar el DAB, després de cada pas es van realitzant 3 rentats amb PBS 1x.

- Bloquejar Avidina-Biotina endògena amb "*Dako Biotin Blocking System*" (*Dako*) seguint les instruccions del fabricant.
- Bloquejar l'anticòs secundari amb sèrum Anti-goat (*Zymed*).
- Posar l'anticòs primari i deixar-lo tota la nit a 4°C en una cambra humida. Diluir l'anticòs primari si és necessari amb "*Dako Antibody Diluent Background Reducing Components*" (*Dako*).
- L'endemà, afegir l'anticòs secundari biotinilat entre 30-45 min en una cambra humida a temperatura ambient. Diluir l'anticòs secundari si es necessari amb "*Dako Antibody Diluent Background Reducing Components*".
- Afegir *ABC kit Standard* (*Vector Laboratories*), tal i com indica la casa comercial. Deixar 30 min a temperatura ambient a la cambra humida.
- Revelar amb el DAB diluït 1/10 amb tampó peroxidasa (*Dako*).
- Quan puja la coloració rentar ràpidament amb aigua corrent i contratenyir amb Hematoxilina (*Dako, Real Hematoxylin, Cat# S2020*).
- Muntar amb Aquatex (*Merck*)
- Les immunohistoquímiques van ser observades amb llum transmesa en el microscopi.

Els anticossos que vam utilitzar van ser els següents:

<b>Anticòs</b>	<b>Dilució</b>	<b>Ref. #</b>	<b>Casa comercial</b>
Mieloperoxidasa	Ja ve preparat i diluït	AB15484	<i>Abcam</i>
$\alpha$ -SMA	1:100	AB5694	<i>Abcam</i>
Conill-biotinilat (2°)	1:200	550338	<i>BD Pharmigen</i>

### **15. Immunocitoquímica.**

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

*Procediment:*

- Es posen cubres autoclavats de 10 mm de diàmetre en pous d'una placa de 12, i es plaquegen a sobre les CEH.
- Als 6-7 dies s'aspira bé el medi i es realitzen un parell rentats amb PBS 1x.
- Es fixen les cèl·lules afegint 0.5 mL/pou de formalina 10% durant 10-15 min a temperatura ambient.
- Rentar un parell de cops amb PBS 1x.
- Permeabilitzar les cèl·lules amb 0.1% saponina en 0.5% BSA/PBS durant 10 min a temperatura ambient.
- Rentar un parell de cops amb PBS 1x.
- Bloquejar amb 3% BSA/PBS durant 45-60 min a temperatura ambient.
- Afegir l'anticòs primari en 1% BSA/PBS durant 2 h a temperatura ambient.
- Rentar tres cops amb PBS 1x.
- Afegir l'anticòs secundari en 1% BSA/PBS durant 1 h a temperatura ambient a les fosques.
- Rentar tres cops amb PBS 1x a les fosques.
- Muntar amb "*Fluorescent Mounting Medium*" (*Dako*) a les fosques.
- Deixar a les fosques un mínim de 4 h a temperatura ambient perquè s'assequi el muntatge.
- Les immunocitoquímiques van ser observades en un Microscopi Confocal de *Leica SPE*.

Els anticossos que vam utilitzar van ser aquests:

<b>Anticòs</b>	<b>Dilució</b>	<b>Ref. #</b>	<b>Casa comercial</b>
CtsB	1:25	06-480	<i>Milipore</i>
CtsD	1:50	SC-6486	<i>St. Cruz</i>
LAMP2	1:50	AB13524	<i>Abcam</i>
F4/80	1:50	SC-52664	<i>Sta. Cruz Blotech.</i>
Alexa Fluor 647	1:1000	A21245	<i>Invitrogen</i>
Alexa Fluor 594	1:100	A11080	<i>Invitrogen</i>
Alexa Fluor 488	1:100	A11006	<i>Invitrogen</i>

### **16. Quantificació d'Hidroxi prolina**

La Hidroxi prolina és un dels aminoàcids més característics del col·lagen juntament amb la Hidroxilisina. Així doncs, la quantificació d'Hidroxi prolina en teixit serveix per quantificar indirectament el contingut de col·lagen d'aquest. La detecció d'aquest aminoàcid es va fer mitjançant una tècnica que quantifica els nivells de 4-

Hidroxirolina en hidrolisats de teixit. Gràcies a una hidròlisi àcida s'aconsegueix alliberar la Hidroxirolina dels teixits homogenats. La Hidroxirolina lliure és oxidada per la T-Cloramida produint un compost del tipus pirrole. Finalment, l'addició de l'agent Ehrlich resulta en la formació d'un cromòfor amb una longitud d'ona màxima de 558 nm que podrà ser quantificat per espectrofotometria.

*Procediment:*

1. Tractament de les mostres:

- Pesem el fetge (20-50 mg) i afegim HCl 6 N en la proporció: 50 mg de fetge-500 µL de HCl 6N.
- Homogeneïtzem el fetge amb el HCl 6N en eppendorfs amb mini-èmbols (*Sigma-Aldrich, Cat# Z359947*) a temperatura ambient.
- Recollim l'homogenat i el passem a criotubs.
- Incubar a l'estufa a 100°C tota la nit.
- L'endemà treiem els criotubs de l'estufa i esperem que es refredin.
- Passem el contingut dels criotubs a eppendorfs i els centrifuguem 10 min a 12000g a 4°C.
- Agafem 50 µL de sobrenedant (intentant no agafar la fase de sobre més fosca) i el passem a un eppendorf.

2. Determinació de la Hidroxirolina:

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

<b>Estàndards</b>	<b>0 µg</b>	<b>2.5 µg</b>	<b>5 µg</b>	<b>7.5 µg</b>	<b>10 µg</b>
Stock de 1 mg/mL HP	0 µL	2.5 µL	5 µL	7.5 µL	10 µL
NaOH 2N	50 µL	47.5 µL	45 µL	42.5 µL	40 µL
Volum final	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

- S'incuben els estàndards en criotubs 20 min a l'estufa a 120°C.
- S'afegeixen a les mostres i als estàndards 450 µL de la solució T-Chloramida (0.64 g T-Cloramida en 10 mL 50% 2-Propanol i 40 mL tampó Acetat-citrat pH 6.5 (en un volum de 100 mL posem acetat sòdic trihidratat 0.88 M, àcid cítric anhidro 0.23 M (*Fluka*), NaOH 0.85 M, 1.2 mL Àcid acètic glacial (*Panreac*))).
- Es barreja amb un vòrtex suau i s'incuba 25 min a temperatura ambient.

