



UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

# Funció i potencial terapèutic de CPEB4 en l'aparició i progressió de lesions hepàtiques en context d'obesitat

Marta Ramírez Pedraza



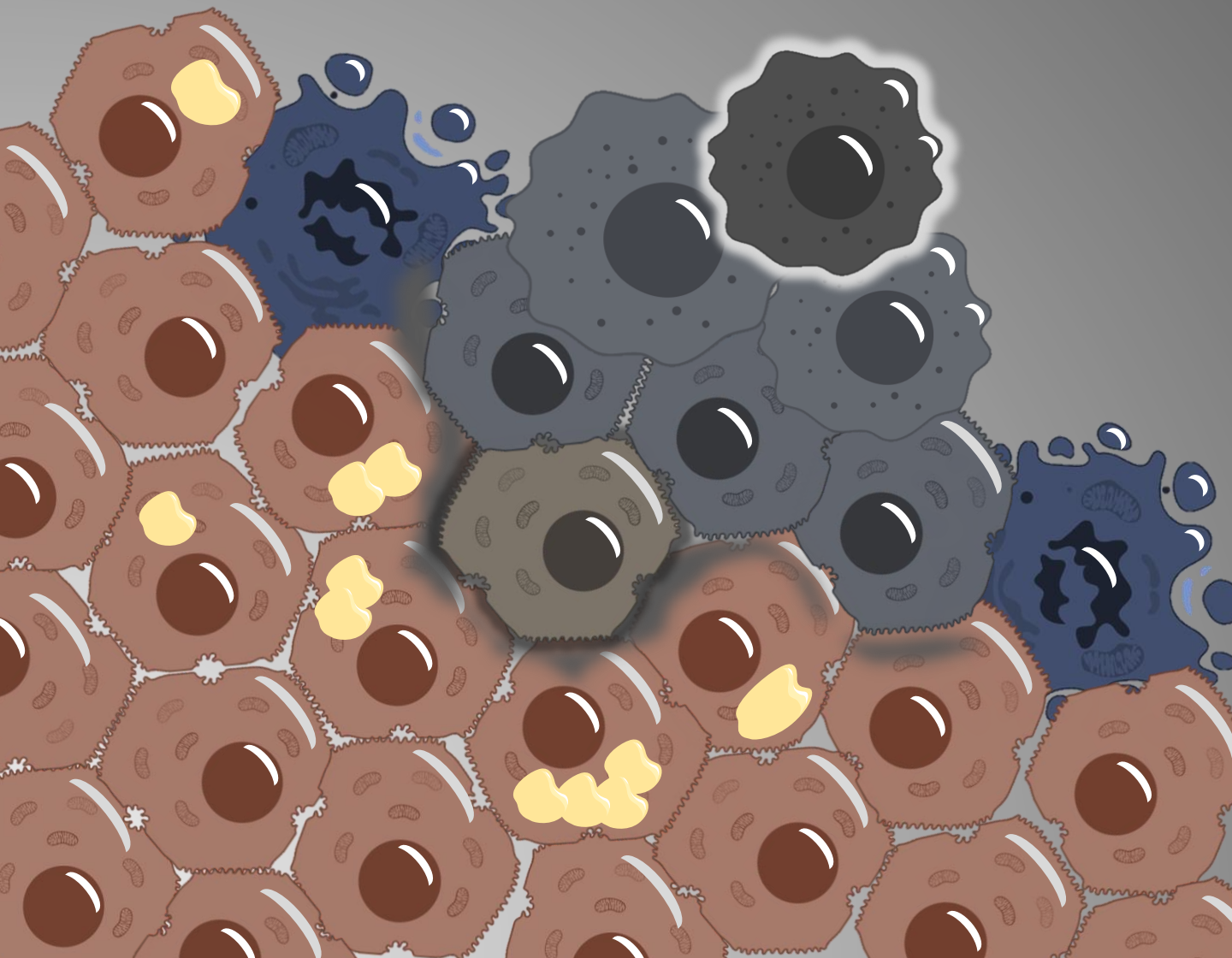
Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

# Funció i potencial terapèutic de CPEB4 en l'aparició i progressió de lesions hepàtiques en context d'obesitat

Autora Tesi Doctoral: Marta Ramírez Pedraza





# Funció i potencial terapèutic de CPEB4 en l'aparició i progressió de lesions hepàtiques en context d'obesitat



**Marta Ramírez Pedraza**

Institut D'Investigacions Biomèdiques Agust Pi i Sunyer



Director de tesi:

**Dra. Mercedes Fernández Lobato**



Tutor de tesi:

**Dr. Albert Tauler Girona**

Grup d'Angiogènesi i malalties hepàtiques

Programa de doctorat en Biomedicina

2020



---

A los míos,  
los que hacen de mi mundo  
un lugar más bello y amable.

---

---

“Tothom qui alguna vegada ha construït un nou cel,  
ha trobat abans el poder per a fer-ho al seu propi infern.”

FRIEDERICH NIETZSCHE,

*La genealogia de la moral*





# AGRAÏMENTS

---



## AGRAÏMENTS

Tot va començar fa ja bastant de temps (molt, massa) l'any 1992 quan els meus pares van decidir donar a llum a una nena tossuda i independent. Aviat es van adonar de que no era possible donar resposta a tots els meus "Perquè?", quina nena més pesada! Tot ho volia fer jo sola, "jo puc, jo puc" sempre buscant sentir-me auto-suficient. Allà ja es veia que apuntava maneres per acabar en alguna professió enrevessada, profunda i infinita així com ho eren les meves ambicions. Poc a poc vaig anar creixent, tot i que no tant de mida com d'esperit, i per sort, vaig acabar sent qui sóc ara. He après de milers, milions d'errors, alguns que tornaré a cometre, però la majoria queden ben enrere; lliçó apresada. Per l'aprenentatge que m'ha donat la vida que m'ha permès arribar on sóc ara, sempre, sempre, sempre tindrè els meus agraïments més sentits cap a ells, els meus **pares**.

Després de complir un dels meus somnis de sempre, viure a Anglaterra, vaig tornar amb un Màster sota el braç i plena d'il·lusió (què bé que s'hi està a la nostra terra!) per començar la tesi doctoral a un grup que em rebia amb els braços oberts a l'IDIBAPS. Gracias, **Mercedes**, por darme la oportunidad de entrar en tu grupo y ofrecerme todos los recursos que necesitaba para sacar esta tesis adelante, por ser siempre comprensiva y tener la mente abierta, y por permitirme tomar mis propias decisiones. Gracias también a **Raúl** por hacer de guía en las colinas tortuosas y llenas de desprendimientos de CPEB4. Y por supuesto a ti, **Salva**, gracias por tus rayitos de luz constantes alumbrando el camino y por abrir puertas que yo no era capaz de ver. Por pasarte horas y horas conmigo en el estabulario y ayudarme con los millones de ratones que tenía a mi cargo.

Gracias al equipo de MF. A tu **Ester**, per ser omnipresent, cuidar el grup i ser sempre tan empàtica. Per donar-me ànims sempre que pots, fins i tot quan ni jo sabia que els necessitava, i per plantejar la vida laboral amb humor i carinyo. Trobaré a faltar tenir-te a prop. A ti, **Javi**, por atender todas mis dudas y devolverme tantos consejos como tenías en las manos. Gracias por tu paciencia y tu sentido del humor que lo hace todo más ameno. A l'**Alex** que va arribar plena d'energia positiva i llum i no sabem com, però encara en té a tones. Ha estat un plaer ajudar-te sempre que ha estat possible i veure com poc a poc vas fent el teu propi camí. Tot anirà bé. Gràcies al **Marc**, que sempre m'oferia una abraçada en els pitjors moments i aconseguia treure'm un somriure. I a tu, **Núria**, per les confidències i aventures dels primers anys.

Gràcies també als equips que ens envolten al laboratori i que permeten l'intercanvi d'informació i material que fan la ciència més fluida i còmode. Als JCG i VH; el **Genís**, la **Marina**, la **Maria R**, l'**Hèctor**, l'**Erica**, la **Núria** i l'**Aina**. L'**Hèctor**, el gestor silenciós de la logística del laboratori (però tots ho sabem!!). Als JGS; l'**Albert**, l'**Anabel**, el **Martí**, la **Laia**, la **Maria A**, la **Raquel M**, el **Nico**, la **Júlia**, la **Raquel N**, el **David**, el **Peio**, la **Zoe** i el **Guixé**. Als Forns sempre disposats a cedir-nos tot allò que ens manca. Vull destacar l'agraïment cap al **Martí** i la **Mireia** que van fer possible muntar coses molt guays amb la PhD Community, sempre involucrats i donant el millor. No haguéssim fet res sense vosaltres! A tots els membres interns de la **PhD community** que van fer possible la creació d'esdeveniments socials i científics i que estaven plens de bones intencions i energia. Gràcies per confiar en mi.

A l'equip de dinar al pati, us trobaré molt a faltar!!!! Aquesta estoneta de pau i aire fresc em recarregava les piles cada dia. El **Genís** amb els seus comentaris sempre profunds i enrevessats que ens feia esperar cada dia per acabar-se el seus tapers gegants (i el pa, molt important). A **Peio** y **David** deleitándonos con sus historietas, haciéndonos reír y siempre dispuestos a proponer planes para tomar algo. A **Nico** por sus opiniones inesperadas; cómo te gusta crear polémica y dejarnos a todos perplejos con tus conocimientos dignos de hombre del renacimiento (aunque a veces hagas salmonadas como Raquel). Gracias, Nico, por hacerme compañía los veranos de soledad en el laboratorio, por escucharme, comprenderme y compartir conmigo este camino. Has sido un apoyo muy importante. A **María A** por tener siempre una sonrisa para regalar. A la **Zoe** siempre tan dispuesta a ayudar i escoltar, no se com, però sempre acabo rient amb tu! L'**Aina** que ha arribat amb la seva calma i bon humor molta sort en aquesta etapa! La **Raquel N** que sempre s'apunta a un bombardeig. Gràcies a tots, nois. Us desitjo el millor.