- S'afegeixen 500 µL de solució Ehrlich (4.5g de 4-Dimetil-aminobenzaldehyd en 20 mL 2-Propanol i 10 mL de 70% Àcid Perclòric 70% (*Merck*)), i es barreja amb un vòrtex suau.
- S'incuba 20 min a 65°C en un bany. S'observa un canvi de color.
- Es deixen refredar els eppendorfs i es llegeix l'absorbància en un espectrofotòmetre a 550 nm.

### **17. Extracció d'RNA**

L'extracció d'RNA es va fer amb l'agent químic TRIzol (*Invitrogen*), la base del qual és de fenol i tiocianat de guanidini, que permet l'aïllament d'RNA total de cèl·lules i teixits. Durant l'homogeneïtzació o la lisi el TRIzol manté la integritat de l'RNA, mentre que trenca les cèl·lules i dissol els components cel·lulars. L'addició de cloroform seguida d'una centrifugació, separa la solució en una fase aquosa i una orgànica. El RNA es recupera de la fase aquosa per precipitació amb 2-Propanol.

En tot el procediment el material ha d'estar prèviament autoclavat i els reactius emprats, cloroform, 2-Propanol i etanol, amb qualitat per a Biologia Molecular i per tant lliures de DNasas i RNasas.

*Procediment:*

1. Passos previs per l'extracció d'RNA en CEH:
  - Afegir 750 µL de TRIzol per  $0.5-1 \times 10^6$  cèl·lules i esperar 5 min a temperatura ambient.
  - Recollir el TRIzol juntament amb el lisat cel·lular en un eppendorf.
2. Passos previs per l'extracció d'RNA de fetge:
  - Afegir 200 µL de TRIzol a 25-50 mg de fetge i esperar 5 min a temperatura ambient i homogeneïtzar amb mini-èmbols estèrils (*Sigma-Aldrich, Cat# Z359947*).
  - Afegir 500 µL de TRIzol i barrejar per inversió.
3. Protocol d'extracció d'RNA per CEH i fetge:
  - Afegir 200 µL de Cloroform i barrejar per inversió 15 vegades i deixar-ho 2 min a temperatura ambient.
  - Centrifugar a 12000g 15 min a 4°C.
  - Recuperar al voltant de 500 µL de la fase aquosa.
  - Afegir 500 µL de 2-Propanol i barrejar-ho bé. Deixar-ho 10 min a temperatura ambient.
  - Centrifugar a 12000g 10 min a 4°C.

- Resuspendre el pelet (RNA) en 1 mL d'etanol al 70% i guardar-lo a -20°C durant unes hores o tota la nit.
- Centrifugar a 7500g 10 min a 4°C, eliminar el sobrenedant, deixar secar el pelet a l'aire uns 5 min i resuspendre l'RNA en 50 µL d'aigua estèril en el cas de CEH i 100-150 µL en el cas de fetge. NOTA: si es deixa secar massa el pelet, el RNA perd solubilitat.
- Es va mesurar la concentració de l'RNA en un espectrofotòmetre (*NanoDrop*) mesurant l'absorbància a 260 nm i 280nm. La puresa de l'RNA es va avaluar pel quocient A260/280 que sempre es va trobar entre 1.7-2.

### **18. PCR quantitativa a temps real (RT-PCR real time)**

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

#### *Procediment:*

- Les reaccions es van dur a terme segons les especificacions del fabricant en una màquina *MyiQ single color real-time PCR detection System (BioRad)*.
- Vam fer servir el kit *iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBRGreen (BioRad)*.

Per una reacció de 25 µL es va afegir:

- 12.5 µL de *2x SYBR Green RT-PCR Reaction Mix*
- 0.5 µL d'*iScript Reverse Transcriptasa for One-Step RT-PCR*
- 1.5 µL d'encebador (mix 5 µM) (*Invitrogen*)
- 3 µL d'aigua sense nucleases
- 7.5 µL d'RNA a concentració 10 ng/µL
- Programa:
  - 10 min a 50°C.
  - 5 min a 95°C.
  - 50 cicles:
    - 15 segons a 95°C.
    - 25 segons a 55°C.
    - 35 segons a 72°C.
  - 1 minut a 95°C.
  - 10 segons a 55°C.

Com a gen de referència o control varem fer servir de forma rutinària la  $\beta$ -actina. El *Cross Threshold* (CT) es defineix com el número de cicles necessaris per a que totes les mostres de l'estudi superin un umbral (*Threshold*) o *background* de fluorescència. El valor de CT per a cada mostra és inversament proporcional a la de RNAm o cDNA del gen en qüestió quantitat present a la mostra, així quan més petit sigui el valor de CT, més expressió del gen corresponent.

El CT de l'RNA d'anàlisi es va comparar amb el CT de l'RNAm constitutiu  $\beta$ -actina per les CEH i el fetge. La quantificació es va fer seguint una modificació del mètode de Pfaffl (Pfaffl 2001), amb la següent fórmula:

$$\text{Expressió del gen X d'interès} = 2^{-(\Delta CT_{\text{exp}} - \Delta CT_{\text{ctrl}})}$$

$$\text{On la } \Delta CT = CT_{\text{genX}} - CT_{\beta\text{-actina}}$$

Els *primers* o encebadors utilitzats van ser els següents:

Gen	Sentit (FW)	Antisentit (RV)
<u>Encebadors RATOLÍ</u>		
$\alpha$ -SMA (NM_007392)	CCGACCGAATGCAGAAGG	AAGGTAGACAGCGAAGCCAA
TGF- $\beta$ (NM_011577)	GTCAGACATTCGGGAAGCAG	GCGTATCAGTGGGGGTCA
Procol·lagen- $\alpha$ 1(I) (NM_007742)	GAGCGGAGAGTACTGGATCG	GTTCCGGGCTGATGTACCAGT
MMP-2 (NM_008610)	ACCTGAAGCTGGAGAACCAA	CACATCCTTCACCTGGTGTG
MMP-9 (NM_013599)	CAAATTCTTCTGGCGTGTGA	CGGTTGAAGCAAAGAAGGAG
TIMP-1 (NM_001044384)	CATGGAAAGCCTCTGTGGAT	CTCAGAGTACGCCAGGGAAC
TNF (NM_013693)	CTGAACTTCGGGGTGATCGGT	ACGTGGGCTACAGGCTTGTCA
$\beta$ -actina (NM_007393)	GACGGCCAGGTCATCACTAT	CGGATGTCAACGTCACACTT
<u>Encebadors HUMÀ</u>		
$\alpha$ -SMA (NM_001613)	CCGACCGAATGCAGAAGG	ACAGAGTATTTGCGCTCCGGA
MMP-2 (NM_004530)	ACGACCGGACAAGAAGTAT	ATTTGTTGCCAGGAAAGTG
MMP-9 (NM_004994)	GACAAGCTCTTCGGCTTCTG	CTCGCTGGTACAGGTCGAGT
TIMP-1 (NM_003254)	AGTGGCACTCATTGCTTGTG	GCAGGATTCAGGCTATCTGG
Procol·lagen $\alpha$ 1(I) (NM_000088)	CCTGGATGCCATCAAAGTCT	ACCAGACATGCCTCTTGTCC
$\beta$ -actina (NM_001101)	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG

## 19. Estudi en pacients amb NASH

### 19.1. Cohort de pacients amb NASH

Es van incloure a l'estudi pacients amb esteatohepatitis no alcohòlica (NASH) definida (n=18), o *borderline* (n=14) (d'acord amb la classificació de Kleiner (Kleiner et al. 2005)) que havien estat enviats a l'hospital per



cirurgia bariàtrica. Els pacients se'ls realitza un *bypass* gàstric per laparoscòpia i durant aquest procés s'obté una biòpsia utilitzant una agulla Tru-Cut.

Per altre banda, els fetges control es van obtenir de donants de fetge sans (n=3) o bé de reseccions de metàstasi hepàtica (n=2). Tots els controls a més tenen nivells de transaminases i histologia hepàtica normals. A més, cap dels pacients control no tenia història mèdica de malaltia hepàtica, abús d'alcohol o síndrome metabòlic.

Aquest estudi va ser aprovat pel comitè ètic de l'Hospital Clínic de Barcelona, i tots els pacients van donar el consentiment.

### *19.2. Anàlisi de l'expressió gènica hepàtica en mostres humanes*

Les mostres de biòpsies humanes es van conservar en un tub amb solució *RNA later*, i es van guardar a -20°C fins a l'extracció d'RNA.

Procediment:

- S'extreu l'RNA total amb el reactiu TRIzol.
- 500 µg d'RNA total es va retrotranscriure amb el kit *high-capacity complementary DNA Archive Kit (Applied Biosystems)*.
- Els gens seleccionats van ser distribuïts en una placa de 384 pous (*384-well Taqman Low Density Array card*), i les mostres van ser analitzades en quadruplicats usant un ABI PRISM 7900 (*Applied Biosystems*).
- Es van usar assajos TaqMan predissenyats pels gens diana: CtsB (Hs00157194\_m1), ASMase (Hs00609415\_m1) i 18S (Hs99999901\_s1).
- Els nivells d'expressió dels gens diana es van normalitzar amb l'expressió del 18S (gen endogen).
- Els valors de l'expressió gènica van ser calculats basant-se en el mètode de la  $\Delta\Delta C_t$ . Els resultats expressats com a  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  es refereixen a l'augment en relació a la mitjana dels fetges control.

## **20. Estadística**

Totes les imatges mostren un resultat representatiu de com a mínim 3 experiments independents. L'anàlisi estadístic es va fer usant el software de Microsoft Excel. La significació estadística de les diferències es van determinar usant el test t-d'Student no paramètric.



## BIBLIOGRAFIA



- Al-Batran, S.-E. et al., 2011. The validation of matrix metalloproteinase-9 mRNA gene expression as a predictor of outcome in patients with metastatic gastric cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112973> [Accedido diciembre 6, 2011].
- Amritraj, A. et al., 2009. Increased activity and altered subcellular distribution of lysosomal enzymes determine neuronal vulnerability in Niemann-Pick type C1-deficient mice. *The American Journal of Pathology*, 175(6), pp.2540–2556.
- An, J. et al., 2011. Down-regulation of focal adhesion kinase by short hairpin RNA increased apoptosis of rat hepatic stellate cells. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, 119(6), pp.319–329.
- Andl, C.D. et al., 2010. Cathepsin B is the driving force of esophageal cell invasion in a fibroblast-dependent manner. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 12(6), pp.485–498.
- Anón, 1996. Hepatic stellate cell nomenclature. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 23(1), p.193.
- Anstee, Q.M., Daly, A.K. & Day, C.P., 2011. Genetics of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease*, 31(2), pp.128–146.
- Baker, A.H., Edwards, D.R. & Murphy, G., 2002. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 19), pp.3719–3727.
- Balaji, K.N. et al., 2002. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(4), pp.493–503.
- Ballardini, G. et al., 1994. Ito cell heterogeneity: desmin-negative Ito cells in normal rat liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 19(2), pp.440–446.
- Bataller, R. & Brenner, David A, 2005. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(2), pp.209–218.

- Baud, V. & Karin, M., 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*, 11(9), pp.372–377.
- Benes, P., Vetvicka, V. & Fusek, M., 2008. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 68(1), pp.12–28.
- Benyon, R.C. & Arthur, M.J., 2001. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Seminars in Liver Disease*, 21(3), pp.373–384.
- Bezombes, C. et al., 2001. Lysosomal sphingomyelinase is not solicited for apoptosis signaling. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(2), pp.297–299.
- Bilzer, M., Roggel, F. & Gerbes, A.L., 2006. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 26(10), pp.1175–1186.
- Black, R.A. et al., 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*, 385(6618), pp.729–733.
- Bonacchi, A. et al., 2001. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(13), pp.9945–9954.
- Boya, P. et al., 2003. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(10), pp.1323–1334.
- Bradham, C.A. et al., 1998. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *The American Journal of Physiology*, 275(3 Pt 1), pp.G387–392.
- Bronfenmayer, S., Schaffner, F. & Popper, H., 1966. Fat-storing cells (lipocytes) in human liver. *Archives of Pathology*, 82(5), pp.447–453.
- Brouillet, J.P. et al., 1991. Increased plasma cathepsin D concentration in hepatic carcinoma and cirrhosis but not in breast cancer. *Clinical Biochemistry*, 24(6), pp.491–496.
- Canbay, A. et al., 2005. Apoptosis and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *The Turkish Journal of Gastroenterology: The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 16(1), pp.1–6.