Als PhDs antics... Us guardaré a un raconet juntament amb la ruta en cotxe per Escòcia. A tu, **Raquel M**, gràcies per ser sempre tan sincera i clara i per ajudar-me sempre que ho vaig necessitar. Tots sabiem que acabaries a EEUU igual que sabem que aconseguiràs tot el que vulguis allà on vulguis. No canviïs. A **María** siempre tan intensa ¡¡cuántos cafés hablando de dramas!! Descubrí en ti mucha más sensibilidad de la que esperaba y me encantó conectar contigo, aunque fuera al final de tu etapa del PhD. Con ése espíritu de auto-superación y ese sentido del humor tan tuyo, te irá genial.

Les de la Uni, les genetics bastards: **Mariona**, **Mireia**, **Maria**, **Clàudia**, **Lidón**, **Sara**, **Carmen** i **Ene**. Un plaer seguir-vos tenint, muntar els nostres galliners i veure que hi ha vida més enllà de la ciència bàsica després del Grau de Genètica. Gràcies sobretot a la meva **Carmencita** i l'**Ene** per estar sempre, sempre, a les bones i a les dolentes, per fer-me riure de mi i de la vida i per ser tan meves. La meva vida seria molt diferent sense vosaltres i el meu camí fins a assolir el doctorat hagués estat encara molt més negre. ALOFIU. Les nenes, les de sempre. **Anita**, **Miriam** y **Laia**, gracias por vuestro apoyo incondicional y por no juzgarme nunca. Por tener siempre buenos consejos y ayudarme a ver luz al final del túnel. I com no agrair-te a tu, **Edu**. Que no ens vam trobar al cul del món fent el mateix Màster per casualitat, que tenim un paral·lelisme no se com i que ens entenem tan bé. Que ets de les poques persones amb qui em puc enviar a la merda amb tota naturalitat i de tant en tant va bé fer-ho i que t'ho facin. Gràcies per acompanyar-me, entendre'm i comptar amb mi; has estat una peça essencial d'inici a fi d'aquesta etapa.

**Erica**, ai la meva Erica. Què hagués fet sense tu!!!! La meva muleta moral dins i fora del laboratori. De totes les coses que m'enduc d'aquesta etapa tu estàs al TOP sense dubte. Consells, desconexió i camaraderia al laboratori (per plorar i per riure). Festivals, concerts, festes majors, sopars, escapades, anys de Camino de Santiago, confidències, homes i amistats compartides. No saps com et trobaré a faltar, compta sempre amb mi. No pateixis, tot anirà bé, un any passa volant i tu també podràs dir adéu a aquesta etapa.

Gracias a mis dos titas favoritas. A mi tita **Sara** por acogerme al principio de esta etapa y cuidarme como si fuera tu hija. Por reír y llorar conmigo ya desde hace años y por todo tu cariño. Y a ti, **Dolores**, por ayudarme en los peores momentos y por estar ahí y cuidarme

siempre. Gracias, os quiero mucho y habéis hecho posible que llegase hasta aquí. Gracias también a todos los miembros de la familia que me han ayudado a ser mejor y a construir mi vida.

A **mi chico**, el que hizo que todas las piezas encajasen. Gracias Dani, por acompañarme en este camino a pesar de que apenas lo llegases a entender. Me has agarrado fuerte todos los días que sentía que no me quedaba energía y me has escuchado y cuidado con todo lo que tenía. Te elegiría todas las veces, siempre. Te quiero.



# ÍNDEX

---





# ÍNDEX

1.	ABREVIACIONS	20
2.	RESUM	28
3.	INTRODUCCIÓ	32
3.1.	Anatomia del fetge	32
3.2.	Fisiologia del fetge	36
3.2.1.	Tipus cel·lulars	36
3.2.1.1.	Hepatòcits	36
3.2.1.1.1.	Polarització, transport i homeòstasi	37
3.2.1.1.2.	Funció de barrera immunitària	39
3.2.1.2.	Component immunitari	40
3.2.1.3.	Cèl·lules estrellades hepàtiques	42
3.2.1.3.1.	Activació i formació de matriu extracel·lular	43
3.2.1.3.2.	Metabolisme	44
3.2.1.4.	Cèl·lules endotelials sinusoidals hepàtiques	45
3.2.1.4.1.	LSEC, les portes de la immunitat al fetge	47
3.3.	Patologia del fetge	48
3.3.1.	NAFLD i NASH	49
3.3.1.1.	L'obesitat i el fetge gras	51
3.3.2.	Fibrosi	52
3.3.3.	Cirrosi	53
3.3.4.	Càncer de fetge	54
3.4.	Carcinoma hepatocelular (HCC)	55
3.4.1.	Factors de risc	55
3.4.2.	Síntomes	57
3.4.3.	Diagnòstic	57
3.4.4.	Tractament	58
3.4.5.	Mecanismes moleculars involucrats en HCC	59
3.4.5.1.	Inflamació	59
3.4.5.2.	Resistència a apoptosi	62
3.4.5.3.	Senescència	64
3.4.5.4.	Proliferació i evasió de supressors del cicle cel·lular	65
3.4.5.5.	Angiogènesi	66
3.4.5.6.	Metabolisme	67
3.4.5.7.	Invasió i metàstasi	68
3.4.5.8.	Inestabilitat genòmica	69
3.4.5.9.	Canvis epigenètics	69
3.5.	Família de proteïnes CPEBs	70
3.5.1.	Funció y mecanismes	70
3.5.2.	CPEB4 a la malaltia hepàtica	73
3.5.3.	CPEB4 en càncer	74
3.5.4.	CPEB4 com a diana terapèutica	76
4.	OBJECTIUS	80
5.	MÈTODES	84
5.1.	Models animals	84

5.1.1.	Generació de les línies <i>Knock out</i> (KO) de ratolí	84
5.1.3.	Estudis animals	85
5.2.	<i>In vitro</i>	86
5.2.1.	Proliferació	86
5.2.2.	Colònies en agar	86
5.3.	Monitorització de colònies d'animals	87
5.4.	Necròpsies i recollida de mostres	87
5.5.	Estudi macroscòpic	87
5.6.	Estudi histològic	88
5.7.	Anàlisi de sèrum	88
5.8.	PCR quantitativa a temps real	89
5.9.	Hemogrames	89
5.10.	Western blot	89
5.11.	Anàlisi estadístic	90
<b>6.</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>94</b>
6.1.	Obtenció de ratolins KO per a CPEB4	94
6.2.	CPEB4 limita el guany de pes corporal i l'acumulació de greix al fetge	95
6.3.	CPEB4 protegeix el fetge de l'aparició de lesions malignes sota l'efecte de HFD	99
6.4.	La manca de CPEB4 podria estimular l'entrada dels hepatòcits en senescència	103
6.5.	Els hepatòcits KO per a CPEB4 són més tumorigènics	106
6.6.	La manca de CPEB4 a tot l'organisme podria estimular un micro-ambient pro-tumoral	108
6.7.	CPEB4 afavoreix la resposta immunitària anti-tumoral	113
6.8.	La fibrosi i l'angiògenesis juguen papers secundaris en el procés carcinogènic relacionat amb CPEB4 i l'obesitat	117
<b>7.</b>	<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>122</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>132</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>135</b>

## ABREVIACIONES

---



## 1. ABREVIACIONS

ADN: àcid desoxiribonucleic

AFLD: alcohòlic fatty liver disease

AFP: proteïna alfa-fetal

AKT: proteïna quinasa B

ALT: alanina transaminassa

Apo1: apoliproteïna 1

APP: proteïnes de fase aguda

ARID1A, B, 2: domini ric en interacció a A-T

AST: aspartat transaminassa

AXIN1: proteïna d'inhibició de l'axis 1

$\alpha$ SMA: actina muscular o *smooth muscle actin*

BAX: X associada a BCL2

BCL2, xl: limfoma de cèl·lules B 2

BMI: índex de massa corporal

CAFs: fibroblasts associats a càncer

CCL2, 5, 9, 21: lligand de quimioquina amb motiu C-C

CCND1: ciclina D2

CCR2, 5: receptor de quimioquina C-C

CD4, 8, 14, 16, 68, 31, 151: glicoproteïnes de membrana

CDKN2A, 2B: inhibidor de quinasa dependent de ciclina

CE: èster de colesterol

CLC: citoquina semblant a cardiotrofina

CLD: malaltia crònica del fetge

CNAs: variacions del nombre de còpies

CPEB1-4: element de poliadenilació citoplasmàtica

CSC: cèl·lula mare cancerosa

CSF1R: receptor del factor 1 estimulador de colònies

CTL: limfòcit citotòxic

CTNNB1: catenina  $\beta$  1

CX3CL1: Lligand de quimioquina amb motiu C-X3-C

CX3CR1: receptor de CX3CL1

CXCL 1, 9, 11, 16, 25, 32: ligand de quimioquina amb motiu C-X-C

DAMP: damage-associated molecular pattern

DC: cèl·lula dèntrica

DNL: lipogènesi nova

ECM: matriu extracel·lular

EGF: factor de creixement endotelial

EGFR: receptor de factor de creixement de l'epidermis

EMT: transició epitel·li-mesènquima

eNOS: sintetasa endotelial d'òxid nítric

ESC: cèl·lules mare embrionàries

FAO: oxidació d'àcids grassos

FFA: àcids grassos lliures

FGF: factor de creixement de fibroblast

FOXM1: caixa de forquilla M1 o forkhead box

GLUT1: transportador 1 de glucosa

GPx4: peroxidasa de glutatió 4

GRASP: proteïna que permet el remuntatge de l'aparell de Golgi

HCC: carcinoma hepatocel·lular

HCV: hepatitis C

HFD: dieta greixosa

HIF1 $\alpha$ : factor induïble per hipoxia

HIV: virus immunodeficiència humana

HSC: cèl·lules hepàtiques estrellades

ICAM-1: molècula d'adhesió intercel·lular

IKK: quinasa IK

IL6, 10, 13, 15, 17, 22, 27, 31, 1 $\beta$ : interleuquina

INF: interferó

KC: cèl·lules Kupffer

KO: noquejat

LD: gota de greix

LDL: lípids de baixa densitat

LDLR: receptor de lipoproteïnes de baixa densitat

LIF: factor inhibidor de leucèmia

lncRNA: RNA llarg no codificant

LSEC: Cèl·lules endotelials sinusoidals hepàtiques

LY6C: complex 6 d'antígens de limfòcit

MAL2: proteïna de mielina i limfòcits 2

MAMP: microbial-associated molecular pattern

MHCII: complex d'histocompatibilitat

miR181b, 214-5p, 222, 199a: micro RNA no codificant

MLL3, 4: proteïna de llinatge mixt de leucèmia

MMP13: metal·loproteïnassa

MRI: ressonància magnètica

mRNA: missatger d'àcid ribonucleic

MYC: Avian Myelocytomatosis Viral Oncogen

NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease

NASH: non alcoholic steatohepatitis

ncRNA: RNA no codificant

ND: dieta normal

NFE2L2: factor nuclear d'eritròcits semblants al factor 2

NF- $\kappa$ B: factor nuclear *kappa-light-chain-enhancer* de cèl·lules B activades

NK: assassins naturals o *natural killer*

NKT: limfòcits *natural killer*

NLRP3: proteïna 3 amb dominis NOD, LRR i pyrin

NO: òxid nítric



OMM: membrana mitocondrial exterior  
p16INK4A: inhibidor de quinasa dependent de ciclins  
p21: inhibidor de quinasa dependent de ciclins  
PDGF: factor de creixement derivat de plaquetes  
PD-L1: lligand de receptor de mort programada  
PhSTAT3: factor de traducció de senyal i activació de la transcripció 3 fosforil·lat  
PI3K: quinasa de fosfo-inositol  
PKM2: isoenzim piruvat quinasa  
PlGF: factor de creixement de placenta  
PRR: patern recognition receptor  
PTEN: homòleg de fosfatasa i tensina  
RA: àcid retinoic  
RB1: retinoblastoma  
RME: endocitosi mediada per receptor  
ROCK: quinasa associada a Rho  
ROS: reactius lliures d'oxigen  
SASP: fenotip secretor associat a senescència  
SA- $\beta$ Gal: galactosidasa associada a senescència  
SC: stem cell  
SRB1: receptor *scavenger* B de tipo 1  
STAT3: factor de traducció de senyal i activació de la transcripció 3  
TAG: triacilglicerol  
TAM: macròfags associats a tumor  
TERT: transcriptasa reversa de telòmers  
TGF $\beta$ : factor de creixement transformador  
Th1, 2: limfòcit T *helper*  
TIMP: inhibidors de metaloproteinasses  
TNF $\alpha$ : factor de necrosi tumoral

TP53:

Tregs: limfòcits T reguladors

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferasa (TdT) dUTP nick end labeling

UTR: regió no traduïda

UPR: resposta a proteïnes mal plegades

VEGF: factor de creixement vascular endotelial

VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat

XIAP: proteïna inhibidora d'apoptosi lligada a X



## RESUM

---



## 2. RESUM

El carcinoma hepatocel·lular (HCC) és la segona causa de mort relacionada amb càncer i té avui en dia opcions terapèutiques molt limitades. Tot i que el HCC s'acostuma a estudiar en estats de malaltia hepàtica molt avançats, a la majoria dels casos evoluciona des d'estadis de malaltia més primerencs com la malaltia del fetge no alcohòlica (NAFLD). Aquesta té una elevada prevalença i està relacionada amb malalties metabòliques derivades de l'epidèmia mundial d'obesitat. Des de l'esteatosi, fins a l'esteato-hepatitis passant per la fibrosi, la cirrosi i finalment HCC, els hepatòcits pateixen canvis en l'expressió gènica que tot i que en un primer moment tenen l'objectiu de resoldre l'acumulació de triglicèrids, posteriorment contribueixen al desenvolupament de la malaltia. La interacció entre les cèl·lules hepàtiques i el nínxol tumoral juguen un paper essencial en el desenvolupament de HCC. Sumat a això, la regulació post-transcripcional de les proteïnes està emergint com a un regulador crític per a processos biològics com són l'expressió de citoquines, el control temporal de la resposta immunitària i el desenvolupament de tumors. Un mecanisme de control clau per la traducció i estabilitat dels mRNAs consisteix en els canvis de llargada en la cua poly(A) i aquest procés és regulat per les proteïnes CPEBs (proteïnes d'unió a l'element de poliadenilació citoplasmàtica). Aquestes s'uneixen a la regió 3'-no codificant o UTR dels mRNAs que contenen l'element d'unió CPE (element citoplasmàtic de poliadenilació) i poden arribar a intervenir en la divisió cel·lular, la senescència, la inflamació i per tant en el desenvolupament de càncer. La família de proteïnes CPEB1-4 són cada vegada més reconegudes per les seves funcions múltiples depenent del context del microambient i l'estadi de la malaltia, això fa complex entendre les implicacions específiques en les diferents patologies. Aquest és el repte que encara està per assolir i que ens disposem a encarar en aquest projecte pel que fa a CPEB4, el càncer de fetge i l'obesitat. Hem observat que la manca de CPEB4 a llarg termini estimula l'aparició d'obesitat quan es consumeix una dieta rica en greixos, estimula el guany de pes sense necessitat de consum de HFD i sobretot exacerba el fenotip patològic de la malaltia crònica del fetge. En relació al càncer de fetge, podem dir clarament que la manca d'expressió de CPEB4 en un context d'obesitat incrementa el nombre de lesions al fetge i el caire maligne d'aquestes. Sembla ser que la manca de CPEB4 permet l'entrada en senescència de les cèl·lules danyades en un primer moment. Les cèl·lules amb potencial tumoral per tant escapen el sistema immunitari, i el fetge es manté en un estat primerament i aparentment més saludable. Aquestes cèl·lules però, es reactiven en algun moment posterior quan el sistema immunitari ja no sembla ser capaç d'eradicar els processos tumorals que es troben en estat avançat. Tot plegat destacaria el potencial de CPEB4 com a proteïna supressora o limitant de les propietats tumorigèniques i inclús proliferatives de les cèl·lules tumorals en el cas del càncer de fetge, però donat l'increment en la penetrància del fenotip en els animals KO de tot el cos, podem dir que CPEB4 també té un efecte en altres factors com pot ser l'evasió del sistema immunitari i la polarització tolerogènica d'aquest, que permet que les lesions sobrevisquin més i prosperin causant HCC. Els nostres resultats aporten més evidències a les funcions paradoxals de CPEB4 en el desenvolupament de càncer i per tant ressalten la necessitat de definir un marc d'utilització d'aquesta molècula en cas de desenvolupar una teràpia.



# INTRODUCCIÓ

---





### 3. INTRODUCCIÓ

El fetge, amb un pes mitjà de 1500g és la glàndula més gran de l'organisme i el segon teixit més extens de tot el cos després de la pell, el seu pes ocupa aproximadament el 2-3% del pes total del cos. Duu a terme més de 500 funcions vitals que juguen papers essencials tant en el manteniment de l'homeòstasi com en l'inici i progressió de patologies <sup>1</sup>. Entre els mecanismes biològics més importants en els que està involucrat hi trobem: detoxificació de productes metabòlics de rebuig; destrucció d'eritròcits no funcionals i absorció dels seus components; síntesi i secreció de bilis al duodè per mitjà del sistema biliar; síntesi de proteïnes plasmàtiques inclosos els factors de coagulació però excloent les immunoglobulines; síntesi de lipoproteïnes plasmàtiques; i finalment, funcions metabòliques.

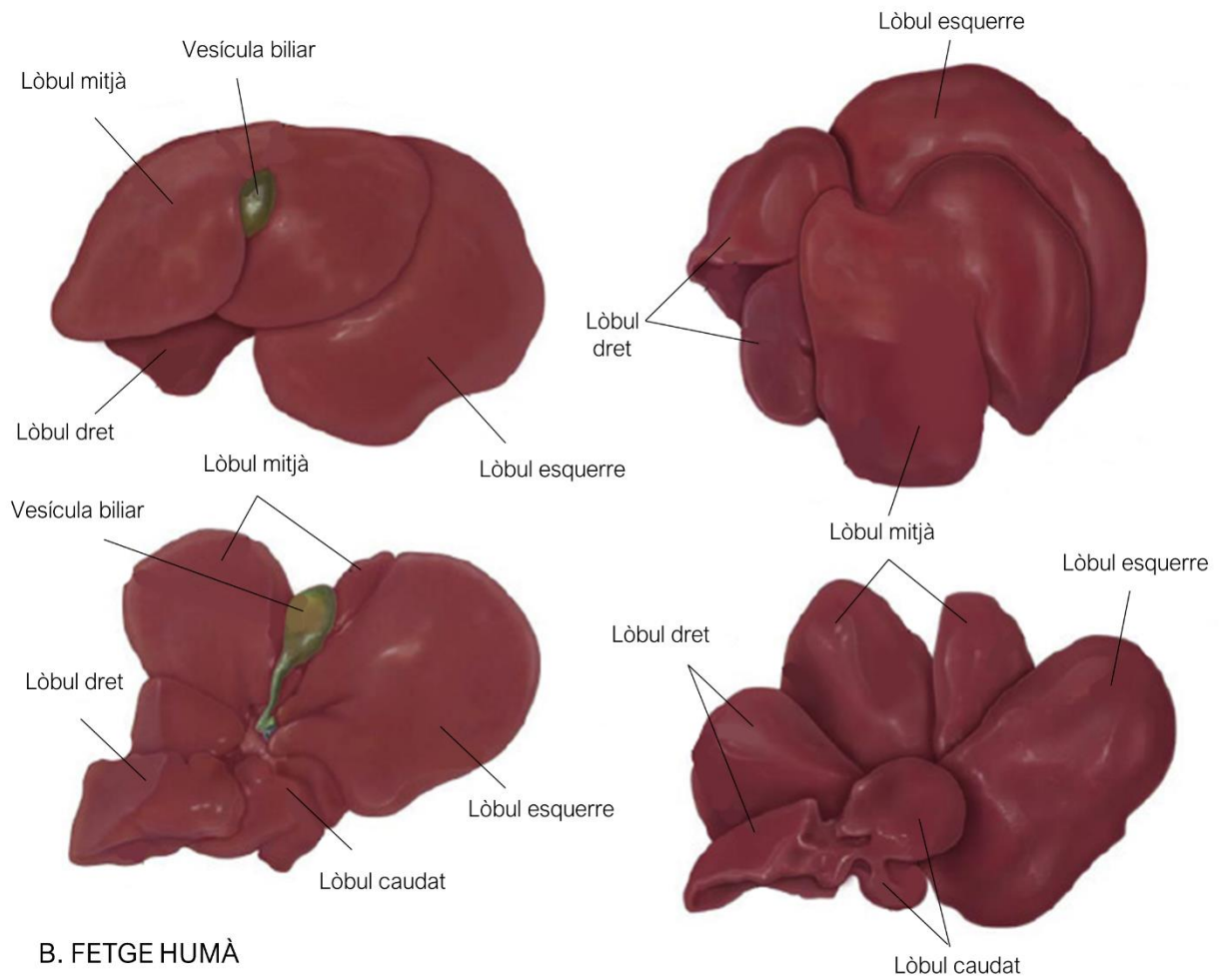
A conseqüència de ser el filtre de toxines de tot l'organisme, el fetge està constantment exposat a estrès i malauradament, l'aparició de malaltia hepàtica crònica i càncer és cada vegada més comú. Aquest increment en la incidència es deu a l'estil de vida sedentari i a l'alimentació rica en hidrats de carboni i greix de la cultura occidental que mantenen l'organisme en un estat d'inflamació crònica. Aquesta inflamació crònica es torna patològica en persones amb obesitat i altera l'equilibri del sistema immunitari promovent el dany tissular i l'establiment de cèl·lules amb potencial maligne a tot l'organisme però especialment al fetge. En aquest sentit, el carcinoma hepatocelular és un dels càncers més mortífers a tot el món i les opcions terapèutiques són reduïdes.