- Canbay, A. et al., 2003. Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(2), pp.152–159.
- Canbay, A., Feldstein, A., et al., 2004. The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(3), pp.1191–1196.
- Canbay, A., Friedman, S. & Gores, Gregory J, 2004. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 39(2), pp.273–278.
- Cao, Q., Mak, K.M. & Lieber, C.S., 2002. Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases acetaldehyde-induced TNF- $\alpha$  generation in Kupffer cells of ethanol-fed rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299(3), pp.459–464.
- Castro, H.C. et al., 2011. Looking at the proteases from a simple perspective. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 24(2), pp.165–181.
- Ceccarelli, S. et al., 2011. Hepatic stellate cell proliferation: a potential role of protein kinase R. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(4), pp.1484–1485; author reply 1485–1486.
- Consolo, M. et al., 2009. Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 24(2), pp.143–152.
- Conus, S. & Simon, H.-U., 2008. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochemical Pharmacology*, 76(11), pp.1374–1382.
- Costa, A.G. et al., 2011. Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nature Reviews. Rheumatology*, 7(8), pp.447–456.
- Czaja, A.J. & Carpenter, H.A., 2004. Progressive fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 39(6), pp.1631–1638.
- Chan, A.T. et al., 2010. Cathepsin B expression and survival in colon cancer: implications for molecular detection of neoplasia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 19(11), pp.2777–2785.

- Chapman, H.A., Riese, R.J. & Shi, G.P., 1997. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annual Review of Physiology*, 59, pp.63–88.
- Chen, L. et al., 2011. Olfactomedin 4 suppresses prostate cancer cell growth and metastasis via negative interaction with cathepsin D and SDF-1. *Carcinogenesis*, 32(7), pp.986–994.
- Chiang, T.-Y. et al., 2011. Elevated plasma matrix metalloproteinase-9 protein and its gene polymorphism in patients with community-acquired pneumonia. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM / FESCC*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22107133> [Accedido diciembre 6, 2011].
- Chu, D. et al., 2011. Paeoniflorin attenuates schistosomiasis japonica-associated liver fibrosis through inhibiting alternative activation of macrophages. *Parasitology*, 138(10), pp.1259–1271.
- Chwieralski, C.E., Welte, T. & Bühling, F., 2006. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 11(2), pp.143–149.
- Davis, G.L. et al., 2003. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 9(4), pp.331–338.
- Decourt, B. & Sabbagh, M.N., 2011. BACE1 as a potential biomarker for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 24 Suppl 2, pp.53–59.
- Deussing, J. et al., 1998. Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), pp.4516–4521.
- Deveraux, Q.L. & Reed, J.C., 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes & Development*, 13(3), pp.239–252.
- Devlin, C. et al., 2010. Improvement in lipid and protein trafficking in Niemann-Pick C1 cells by correction of a secondary enzyme defect. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(5), pp.601–615.



- Douglass, A. et al., 2008. Antibody-targeted myofibroblast apoptosis reduces fibrosis during sustained liver injury. *Journal of Hepatology*, 49(1), pp.88–98.
- Dunn, A.D., Crutchfield, H.E. & Dunn, J.T., 1991. Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(30), pp.20198–20204.
- Durán, M.C. et al., 2007. Atorvastatin modulates the profile of proteins released by human atherosclerotic plaques. *European Journal of Pharmacology*, 562(1-2), pp.119–129.
- Edelmann, B. et al., 2011. Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. *The EMBO Journal*, 30(2), pp.379–394.
- Fallowfield, J.A., 2011. Therapeutic targets in liver fibrosis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(5), pp.G709–715.
- Fattovich, G. et al., 1997. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*, 112(2), pp.463–472.
- Faubion, W.A. & Gores, G J, 1999. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 29(1), pp.1–4.
- Feldstein, A.E. et al., 2006. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(6), pp.G1339–1346.
- Feldstein, A.E. et al., 2004. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40(1), pp.185–194.
- Forbes, S.J. et al., 2004. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology*, 126(4), pp.955–963.
- Friedman, S L et al., 1992. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 15(2), pp.234–243.
- Friedman, Scott L, 2008a. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological Reviews*, 88(1), pp.125–172.

- Friedman, Scott L, 2003. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of Hepatology*, 38 Suppl 1, pp.S38–53.
- Friedman, Scott L, 2008b. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 134(6), pp.1655–1669.
- Fruton, J.S., 2002. A history of pepsin and related enzymes. *The Quarterly Review of Biology*, 77(2), pp.127–147.
- Futerman, A.H. & van Meer, G., 2004. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(7), pp.554–565.
- Gabbiani, G. et al., 1981. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(1), pp.298–302.
- García-Ruiz, C. et al., 2003. Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(2), pp.197–208.
- Gardi, C. et al., 2002. Effect of free iron on collagen synthesis, cell proliferation and MMP-2 expression in rat hepatic stellate cells. *Biochemical Pharmacology*, 64(7), pp.1139–1145.
- Geerts, A, 2001. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminars in Liver Disease*, 21(3), pp.311–335.
- Geerts, A et al., 1991. Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 13(6), pp.1193–1202.
- Geerts, Albert, 2004. On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal? *Journal of Hepatology*, 40(2), pp.331–334.
- Ghiassi-Nejad, Z. & Friedman, Scott L, 2008. Advances in antifibrotic therapy. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 2(6), pp.803–816.
- Gieling, R.G., Wallace, K. & Han, Y.-P., 2009. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(6), pp.G1324–1331.

- Ginès, P. et al., 2004. Management of cirrhosis and ascites. *The New England Journal of Medicine*, 350(16), pp.1646–1654.
- Górska, M., Barańczuk, E. & Dobrzyń, A., 2003. Secretory Zn<sup>2+</sup>-dependent sphingomyelinase activity in the serum of patients with type 2 diabetes is elevated. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme*, 35(8), pp.506–507.
- Graber, D., Salvayre, R. & Levade, T., 1994. Accurate differentiation of neuronopathic and nonneuronopathic forms of Niemann-Pick disease by evaluation of the effective residual lysosomal sphingomyelinase activity in intact cells. *Journal of Neurochemistry*, 63(3), pp.1060–1068.
- Grell, M. et al., 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83(5), pp.793–802.
- Gressner, A M, 1995. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *Journal of Hepatology*, 22(2 Suppl), pp.28–36.
- Guicciardi, M E et al., 2000. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(9), pp.1127–1137.
- Guicciardi, M E, Leist, M. & Gores, Gregory J, 2004. Lysosomes in cell death. *Oncogene*, 23(16), pp.2881–2890.
- Guo, J. & Friedman, Scott L, 2007. Hepatic fibrogenesis. *Seminars in Liver Disease*, 27(4), pp.413–426.
- Gupta, S. et al., 2004. Deoxycholic acid activates the c-Jun N-terminal kinase pathway via FAS receptor activation in primary hepatocytes. Role of acidic sphingomyelinase-mediated ceramide generation in FAS receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(7), pp.5821–5828.
- Gupta, T.K., Toruner, M. & Groszmann, R.J., 1998. Intrahepatic modulation of portal pressure and its role in portal hypertension. Role of nitric oxide. *Digestion*, 59(4), pp.413–415.
- Han, D. et al., 2009. Redox regulation of tumor necrosis factor signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(9), pp.2245–2263.
- Hartland, S.N. et al., 2009. Active matrix metalloproteinase-2 promotes apoptosis of hepatic stellate cells via the cleavage of cellular N-cadherin. *Liver*