#### 3.1. Anatomia del fetge

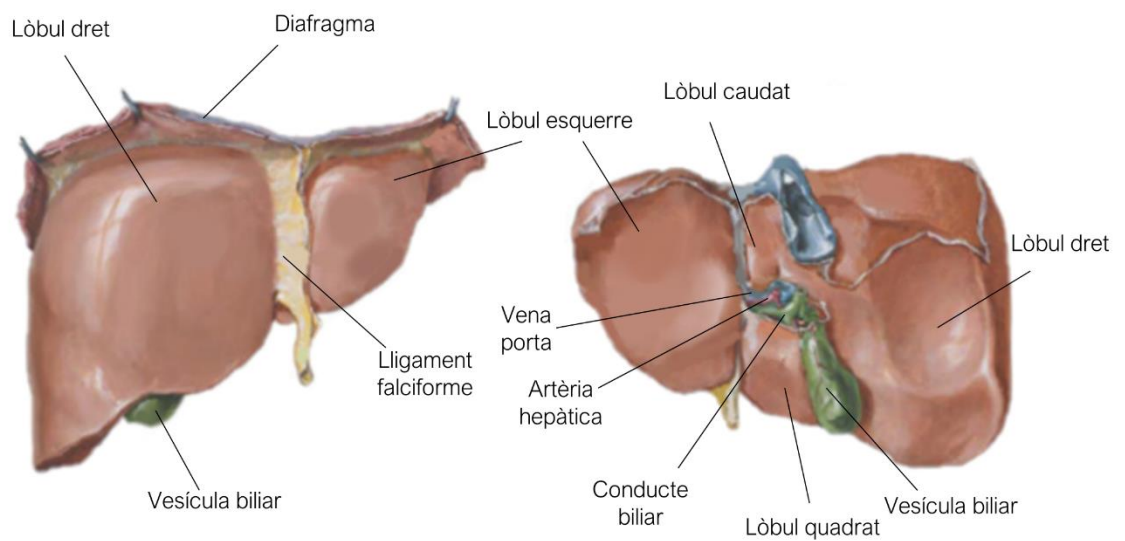
En humans, el fetge es localitza a sota del diafragma a la dreta, dins la cavitat abdominal i conté quatre lòbuls que estan units entre ells. A la part anterior del cos, s'hi troben el lòbul dret gran i el lòbul esquerre petit mentre que a la regió en contacte amb les vísceres s'hi troben el lòbul caudat amunt i el quadrat a sota sempre situats entremig dels lòbuls dret i esquerre. Tot el fetge humà es troba envoltat per una càpsula de col·lagen anomenada càpsula de Gilsson i aquesta és contínua amb l'estroma intern del fetge. El fetge es caracteritza per estar envoltat i travessat per lligaments que li permeten mantenir la posició i també per la presència adherida, a sota del lòbul dret, de la vesícula biliar (*Figura 1B*) <sup>2,3</sup>.

En ratolí, un dels models animals més utilitzats en investigació, l'estructura del fetge és lleugerament diferent a l'humà i és més gran en proporció a tot el cos representant un 3-5% de tot el pes del cos. De fet, pràcticament tota la part superior de la cavitat abdominal és fetge. En aquest cas no hi ha lligaments que permetin diferenciar els diferents lòbuls però també podem trobar quatre lòbuls diferenciats que són els anomenats dret, esquerra, caudat i mitjà. Els lòbuls dret i mitjà estan partits en dos, units per una petita regió de teixit. Del centre de la unió de tots els lòbuls i passant entremig de les dues parts del lòbul mitjà hi trobem la vesícula biliar (*Figura 1A*) <sup>2</sup>.

**A. FETGE RATOLÍ**



**B. FETGE HUMÀ**



**Figura 1.** Anatomia del fetge de ratolí (A) i del fetge humà (B) (extret i modificat de Tajiri et al, 2017).

Tot i les lleugeres diferències en l'anatomia macroscòpica, les dues espècies compartim les vies de subministrament de sang i la micro-anatomia que atorguen al fetge la capacitat de dur a terme la seva funció vital. L'organisme requereix oxigen per al seu correcte funcionament i en aquest sentit, l'oxigen necessari per donar suport a la intensa activitat metabòlica del fetge, prové de la sang arterial i arriba a través de l'artèria hepàtica. Podem dir llavors, que el fetge té dues fonts principals de sang; per una part la sang venosa (80%) que serà drenada i per altre part la sang arterial (20%) per al subministrament d'oxigen i nutrients necessaris per al funcionament del teixit (**Figura 2**). El drenatge venós del fetge té lloc a través de la vena hepàtica i la limfa i va a parar directament al conducte toràcic. Així doncs, la posició del fetge al sistema circulatori és clau per a recollir, transformar, i acumular metabòlits a la vegada que per a neutralitzar i eliminar substàncies tòxiques. Aquests processos d'eliminació de tòxics tenen lloc a la bilis, una secreció essencial per a la digestió de lípids.

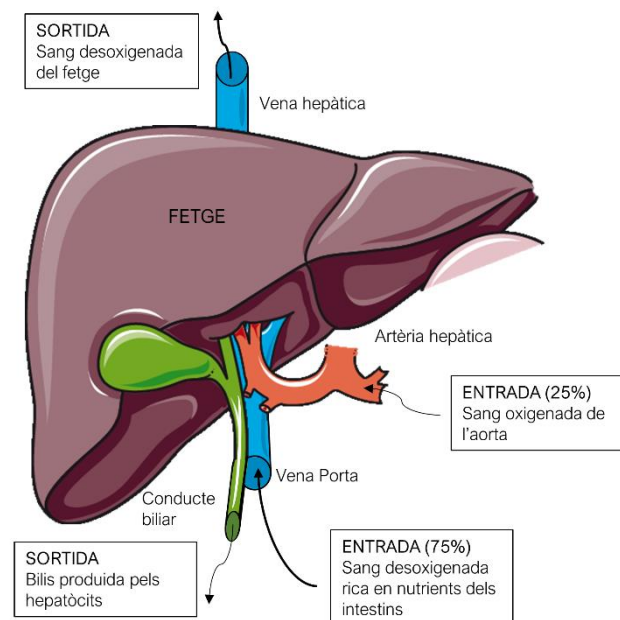


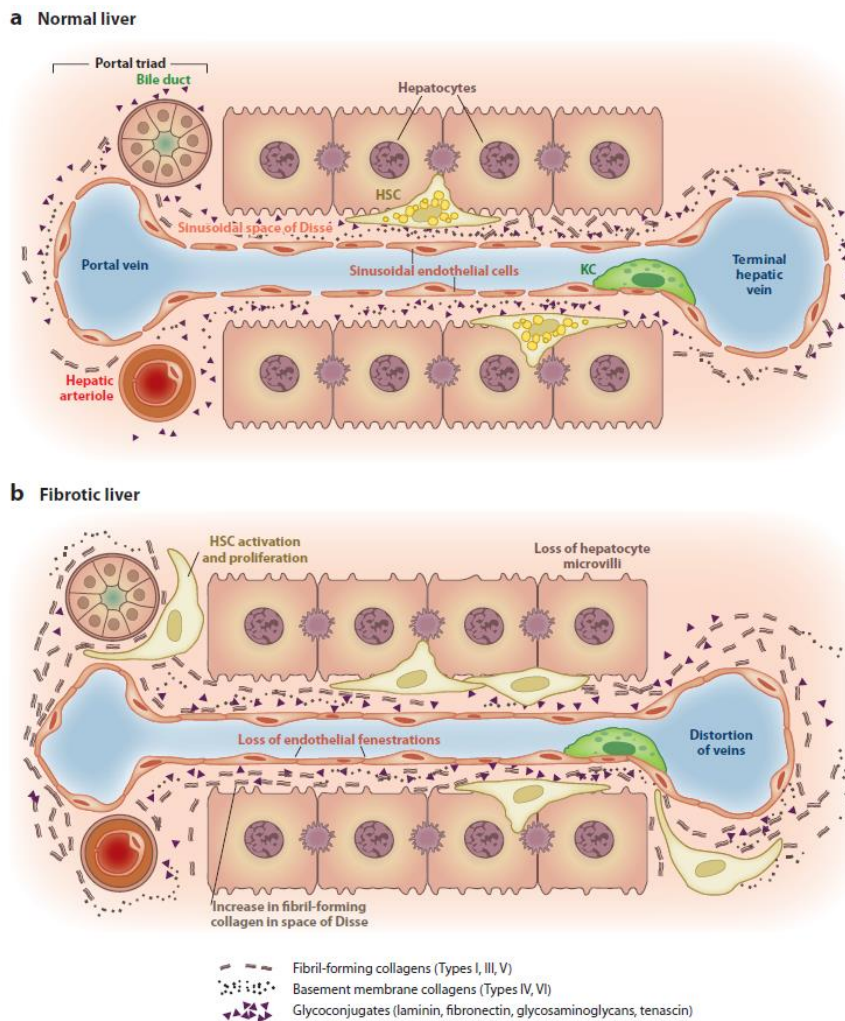
Figura 2. Flux sanguini al fetge

El fetge té una micro-anatomia específica que li permet mantenir les seves funcions polifacètiques i l'homeòstasi del teixit (

**Figura 3**). El tipus cel·lular més abundant del fetge són els hepatòcits (80%) i es distribueixen en lòbuls amb forma poligonal que permeten maximitzar el contacte entre els hepatòcits i la sang que circula a través del teixit. La resta són anomenades cèl·lules no parenquimals (20%). Als vèrtex dels lòbuls hi ha tríades portals, cadascuna amb una vènula (ramificació de la vena porta), una arteriola (ramificació de l'artèria hepàtica) i un conducte biliar. Els hepatòcits tenen una disposició radial als lòbuls i formen una capa d'una o dues cèl·lules de gruix organitzades com una paret de blocs de maó. L'espai que es troba entre les capes s'anomena sinusoides hepàtics i està envoltat per una capa discontinua de cèl·lules endotelials sinusoidals hepàtiques (LSEC; *liver sinusoidal endothelial cells*) que contenen

fenestres<sup>4,5</sup>. Els sinusoides comencen a la perifèria del lòbul alimentats per les branques terminals de les venes portals i les arterioles hepàtiques de les tríades portals. Les cèl·lules endotelials se separen dels hepatòcits per un espai subendotelial anomenat espai de Disse que conté els microvil·lis dels hepatòcits (

**Figura 3).** D'aquesta manera, els fluids provinents de la sang travessen la barrera endotelial i contacten amb la superfície dels hepatòcits donant lloc a l'intercanvi de macromolècules des del lumen sinusoidal a l'hepatòcit i a l'inrevés. Això permet que els hepatòcits descarreguin tot el component de macromolècules que necessita l'organisme i el catabolisme d'aquestes. A part de les LSEC, el sinusoides conté cèl·lules fagocítiques anomenades Kupffer (KC; *Kupffer cells*), són macròfags específics de teixit que tenen com a principal funció metabolitzar eritròcits envellits, restes de la circulació, digerir hemoglobina i secretar les molècules necessàries per als processos immunològics que tenen lloc al fetge<sup>4</sup>. Les cèl·lules hepàtiques estrellades (HSC; *Hepatic stellate cells*) es troben a l'espai Disse i tenen la capacitat d'emmagatzemar la vitamina A obtinguda de l'alimentació en forma d'èsters de retinil a les gotes de greix i intervien molt activament a la resposta immunitària<sup>6,7</sup>. Els estímuls d'estrès activen les HSC i les KC donant una resposta que alterarà la microanatomia del teixit i per tant el seu equilibri i funcionament.



**Figura 3.** Microanatomia del fetge: el sinusoides hepàtic en un fetge normal (a) i un fetge fibròtic (b) (extret de Hernández-Gea i Friedman 2011)

### 3.2. Fisiologia del fetge

El fetge duu a terme les seves funcions fent servir directament els productes obtinguts de la digestió que són absorbits per els enteròcits de l'intestí i promou la biosíntesi de noves molècules. Així doncs, amb excepció de la majoria de lípids que són transportats generalment per els vasos limfàtics, els productes obtinguts del menjar ingerit, s'absorbeixen a la sang venosa de l'intestí prim i van al fetge a través de la vena porta abans d'entrar a la circulació general. Per tant, la sang que entra al fetge i és allà filtrada, té un elevat contingut d'aminoàcids, sucres simples i altres productes de la digestió però el contingut en oxigen és pobre.

El fetge és un òrgan metabòlic clau per a l'obtenció d'energia per a tot l'organisme i les xarxes metabòliques implicades estan molt regulades amb intervenció de senyals que provenen dels nutrients, d'hormones i de les neurones <sup>8</sup>. Una de les funcions més importants del fetge és el metabolisme de lípids ja que en defineix el seu destí en funció de si en fa cossos cetònics, triglicèrids, fosfolípids o colesterol. El greix que s'acumula al fetge del fetus permet obtenir molta energia per a la correcta formació de la resta de teixits <sup>9</sup>. El metabolisme de la glucosa a través de la glicòlisi és també una funció essencial i permet l'obtenció d'energia per a tot l'organisme. En un estat de nutrició assolida, els productes de la glicòlisi se sintetitzen per a generar nous àcids grassos i aquests s'acumulen als hepatòcits en forma de LD (*lipid droplets* o gotes de greix) o se secreten a la circulació en forma de VLDL (lipoproteïna de molt baixa densitat). En un estat de nutrició no assolida, el fetge secreta glucosa a través de la digestió del glicogen i de la síntesi de noves molècules de glucosa <sup>8</sup>.

Ja que el fetge està contínuament exposat a toxines, aquest ha desenvolupat la capacitat de ser tolerant però també la d'iniciar processos apoptòtics o autofàgics si és necessari per tal de mantenir l'homeòstasi del teixit. De fet, l'autofàgia protegeix el teixit danyat eliminant macromolècules i orgànuls a través dels lisosomes que li permeten mantenir el balanç energètic i reciclar nutrients. Tot i així, l'autofàgia descontrolada juga un paper important en el desenvolupament de la malaltia hepàtica a tots els nivells <sup>10</sup>.

#### 3.2.1. Tipus cel·lulars

##### 3.2.1.1. Hepatòcits

Els hepatòcits conformen el 80% del component cel·lular del fetge. Tal i com ja hem explicat anteriorment, la seva funció principal és captar la sang del sinusoides i filtrar-la, però segons la localització específica a la que es trobin dins el teixit, aquests poden tenir diferents funcions. Les cèl·lules situades a la zona peri-portal estan involucrades principalment amb el metabolisme oxidatiu (metabolisme del glicogen, gluconeogènesi,

oxidació d'àcids grassos i síntesi d'urea) mentre que les cèl·lules situades a la zona pericentral amb vènules, estan involucrades en la glicòlisi anaeròbica, lipogènesi i cetogènesi així com en la síntesi de lipoproteïnes i glutamina <sup>9</sup>.

#### 3.2.1.1.1. Polarització, transport i homeòstasi

Per a poder assolir totes les seves funcions l'hepatòcit ha evolucionat convertint la seva membrana en un aparell súper transportador que treballa complexa i continuadament amb un sistema basat en la formació de vesícules i proteïnes trans-membrana <sup>11</sup>. Igual que la resta de cèl·lules epitelials, els hepatòcits tenen membranes plasmàtiques als dominis apicals i baso-laterals que contenen diferents proteïnes de superfície, canals i receptors. Al domini sinusoïdal (baso-lateral), hi resideixen els receptors quinasa intrínsecs com EGFR, receptors claus de lípids i ferro tals com el receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (LDLR) o el receptor de transferrina (TfR) però també hi trobem transportadors encarregats de captar àcid biliar. Al domini canalicular (apical), hi ha transportadors de cassets d'ATP (ABC) i altres transportadors encarregats de la sortida d'àcid biliar (*Figura 4B*).

L'exclusivitat dels hepatòcits no es deu només a tota la maquinària que contenen sinó també a la seva estructura, ja que poden tenir diversos dominis baso-laterals i apicals a prop els uns dels altres que els hi permeten mantenir la integritat dels sistemes secretor, excretor i endocític (*Figura 4A*). Gràcies a la seva característica poliploide derivada de citocinesis incompletes, contenen diversos parells de centríols que permeten l'existència de múltiples centres organitzadors de microtúbuls <sup>12,13</sup>. Es poden trobar Aparells de Golgi propers a aquests centres que podrien indicar que són centres independents per a la importació i exportació de proteïnes <sup>14</sup>. Així doncs, és essencial la seva estructura tubular però també és essencial la seva polarització mitjançant la presència selectiva de proteïnes de membrana residents als dominis sinusoïdals o canaliculars. Un bon exemple és la producció d'àcid biliar que requereix una composició específica i la funcionalitat i coordinació dels dominis apical i baso-lateral; els components s'originen a l'hepatòcit des del qual han de ser transportats a la membrana apical fins al canalicule biliar que es forma entre els hepatòcits adjacents. Per altre banda, components de l'àcid biliar que es transporten per la circulació són captats per l'hepatòcit a través de la membrana sinusoïdal.

Entre les proteïnes clau secretades pels hepatòcits hi trobem:  $\alpha$ -fetoproteïna, albúmina, transferrina, plasminogen, fibrinogen i factors de coagulació <sup>15</sup>.

L'hepatòcit té diversos mecanismes que li permeten dur a terme endocitosi, entre ells es troben l'endocitosi basada en caveoles, l'endocitosi que inclou la fase fluida i la més activa i descrita que és l'endocitosi mediada per receptor (RME) <sup>16</sup>. Aquesta capacitat endocítica està estretament relacionada amb l'activitat metabòlica i un exemple és el control de l'homeòstasi de la glucosa.