- International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 29(7), pp.966–978.
- Hayashi, H. & Sakai, T., 2011. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(5), pp.G729–738.
- Heinrich, M. et al., 2004. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death and Differentiation*, 11(5), pp.550–563.
- Hemann, S. et al., 2007. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *Journal of Hepatology*, 46(5), pp.955–975.
- Hernández-Muñoz, I. et al., 1997. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen alpha 1(I) gene expression in rat hepatic stellate cells through a G protein. *Gastroenterology*, 113(2), pp.625–640.
- Higashiyama, R. et al., 2009. Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology*, 137(4), pp.1459–1466.e1.
- Hisanaga, T. et al., 2011. TNFR1-mediated signaling is important to induce the improvement of liver fibrosis by bone marrow cell infusion. *Cell and Tissue Research*, 346(1), pp.79–88.
- Hong, Z. et al., 2011. Serum MMP-9 is elevated in children with asthma. *Molecular Medicine Reports*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052126> [Accedido diciembre 6, 2011].
- Horinouchi, K. et al., 1995. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nature Genetics*, 10(3), pp.288–293.
- Houglum, K. et al., 1998. TNF-alpha inhibits liver collagen-alpha 1(I) gene expression through a tissue-specific regulatory region. *The American Journal of Physiology*, 274(5 Pt 1), pp.G840–847.
- Hu, C.-J. et al., 2010. Primary biliary cirrhosis: what do autoantibodies tell us? *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 16(29), pp.3616–3629.

- Huang, X.-F. et al., 2000. Expressions of chromogranin A and cathepsin D in human primary hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 6(5), pp.693–698.
- Ikeda, K. et al., 1999. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 29(6), pp.1760–1767.
- Iredale, J.P., 2001. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Seminars in Liver Disease*, 21(3), pp.427–436.
- Iredale, J.P. et al., 1998. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(3), pp.538–549.
- Issa, R. et al., 2001. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut*, 48(4), pp.548–557.
- Jarnagin, W.R. et al., 1994. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 127(6 Pt 2), pp.2037–2048.
- Jenkins, R.W. et al., 2010. Regulated secretion of acid sphingomyelinase: implications for selectivity of ceramide formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(46), pp.35706–35718.
- Jezierska, A. & Motyl, T., 2009. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 15(2), pp.RA32–40.
- Johnson, S.J., Hines, J.E. & Burt, A.D., 1992. Immunolocalization of proliferating perisinusoidal cells in rat liver. *The Histochemical Journal*, 24(2), pp.67–72.
- Jones, I. et al., 2008. Characterization of common SMPD1 mutations causing types A and B Niemann-Pick disease and generation of mutation-specific mouse models. *Molecular Genetics and Metabolism*, 95(3), pp.152–162.
- Kahraman, A. et al., 2008. TRAIL mediates liver injury by the innate immune system in the bile duct-ligated mouse. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47(4), pp.1317–1330.

- Kallis, Y.N. & Forbes, S.J., 2009. The bone marrow and liver fibrosis: friend or foe? *Gastroenterology*, 137(4), pp.1218–1221.
- Kang, H., Jang, S.-W. & Ko, J., 2011. Human Leucine Zipper Protein sLZIP Induces Migration and Invasion of Cervical Cancer Cells via Expression of Matrix Metalloproteinase-9. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(49), pp.42072–42081.
- Kawada, N., 1997. The hepatic perisinusoidal stellate cell. *Histology and Histopathology*, 12(4), pp.1069–1080.
- Kent, G. et al., 1976. Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(10), pp.3719–3722.
- Khouri, H.E. et al., 1991. A model to explain the pH-dependent specificity of cathepsin B-catalysed hydrolyses. *The Biochemical Journal*, 275 ( Pt 3), pp.751–757.
- Kim, S.-J. et al., 2011. Depletion of cathepsin D by transglutaminase 2 through protein cross-linking promotes cell survival. *Amino Acids*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21960143> [Accedido noviembre 30, 2011].
- King, C.H., 2009. Toward the elimination of schistosomiasis. *The New England Journal of Medicine*, 360(2), pp.106–109.
- Kinnman, N. et al., 2000. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 80(5), pp.697–707.
- Kisseleva, T. et al., 2006. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, 45(3), pp.429–438.
- Kisseleva, T. & Brenner, David A, 2006. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21 Suppl 3, pp.S84–87.
- Kitamura, K. et al., 2002. Pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55-mediated signals in dimethylnitrosamine-induced murine liver fibrosis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 82(5), pp.571–583.

- Kleiner, D.E. et al., 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 41(6), pp.1313–1321.
- Koike, M et al., 2000. Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(18), pp.6898–6906.
- Koike, Masato et al., 2003. Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 22(2), pp.146–161.
- Kolesnick, R. & Hannun, Y A, 1999. Ceramide and apoptosis. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(6), pp.224–225; author reply 227.
- Kornhuber, J. et al., 2005. High activity of acid sphingomyelinase in major depression. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 112(11), pp.1583–1590.
- Krut, O. et al., 2006. Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(19), pp.13784–13793.
- Lai, C.L. et al., 2003. Viral hepatitis B. *Lancet*, 362(9401), pp.2089–2094.
- Lang, P.A. et al., 2007. Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nature Medicine*, 13(2), pp.164–170.
- Langmann, T. et al., 1999. Transcription factors Sp1 and AP-2 mediate induction of acid sphingomyelinase during monocytic differentiation. *Journal of Lipid Research*, 40(5), pp.870–880.
- Lansmann, S. et al., 1996. Purification of acid sphingomyelinase from human placenta: characterization and N-terminal sequence. *FEBS Letters*, 399(3), pp.227–231.
- Ledesma, M.D. et al., 2011. Brain pathology in Niemann Pick disease type A: insights from the acid sphingomyelinase knockout mice. *Journal of Neurochemistry*, 116(5), pp.779–788.
- Lefkowitz, J.H., 2005. Morphology of alcoholic liver disease. *Clinics in Liver Disease*, 9(1), pp.37–53.

- Leto, G. et al., 1996. Cathepsin D serum mass concentrations in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry: Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 34(7), pp.555–560.
- Leto, G. et al., 1997. Lysosomal cathepsins B and L and Stefin A blood levels in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis: potential clinical implications. *Oncology*, 54(1), pp.79–83.
- Li, Changyong et al., 2009. Homing of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by sphingosine 1-phosphate contributes to liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, 50(6), pp.1174–1183.
- Li, Chunsun et al., 2011. Expression and clinical significance of cathepsin B and stefin A in laryngeal cancer. *Oncology Reports*, 26(4), pp.869–875.
- Li, W. et al., 2000. Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Letters*, 470(1), pp.35–39.
- Lindquist, J.N., Stefanovic, B. & Brenner, D A, 2000. Regulation of collagen alpha1(I) expression in hepatic stellate cells. *Journal of Gastroenterology*, 35 Suppl 12, pp.80–83.
- Lösch, A. et al., 2004. Cathepsin D in ovarian cancer: prognostic value and correlation with p53 expression and microvessel density. *Gynecologic Oncology*, 92(2), pp.545–552.
- Llacuna, L. et al., 2006. Critical role of acidic sphingomyelinase in murine hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 44(3), pp.561–572.
- Malla, R.R. et al., 2011. Cathepsin B and uPAR knockdown inhibits tumor-induced angiogenesis by modulating VEGF expression in glioma. *Cancer Gene Therapy*, 18(6), pp.419–434.
- Manibusan, M.K., Odin, M. & Eastmond, D.A., 2007. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 25(3), pp.185–209.
- Männel, D.N. & Echtenacher, B., 2000. TNF in the inflammatory response. *Chemical Immunology*, 74, pp.141–161.



- Marathe, S. et al., 2000. Creation of a mouse model for non-neurological (type B) Niemann-Pick disease by stable, low level expression of lysosomal sphingomyelinase in the absence of secretory sphingomyelinase: relationship between brain intra-lysosomal enzyme activity and central nervous system function. *Human Molecular Genetics*, 9(13), pp.1967–1976.
- Marathe, S. et al., 1999. Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(11), pp.2648–2658.
- Marchesini, N. & Hannun, Yusuf A, 2004. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 82(1), pp.27–44.
- Marí, M. et al., 2004. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(6), pp.895–904.
- Marí, M. et al., 2006. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metabolism*, 4(3), pp.185–198.
- Marí, M. & Fernández-Checa, J.C., 2007. Sphingolipid signalling and liver diseases. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 27(4), pp.440–450.
- Marra, F et al., 1999. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 29(1), pp.140–148.
- Martin, J.A., Redshaw, S. & Thomas, G.J., 1995. Inhibitors of HIV proteinase. *Progress in Medicinal Chemistry*, 32, pp.239–287.
- Matarrese, P. et al., 2010. Cathepsin B inhibition interferes with metastatic potential of human melanoma: an in vitro and in vivo study. *Molecular Cancer*, 9, p.207.
- McDermott, M.F. et al., 1999. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell*, 97(1), pp.133–144.

- McGee, J.O. & Patrick, R.S., 1972. The role of perisinusoidal cells in hepatic fibrogenesis. An electron microscopic study of acute carbon tetrachloride liver injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 26(4), pp.429–440.
- de Meijer, V.E. et al., 2010. Broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibition curbs inflammation and liver injury but aggravates experimental liver fibrosis in mice. *PloS One*, 5(6), p.e11256.
- Melhem, A. et al., 2006. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *Journal of Hepatology*, 45(1), pp.60–71.
- Melton, A.C., Datta, A. & Yee, H.F., Jr, 2006. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-independent contractile force generation by rat hepatic stellate cells in response to endothelin-1. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(1), pp.G7–13.
- Melton, A.C. & Yee, H.F., 2007. Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 45(6), pp.1446–1453.
- Merrill, A.H., Jr, 2002. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(29), pp.25843–25846.
- Micheau, O. & Tschopp, J., 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2), pp.181–190.
- Milani, S. et al., 1994. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *The American Journal of Pathology*, 144(3), pp.528–537.
- Mohamed, M.M. & Sloane, B.F., 2006. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6(10), pp.764–775.
- Moles, A. et al., 2010. Acidic sphingomyelinase controls hepatic stellate cell activation and in vivo liver fibrogenesis. *The American Journal of Pathology*, 177(3), pp.1214–1224.
- Moles, A. et al., 2012. Cathepsin B overexpression due to Acid sphingomyelinase ablation promotes liver fibrosis in niemann-pick disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(2), pp.1178–1188.

- Moles, A. et al., 2009. Cathepsins B and D drive hepatic stellate cell proliferation and promote their fibrogenic potential. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(4), pp.1297–1307.
- Morales, A. et al., 2007. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 12(5), pp.923–939.
- Morishima, C. et al., 2006. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(3), pp.573–580.
- Mort, J.S. & Buttle, D.J., 1997. Cathepsin B. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(5), pp.715–720.
- Moyle, G. & Gazzard, B., 1996. Current knowledge and future prospects for the use of HIV protease inhibitors. *Drugs*, 51(5), pp.701–712.
- Murate, T. et al., 2002. Up-regulation of acid sphingomyelinase during retinoic acid-induced myeloid differentiation of NB4, a human acute promyelocytic leukemia cell line. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(12), pp.9936–9943.
- Murphy, F.R. et al., 2002. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(13), pp.11069–11076.
- Nagai, A. et al., 2000. Cystatin C and cathepsin B in CSF from patients with inflammatory neurologic diseases. *Neurology*, 55(12), pp.1828–1832.
- Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G., 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3), pp.562–573.
- Nakata, B. et al., 1994. Immunohistochemical study on cathepsin-B and cathepsin-D in pancreatic-cancer. *Oncology Reports*, 1(3), pp.543–546.
- Nalla, A.K. et al., 2010. Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Gene Therapy*, 17(9), pp.599–613.
- Novo, E et al., 2006. Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut*, 55(1), pp.90–97.