Els hepatòcits, al igual que moltes altres cèl·lules epitelials duen a terme el procés anomenat transcitosi per a transportar la càrrega fluida o proteica d'un domini de la membrana a un altre ja sigui baso-lateral cap a apical o a l'inrevés. Tot i així, en aquest sentit el hepatòcits també són únics i tenen un sistema de transcitosi específic que els permet transportar les

proteïnes acabades de sintetitzar des del Golgi a la membrana sinusoidal abans de ser transportats a la membrana canalicular <sup>17</sup>. Estudis suggereixen que aquest mecanisme de transcitosi en hepatòcits és dependent d'espècies de lípids tal com colesterol o glicoesfingolípids que no tenen un efecte directe però que alteren l'activitat del regulador MAL2 que és una proteïna de membrana anomenada proteïna 2 de limfòcits i mielina. Tot i així, els mecanismes específics pels quals MAL2 controla aquest procés no han estat determinats <sup>18,19</sup>.

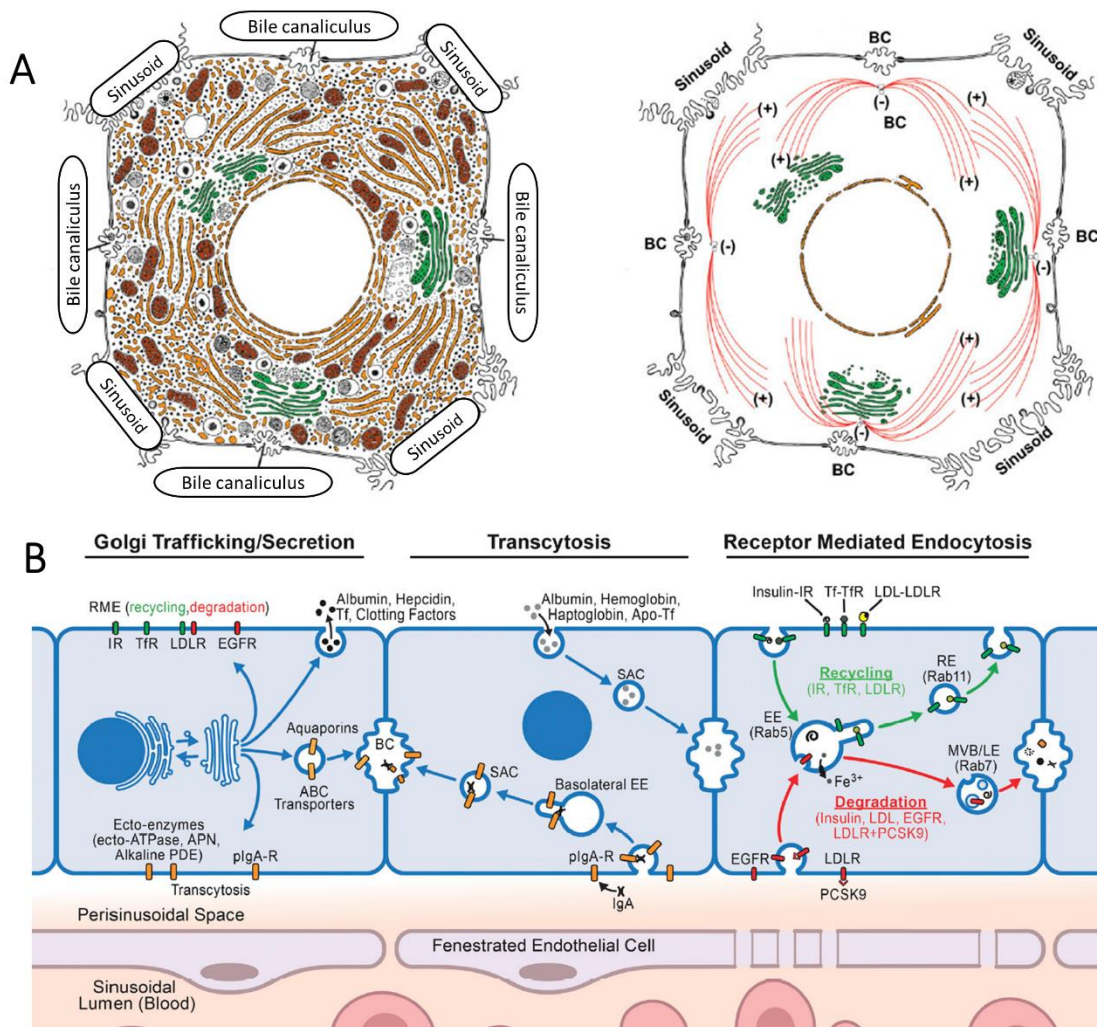


Figura 4. Polarització i mecanismes de transport de l'hepatòcit (extret i modificat de Schulze et al, 2019)

El fetge i en concret l'hepatòcit és un punt crític per a l'absorció, emmagatzematge, digestió i secreció de lípids. Els lípids de la dieta són secretats a la circulació en forma de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) gràcies als hepatòcits <sup>11</sup>. Els àcids grassos continguts a les VLDL derivades d'hepatòcits provenen de quatre fonts principals: àcids grassos units a albúmina secretats pel teixit adipós a través de lipòlisi; lipoproteïnes romanents internalitzades derivades de la dieta; lipoproteïnes d'elevada densitat derivades d'èsters de colesterol (CE) que son internalitzades; triacilglicerols (TAG) sintetitzats per *de novo* lipogènesi <sup>20</sup>. Alguns estudis suggereixen que proteïnes com TANGO1 participen en



la secreció de càrregues de volum elevat com són les VLDL formant canals de transport, però els mecanismes que ho descriuen encara són un misteri<sup>21,22</sup>. Si que es coneix, però, que el mecanisme d'internalització de lipoproteïnes és mitjançant el sistema RME reconeguts per el receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (LDLR)<sup>23</sup>. Les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) contenen a la seva superfície ApoB100 i ApoE que són reconeguts per els LDLR i internalitzats, posteriorment el receptor serà reciclat i retornat a la membrana<sup>24</sup>.

Pel que fa al greix, el fetge també té la capacitat d'empaquetar grans quantitats de triglicèrids en forma de gotes de lípids (LD; *lípid doplets*), formant un nou orgànul citosòlic per a l'emmagatzematge de lípids i és precisament aquest mecanisme de supervivència que afecta perjudicialment a les societats Occidentals actuals que consumeixen gran quantitat de carbohidrats i greix<sup>25</sup>. Els LD ocupen gran part dels hepatòcits alterant el seu funcionament i provocant NASH que pot acabar conduint al desenvolupament de càncer de fetge. Aquests LD són catabolitzats per mecanismes variats que permeten l'obtenció d'energia, però també es consumeixen a partir de lipofàgia<sup>26,27</sup>.

#### 3.2.1.1.2. Funció de barrera immunitària

Aquestes cèl·lules no són només una peça clau per al metabolisme sinó també conformen una de les primeres barreres del sistema immunitari promovent la neteja de patògens i la regulació immunitària mitjançant la secreció i detecció de molècules del sistema immunitari innat<sup>28</sup>. Davant d'una senyal patogènica o inflamatòria els hepatòcits tenen la capacitat de secretar tota una sèrie de proteïnes que han estat anomenades proteïnes de fase aguda (APP). Aquestes proteïnes poden matar patògens directament o orquestrar la resposta per a una neteja de patògens adequada. La producció d'APP està regulada per citoquines variades tals com IL6, IL22, IL1 $\beta$ , interferó- $\gamma$  (INF  $\gamma$ ), i TNF $\alpha$  que activen factors de transcripció tals com STAT3 o NF- $\kappa\beta$ <sup>29</sup>. També hi ha proteïnes reguladores que en permeten un control estricte com són la família de proteïnes potenciadores de la unió a CCAAT (C/EBP) que estan enriquides al fetge<sup>30</sup>.

La primera resposta de l'hepatòcit davant d'una infecció és matar els patògens mitjançant la secreció de components de la immunitat humoral en la que participen els limfòcits B. Però hem de tenir en compte que els hepatòcits tenen el sistema del complement activat de manera constitutiva i molt regulada per tal de mantenir l'organisme lliure de patògens a la vegada que mantenen un estat d'immunotolerància<sup>31</sup>.

Per altre banda, és el principal productor de fibrinogen, una proteïna que circula per la sang i permet la formació de coàguls així com l'adhesió de monòcits, macròfags i neutròfils. També són productors molt actius d'inhibidors de proteases que inactiven les proteases secretades pels patògens i les cèl·lules moribundes<sup>32,33</sup>.

Els hepatòcits tenen també capacitat de generar quimioquines per atraure cèl·lules immunitàries tals com CCL2 per als macròfags i CXCL1 per als neutròfils<sup>34</sup>. Finalment, els hepatòcits secreten una sèrie de molècules immunoreguladores que permeten contenir

la resposta immunitària si aquesta és excessiva com PGLYRP2 (proteïna de reconeixement de peptidoglicans) que té la capacitat de trencar els peptidoglicans en petits fragments que eviten el seu reconeixement <sup>30</sup>. També contribueixen a la immunotolerància reduint l'expressió de marcadors en situacions patològiques que redueixen la supervivència de cèl·lules immunitàries com és el cas de les cèl·lules T a partir de l'expressió de PD-L1.

### 3.2.1.2. Component immunitari

El fetge té un component immunitari específic de teixit i també té la capacitat de captar cèl·lules immunes de la circulació, això li permet desenvolupar una resposta immunitària ràpida davant dels estímuls que ho requereixin. Ja que és un òrgan que té com a objectiu filtrar tot allò que ingerim abans de passar a la circulació i estendre's per tot l'organisme, ha de tenir la capacitat dual de rebutjar tòxics i de ser immunotolerant per a permetre l'entrada de molècules i macromolècules externes. El canvi de fenotip immunotolerant a immunològicament hiperactiu ha de ser ràpid i això concedeix al fetge qualitats que el fan vital i únic.