- Novo, Erica et al., 2009. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(11), pp.2089–2093.
- Núñez, O. et al., 2004. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut*, 53(11), pp.1665–1672.
- Oakley, F. et al., 2005. Inhibition of inhibitor of kappaB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis. *Gastroenterology*, 128(1), pp.108–120.
- Okanoue, T., Burbige, E.J. & French, S.W., 1983. The role of the Ito cell in perivenular and intralobular fibrosis in alcoholic hepatitis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 107(9), pp.459–463.
- Olle, E.W. et al., 2006. Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 44(3), pp.540–549.
- Onozuka, I. et al., 2011. Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(1), pp.134–140.
- Osawa, Y. et al., 2010. Role of acid sphingomyelinase of Kupffer cells in cholestatic liver injury in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(1), pp.237–245.
- Osawa, Y. et al., 2005. Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor- $\alpha$ . *The Journal of Biological Chemistry*, 280(30), pp.27879–27887.
- Otterbach, B. & Stoffel, W., 1995. Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell*, 81(7), pp.1053–1061.
- Parola, M., Marra, Fabio & Pinzani, Massimo, 2008. Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(1-2), pp.58–66.
- Peppel, K. et al., 2005. Activation of vascular smooth muscle cells by TNF and PDGF: overlapping and complementary signal transduction mechanisms. *Cardiovascular Research*, 65(3), pp.674–682.

- Petrache, I. et al., 2005. Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice. *Nature Medicine*, 11(5), pp.491–498.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), p.e45.
- Pinzani, M et al., 1992. Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(2), pp.642–646.
- Pinzani, M, 1999. Liver fibrosis. *Springer Seminars in Immunopathology*, 21(4), pp.475–490.
- Pinzani, Massimo, 2002. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 7, pp.d1720–1726.
- Plebani, M. et al., 1999. Cytokines and the progression of liver damage in experimental bile duct ligation. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 26(4), pp.358–363.
- Poynard, T et al., 2000. Natural history of HCV infection. *Baillière's Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 14(2), pp.211–228.
- Poynard, Thierry et al., 2003. Viral hepatitis C. *Lancet*, 362(9401), pp.2095–2100.
- Preaux, A.-M. et al., 2002. Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(3), pp.615–622.
- Radaeva, S. et al., 2006. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology*, 130(2), pp.435–452.
- Radbill, B.D. et al., 2011. Loss of matrix metalloproteinase-2 amplifies murine toxin-induced liver fibrosis by upregulating collagen I expression. *Digestive Diseases and Sciences*, 56(2), pp.406–416.
- Raetsch, C. et al., 2002. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut*, 50(2), pp.241–247.

- Reid, W.A., Valler, M.J. & Kay, J., 1986. Immunolocalization of cathepsin D in normal and neoplastic human tissues. *Journal of Clinical Pathology*, 39(12), pp.1323–1330.
- Riboni, L. et al., 2002. Ceramide levels are inversely associated with malignant progression of human glial tumors. *Glia*, 39(2), pp.105–113.
- Roberts, S. et al., 2007. Effect of sustained viral response on hepatic venous pressure gradient in hepatitis C-related cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 5(8), pp.932–937.
- Rockey, D.C. & Chung, J.J., 1994. Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 42(4), pp.660–670.
- Roderfeld, M. et al., 2006. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(3), pp.444–454.
- Rodríguez-Juan, C. et al., 2009. Fibronectin increases survival of rat hepatic stellate cells--a novel profibrogenic mechanism of fibronectin. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 24(3-4), pp.271–282.
- Roth, W. et al., 2000. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(13), pp.2075–2086.
- Rotolo, J.A. et al., 2005. Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(28), pp.26425–26434.
- Rylova, S.N., Somova, O.G. & Dyatlovitskaya, E.V., 1998. Comparative investigation of sphingoid bases and fatty acids in ceramides and sphingomyelins from human ovarian malignant tumors and normal ovary. *Biochemistry. Biokhimiia*, 63(9), pp.1057–1060.

- Saftig, P. et al., 1998. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), pp.13453–13458.
- Saftig, P. et al., 1995. Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *The EMBO Journal*, 14(15), pp.3599–3608.
- Saile, B. et al., 1997. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *The American Journal of Pathology*, 151(5), pp.1265–1272.
- Saku, T. et al., 1991. An immunocytochemical study on distinct intracellular localization of cathepsin E and cathepsin D in human gastric cells and various rat cells. *Journal of Biochemistry*, 110(6), pp.956–964.
- Salguero Palacios, R. et al., 2008. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 88(11), pp.1192–1203.
- Santana, P. et al., 1996. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell*, 86(2), pp.189–199.
- Scaffidi, C. et al., 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal*, 17(6), pp.1675–1687.
- Schechter, I. & Ziv, E., 2011. Cathepsins S, B and L with aminopeptidases display  $\beta$ -secretase activity associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biological Chemistry*, 392(6), pp.555–569.
- Schnabl, B. et al., 2002. Immortal activated human hepatic stellate cells generated by ectopic telomerase expression. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 82(3), pp.323–333.
- Schneider-Brachert, W. et al., 2004. 146. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity*, 21(3), pp.415–428.
- Schuchman, E. H., 2007. The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(5), pp.654–663.

- Schuchman, Edward H, 2010. Acid sphingomyelinase, cell membranes and human disease: lessons from Niemann-Pick disease. *FEBS Letters*, 584(9), pp.1895–1900.
- Schulz, R., 2007. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, pp.211–242.
- Schwabe, R.F. & Brenner, David A, 2006. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(4), pp.G583–589.
- Schwagerl, A.L. et al., 1995. Elevated levels of the endosomal-lysosomal proteinase cathepsin D in cerebrospinal fluid in Alzheimer disease. *Journal of Neurochemistry*, 64(1), pp.443–446.
- Selzner, M. et al., 2001. Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer Research*, 61(3), pp.1233–1240.
- Shacka, J.J. et al., 2007. Cathepsin D deficiency induces persistent neurodegeneration in the absence of Bax-dependent apoptosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(8), pp.2081–2090.
- Sharma, B. et al., 2011. Protein kinase R as mediator of the effects of interferon (IFN) gamma and tumor necrosis factor (TNF) alpha on normal and dysplastic hematopoiesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(31), pp.27506–27514.
- Shi, G.P. et al., 1999. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*, 10(2), pp.197–206.
- Simeonova, P.P. et al., 2001. The role of tumor necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 177(2), pp.112–120.
- Smith, E.L. & Schuchman, Edward H, 2008. The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(10), pp.3419–3431.