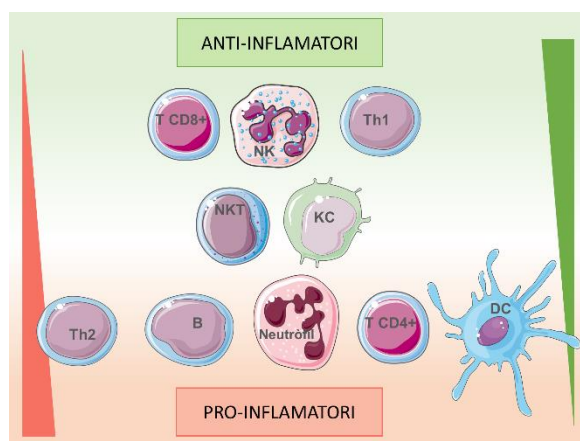
La cèl·lula immunitària més abundant al fetge són els macròfags. Aquests tenen la capacitat de fagocitar patògens, cèl·lules mortes, restes cel·lulars i diversos components de la matriu extracel·lular. Els macròfags però, no són només importants per la seva capacitat fagocítica sinó que són un important component de l'arquitectura de l'estroma de molts teixits i òrgans regulant no només l'homeòstasi sinó també la remodelació d'aquests. Tal i com ja he anomenat anteriorment en el cas del fetge, els macròfags especialitzats s'anomenen cèl·lules Kupffer. Les KC es troben generalment als sinusoides hepàtics disposats a caçar eritròcits senescents o envellits però també realitzen altres funcions necessàries per al desenvolupament del teixit o la regeneració després d'un dany ja que tenen la capacitat d'estimular l'angiogènesi mitjançant la secreció de proteases i factors de creixement <sup>35</sup>. Podríem dir que les KC amb els Toll receptors són els primers guardians que s'encarreguen de lliurar al fetge dels patògens.

L'espectre de cèl·lules immunitàries que ocupen el fetge és extens, i les més estudiades i abundants són les KC tal i com hem dit anteriorment <sup>36</sup>. Aquestes, presenten un patró de reconeixement de receptors (PRR) per a la detecció i degradació de patrons associats a microbis (MAMP) i també per a la detecció de patrons associats a dany cel·lular (DAMP) <sup>37</sup>. L'origen de les KC del fetge pot ser variat: el sac embrionari, la medul·la òssia o cèl·lules *stem* (SC) hematopoètiques derivades del mur ventral de l'aorta a la regió gonadal del mesonefres (AGM) <sup>38</sup>. Els macròfags derivats del sac embrionari i les del AGM són tan semblants que són generalment considerades per igual, al voltant de la setmana 5 de gestació del fetus, les SC hematopoètiques colonitzen el fetge i donen lloc a cèl·lules madures. Es poden diferenciar segons l'origen ja que contenen algun marcador específic <sup>39</sup>. Les que provenen del sac embrionari expressen el receptor factor 1 estimulador de colònies (CSF1R) i permet el desenvolupament de les KC específiques de teixit al fetus durant el desenvolupament. Els macròfags derivats de la medul·la òssia, expressen el receptor de quimioquines C-C de tipus 2 (CCR2<sup>+</sup>) i el complex limfocític de l'antigen 6

(LY6C<sup>+</sup>) i són reclutats al fetge on es transformaran en KC <sup>40</sup>. El reclutament de monòcits al fetge té lloc generalment com a resposta a un estímul inflamatori o dany hepàtic per tal de restablir l'homeòstasi del teixit i una vegada han realitzat la seva funció, esdevenen apòtics.

Depenent de l'origen i el procés de diferenciació, les característiques fenotípiques dels macròfags poden variar (marcadors de membrana i perfil d'expressió genètica) així com la seva funcionalitat i aquestes diferències també es mantenen entre les espècies. Per exemple, els monòcits humans clàssics (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) corresponen als monòcits GR1<sup>+</sup>/Ly6C<sup>high</sup> en ratolí que són CCR2<sup>+</sup>Cx3CR1<sup>low</sup>. El Cx3CR1 o receptor *fractalkine*, és considerat un regulador clau per a l'activitat dels macròfags <sup>41,42</sup>. A part de les KC, altres macròfags poden presentar-se al fetge. Aquests són: macròfags derivats dels monòcits, cèl·lules mieloides dendrítiques, macròfags associats a ferida, macròfags associats a tumor i cèl·lules mieloides monocítiques supressores. L'adquisició d'un fenotip pro-inflamatori o anti-inflamatori depèn del microambient local del teixit <sup>36,37,43</sup> **Figura 5.**

Conèixer l'espectre complet de macròfags presents i activats al fetge així com els mecanismes implicats i el seu paper en el desenvolupament i progressió de malaltia hepàtica o reparació de teixit és una peça clau des d'un punt de vista terapèutic. Per exemple, els macròfags associats a ferida contribueixen positivament a la resolució de la fibrosi mitjançant la producció del lligant de quimioquina 9 (CCL9) i metal·lo-proteïnasa 13 (MMP13) <sup>44</sup>. Altres estudis han demostrat la importància dels receptors específics responsables de l'activació dels macròfags com la integrina alfa-beta3 <sup>45</sup>. Aquest és un receptor per a vitronectina, i la seva inhibició *in vivo* redueix l'angiogènesi però empitjora la fibrosi del fetge ja que promou la inflamació en incrementar la zones hipòxiques, indicant que participa en l'angiogènesi fisiològica d'una manera rellevant. No hem d'oblidar, però, les limitacions que impliquen l'ús de models animals en investigació, sobretot en aquells projectes relacionats amb les xarxes immunitàries ja que poden no ser bons predictors del que succeeix en la malaltia humana <sup>35</sup>.



**Figura 5.** Component immunitari al fetge i el seu paper en resolució de inflamació. Limfòcits T, B i NKT, cèl·lules dendrítiques (DC) limfòcits T helpers i granulòcits en forma de neutròfils i NK. També KC.

Altres components immunitaris minoritaris també juguen el seu paper en el manteniment de l'homeòstasi o per contra, el desenvolupament de malaltia. Generalment són reclutats al teixit davant de senyals inflamatòries provinents de les HSC, les LSEC o les KC. Els neutròfils degraden col·lagen per a resoldre dany hepàtic a través de la secreció de MMPs i per contra, les cèl·lules dendrítiques (DC) són pro-fibrogèniques de la mateixa manera que alguns subgrups de limfòcits com els T *helpers* 2 (Th2) que promouen la formació de fibra mitjançant la secreció d'interleuquines tals com IL4, IL5, IL13, IL17A o a través de l'activació de l'inflamasoma NLRP3 <sup>46-48</sup>. En aquest sentit també és important destacar el subgrup de limfòcits T *helpers* 1 (Th1) ja que tenen efectes anti-fibròtics a través de la secreció de IFN- $\gamma$ . Les cèl·lules *natural killers* (NK) també juguen un paper anti-fibròtic mitjançant diferents mecanismes com la capacitat de matar específicament HSC senescents a través de la secreció de IFN $\gamma$  o la inducció de parada de cicle cel·lular i apoptosi amb IL15. Aquest efecte, però, es pot veure contrarestat per els limfòcits T CD4<sup>+</sup> que poden interaccionar amb les NK i suprimir-les promovent la supervivència de les HSC activades <sup>49</sup>. Els limfòcits B promouen la formació de fibra <sup>50</sup>. Els limfòcits *natural killers* (NKT) difereixen amb les NK en que aquestes últimes són cèl·lules grans granulocítiques, són les úniques cèl·lules del sistema immunitari amb un fenotip definit com a protector davant de les diferents malalties o danys hepàtics però les dues tenen capacitat citotòxica. Les NKT poden reconèixer antígens de lípids i estan especialment presents als compartiments microvasculars del fetge. Poden tenir papers pro-inflamatoris o anti-inflamatoris i son importants per a definir el microambient de la subseqüent resposta immunitària, s'ha vist que hi ha dos subgrups amb papers oposats <sup>51</sup>. Els limfòcits T CD8<sup>+</sup> poden escanejar la superfície de les cèl·lules en la cerca d'antígens externs o estranys i procediran amb la lisi directa, tenen també capacitat de detectar cèl·lules tumorals de manera efectiva. Degut a la seva eficàcia eliminant hepatòcits danyats, hi ha uns nivells de control estrictes que redueixen la presència d'aquest tipus cel·lular i permeten l'estat de tolerància. El mecanisme principal d'eliminació del component immunitari quan ja s'ha resolt el dany, és per esgotament amb la presentació de PD-1 (receptor de mort programada) i el seu lligand PDL-1 així com TIM-3 <sup>52</sup>.

### 3.2.1.3. Cèl·lules estrellades hepàtiques

Les cèl·lules estrellades hepàtiques (HSC) són cèl·lules mesenquimàtiques vitals per a la funcionalitat i desenvolupament del teixit hepàtic així com en la resposta a dany i la regeneració del teixit. Es troben situades a l'espai sub-endotelial entre el domini basolateral dels hepatòcits i la cara anti-luminal de les LSEC (espai de Disse) i comprenen aproximadament el 15% de totes les cèl·lules no parenquimàtiques <sup>7</sup>. Tenen una estructura allargada amb un nucli ovalat i tenen protuberàncies o projeccions que li permeten allargar-se i contactar amb un major nombre de LSEC així com incrementar la seva sensibilitat a senyals quimiotàctics i desenvolupar forces contràctils <sup>53</sup>. Quan les HSC s'activen es tornen més allargades i els orgànuls per a la producció de proteïnes com el Golgi i el reticle endoplasmàtic rugós incrementen la seva mida. Normalment romanen en estat quiescent

però davant de l'estímul adequat de les cèl·lules adjacents, comencen a proliferar i pateixen una trans-diferenciació cap a miofibroblasts contràctils <sup>54</sup>.