- Sohara, N. et al., 2002. Reversal of activation of human myofibroblast-like cells by culture on a basement membrane-like substrate. *Journal of Hepatology*, 37(2), pp.214–221.
- Solis-Herruzo, J.A., Brenner, D A & Chojkier, M., 1988. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(12), pp.5841–5845.
- Solomon, K.A. et al., 1999. Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(8), pp.4105–4108.
- Somerville, R.P.T., Oblander, S.A. & Apte, S.S., 2003. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology*, 4(6), p.216.
- Sommerfeld, A., Reinehr, R. & Häussinger, D., 2009. Bile acid-induced epidermal growth factor receptor activation in quiescent rat hepatic stellate cells can trigger both proliferation and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(33), pp.22173–22183.
- Staun-Ram, E. & Miller, A., 2011. Cathepsins (S and B) and their inhibitor Cystatin C in immune cells: modulation by interferon- $\beta$  and role played in cell migration. *Journal of Neuroimmunology*, 232(1-2), pp.200–206.
- Steinfeld, R. et al., 2006. Cathepsin D deficiency is associated with a human neurodegenerative disorder. *American Journal of Human Genetics*, 78(6), pp.988–998.
- Stockmann-Juvala, H. et al., 2006. Fumonisin B1-induced apoptosis in neuroblastoma, glioblastoma and hypothalamic cell lines. *Toxicology*, 225(2-3), pp.234–241.
- Strackowski, M. et al., 2007. Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50(11), pp.2366–2373.
- Sudo, K. et al., 2005. Lack of tumor necrosis factor receptor type 1 inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Cytokine*, 29(5), pp.236–244.
- Sugimoto, M. et al., 2011. The role of the renin-angiotensin system in gastric oncogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22114933> [Accedido noviembre 30, 2011].

- Sundelöf, J. et al., 2010. Higher cathepsin B levels in plasma in Alzheimer's disease compared to healthy controls. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 22(4), pp.1223–1230.
- Tang, P., Hung M-C & Klostergaard, J., 1996. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*, 35(25), pp.8216–8225.
- Tarrats, N. et al., 2011. Critical role of tumor necrosis factor receptor 1, but not 2, in hepatic stellate cell proliferation, extracellular matrix remodeling, and liver fibrogenesis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(1), pp.319–327.
- Tedelind, S. et al., 2011. Cathepsin B trafficking in thyroid carcinoma cells. *Thyroid Research*, 4 Suppl 1, p.S2.
- Teichgräber, V. et al., 2008. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nature Medicine*, 14(4), pp.382–391.
- Thompson, M. & Cockerill, G., 2006. Matrix metalloproteinase-2: the forgotten enzyme in aneurysm pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1085, pp.170–174.
- Thorpe, S.M. et al., 1989. Association between high concentrations of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Research*, 49(21), pp.6008–6014.
- Trim, N. et al., 2000. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *The American Journal of Pathology*, 156(4), pp.1235–1243.
- Tsukada, S., Parsons, C.J. & Rippe, R.A., 2006. Mechanisms of liver fibrosis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 364(1-2), pp.33–60.
- Turk, B., Turk, D. & Turk, V., 2000. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1477(1-2), pp.98–111.
- Turk, V., Turk, B. & Turk, D., 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO Journal*, 20(17), pp.4629–4633.
- Varela-Rey, M. et al., 2007. Glutathione depletion is involved in the inhibition of procollagen alpha1(I) mRNA levels caused by TNF-alpha on hepatic stellate cells. *Cytokine*, 37(3), pp.212–217.

- Vasiljeva, O. et al., 2007. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Current Pharmaceutical Design*, 13(4), pp.387–403.
- Vetvicka, V. & Vetvickova, J., 2011. Procathepsin D and cytokines influence the proliferation of lung cancer cells. *Anticancer Research*, 31(1), pp.47–51.
- Victor, B.C. et al., 2011. Inhibition of cathepsin B activity attenuates extracellular matrix degradation and inflammatory breast cancer invasion. *Breast Cancer Research: BCR*, 13(6), p.R115.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation*, 10(1), pp.45–65.
- Wake, K., 1971. «Sternzellen» in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *The American Journal of Anatomy*, 132(4), pp.429–462.
- Weiskirchen, R. & Gressner, Axel M., 2005. Isolation and culture of hepatic stellate cells. *Methods in Molecular Medicine*, 117, pp.99–113.
- Weng, H. et al., 2007. IFN-gamma abrogates profibrogenic TGF-beta signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads. *Journal of Hepatology*, 46(2), pp.295–303.
- Werneburg, N.W. et al., 2002. Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(4), pp.G947–956.
- Whiting, J.F. et al., 1995. Tumor necrosis factor-alpha decreases hepatocyte bile salt uptake and mediates endotoxin-induced cholestasis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 22(4 Pt 1), pp.1273–1278.
- Will, H. et al., 1996. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(29), pp.17119–17123.
- Wong, L. et al., 1994. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *The Journal of Clinical Investigation*, 94(4), pp.1563–1569.

- Wullaert, A., Heyninck, K. & Beyaert, R., 2006. Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappaB and JNK activation in hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 72(9), pp.1090–1101.
- Xu, L. et al., 2005. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*, 54(1), pp.142–151.
- Yamada, Y. & Fausto, N., 1998. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *The American Journal of Pathology*, 152(6), pp.1577–1589.
- Yamamoto, H., Murawaki, Y. & Kawasaki, H., 1992. Collagenolytic cathepsin B and L activity in experimental fibrotic liver and human liver. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 76(1), pp.95–112.
- Yamamoto, K. et al., 2011. Emerging roles of cathepsin E in host defense mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21664991> [Accedido noviembre 30, 2011].
- Yan, C., Zhou, L. & Han, Y.-P., 2008. Contribution of hepatic stellate cells and matrix metalloproteinase 9 in acute liver failure. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 28(7), pp.959–971.
- Yan, R. et al., 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, 402(6761), pp.533–537.
- Yokoi, Y. et al., 1984. Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 4(4), pp.709–714.
- Yu, Q. & Stamenkovic, I., 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development*, 14(2), pp.163–176.
- Yu, W. et al., 2005. Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(12), pp.11731–11739.
- Zaidi, N. et al., 2008. Cathepsin D: a cellular roadmap. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(1), pp.5–9.

- Zeidan, Y.H. & Hannun, Yusuf A, 2007. Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(15), pp.11549–11561.
- Zeisberg, M. et al., 2007. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(32), pp.23337–23347.
- Zhang, W. et al., 2011. Clinical value of combined detection of serum matrix metalloproteinase-9, heparanase, and cathepsin for determining ovarian cancer invasion and metastasis. *Anticancer Research*, 31(10), pp.3423–3428.
- Zhuo, J.L. & Li, X.C., 2011. New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides*, 32(7), pp.1551–1565.