### 3.2.1.3.1. Activació i formació de matriu extracel·lular

Els estímuls d'activació solen derivar de KC, hepatòcits, plaquetes, leucòcits i LSEC però el rang de cèl·lules i senyals implicades és molt ampli com mostra la **Figura 7**. Les citoquines més abundants provenen de les KC com són TGFβ, IL1, TNF, ROS i peroxidases derivades dels lípids. Aquestes últimes però, són majoritàriament secretades per els hepatòcits quan

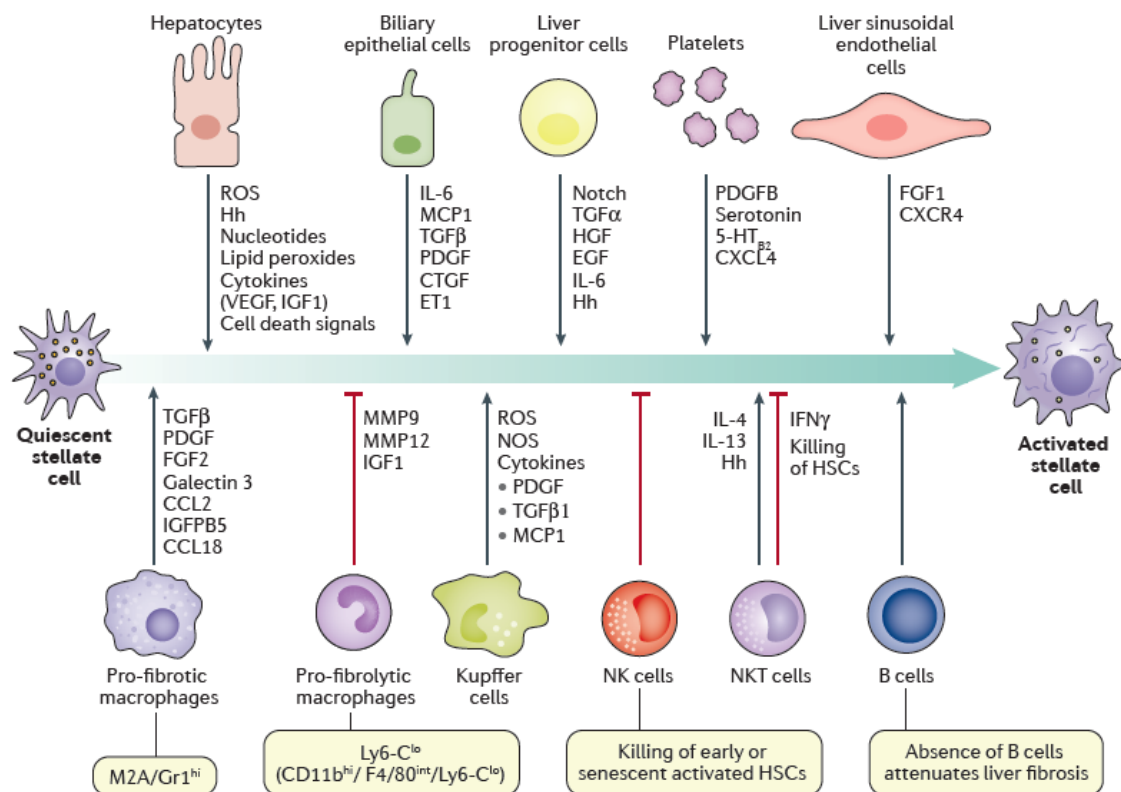


Figura 6. Mecanismes involucrats en l'activació de les HSC (extret de Tsuchida & Friedman 2017)

el fetge està malalt. Les plaquetes secreten factors de creixement pro-fibrogenics com PDGF, TGFβ i EGF. Els neutròfils són una important font de ROS i els limfòcits de citoquines pro-fibrogèniques <sup>55</sup>. El factor de creixement endotelial vascular (VEGF) també indueix la proliferació de les HSC a part de l'angiogènesi del parènquima i és alliberat per les LSEC i les HSC, tot i així, és sabut que juga un paper dual ja que a la vegada que activa les HSC, és necessari per a la resolució de la fibrosi <sup>44</sup>. Diversos estudis mostren la importància d'altres factors en l'activació de les HSC i l'inici de processos fibrogenics com és el cas de STAT3 <sup>56,57</sup>. Una vegada les HSC han fet la seva funció, poden revertir a un estat quiescent o esdevenir senescents o apoptòtiques. Les funcions principals de les HSC són la secreció de laminina, proteoglicans i col·lagen de tipus IV per a formar estructures semblants a membranes basals que donen suport al teixit. El col·lagen, que conté glicina, lisina i prolina

se sintetitza en un primer moment com pre-col·lagen<sup>58</sup>. Per a que es formin les fibres de col·lagen madur caldrà que maduri al reticle endoplasmàtic formant estructures amb forma de triple hèlix i ser posteriorment tallat per peptidases a l'espai extracel·lular per a convertir-se en estructures insolubles que tindran tendència a combinar-se per a formar les fibres<sup>59</sup>.

Les HSC no només tenen capacitat de generar ECM sinó que amés poden inhibir l'activitat de les metal·loproteases (MMP) de matriu amb la secreció d'inhibidors (TIMP) tals com adamalises i meprines<sup>60</sup>.

Una de les característiques més úniques de les HSC és l'emmagatzemament de vitamina A (àcid retinoic) al seu citoplasma en forma de gotes lipídiques (LD) quan es troben en estat quiescent. La quantitat i distribució d'aquestes gotes varia en funció de l'espècie i l'estat del teixit. Aparentment, és un tret vital que s'ha mantingut al llarg de l'evolució com a un recurs energètic<sup>61</sup>. Quan s'activen, perden la capacitat d'emmagatzemar àcid retinoic i passen a proliferar, contraure's i generar components de la matriu extracel·lular<sup>54</sup>.

És important tenir en compte però, que les cèl·lules estrellades són molt heterogènies i això les fa difícils de distingir: poden presentar o no desmina, podem trobar alguna sense vitamina A i el millor marcador fins ara  $\alpha$ -SMA (sisena isoforma de l'actina) s'expressa també a les cèl·lules musculars que envolten els vasos<sup>62</sup>. Les HSC poden induir el reclutament de leucòcits mitjançant la producció de citoquines i receptors d'aquestes tals com CCL2, CCL21, CCL5 i CCR5. Poden funcionar també com a cèl·lules presentadores d'antigen estimulants la proliferació dels limfòcits o la seva apoptosi. També poden atraure neutròfils. Tenen amés, la capacitat d'expressar TLR4 i per tant d'interaccionar amb LPS (lipo-polisacàrids) i activar les vies de JNK i NF- $\kappa$ B<sup>7</sup>.

### 3.2.1.3.2. Metabolisme

Els canvis que tenen lloc en una HSC per a permetre la sortida de quiescència són principalment canvis metabòlics.

El retinol o àcid retinoic (RA) és necessari per a la vista, l'embriogènesi, la diferenciació cel·lular, el manteniment dels epitelis i moltes altres funcions. L'obtenim de la dieta i és retingut a les HSC en forma de LD després de ser captats pels enteròcits a l'intestí i hidrolitzats als hepatòcits. La proteïna d'unió a retinol (RBP) transporta el retinol a les HSC i allà es converteix en esters de retinil a partir d'una acil-transferasa leicitin:retinol (LRAT), les HSC quiescents expressen elevades quantitats de RBP i LRAT. Si el cos té demandes de retinol, aquests LD emmagatzemats són hidrolitzats i reenviats als hepatòcits des dels quals se secretaran a la sang però els LD de retinoic de les HSC són majorment catabolitzats<sup>63-65</sup>. Tot i que el paper del RA en la fibrosi no està del tot clar, si que s'ha vist que l'exposició de les HSC activades a RA reverteix el fenotip cap a quiescent i promou la parada del cicle cel·lular<sup>61</sup>. Alguns estudis suggereixen que tot i que no es pot dir que reverteixi de manera directa la fibrosi, l'absència de LD de retinol a les HSC pot disminuir la carcinogènesi al fetge<sup>66</sup>.

Els canvis metabòlics que pateixen les HSC són semblants al canvis que pateixen les cèl·lules canceroses ja que l'objectiu comú és activar la proliferació, els processos de biosíntesi i la producció de citoquines que alteren el microambient extracel·lular <sup>67</sup>. Aquests canvis metabòlics es resumeixen en el conegut efecte Warburg que consisteix en la conversió de glucosa a través de la glicòlisi aeròbica per a l'obtenció d'energia independentment de la presència d'oxigen i tot i que el rendiment energètic sigui inferior. També es produeix una gran quantitat de lactat derivat de la fermentació de la glucosa que serà utilitzat per a la generació de biomassa, modificar el microambient i reprogramar el metabolisme de HSC veïnes. El procés de glicòlisi permet l'alliberament de molts àtoms de carboni disponibles per a la biosíntesi necessària per a la proliferació <sup>68</sup>. Aquest canvi de metabolisme genera addicció a la glutamina que requerirà que les cèl·lules tinguin la necessitat de captar-ne més per a tenir prou nitrogen per a la biosíntesi, el manteniment de l'homeòstasi redox i el cicle de Krebs i que conduirà a una activa glutaminòlisi. L'activitat glutaminolítica permet l'anaplerosi necessària per a suplir la demanda elevada de vies bioenergètiques i biosintètiques per a adquirir el fenotip miofibroblàstic <sup>69</sup>.

L'activació de les HSC i la fibrogènesi determinen l'inici del canvi metabòlic i les vies més implicades inclouen TGF $\beta$ , PI3K/AKT, MAPK, Hedgehog (Hh), HIF1 $\alpha$ , i Wnt <sup>54</sup>. En aquest sentit, cal destacar el treball del nostre laboratori sobre el paper de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-3 (PFKFB3) en l'activació de les estrellades i el metabolisme <sup>70</sup>. PFKFB3 i la glicòlisi incrementen a les HSC activades i això va seguit d'un increment en marcadors de fibrosi. Amés, PFKFB3 està regulada a nivell traduccional per CPEB4.

Els reactius lliure d'oxigen (ROS) i els del nitrogen (RNS) són produïts per les HSC i juguen un paper clau en la seva activació, proliferació i apoptosi i són productes dels processos metabòlics que tenen lloc en l'activació de les HSC <sup>62</sup>.

#### 3.2.1.4. Cèl·lules endotelials sinusoidals hepàtiques

Les cèl·lules endotelials sinusoidals (LSEC) són cèl·lules endotelials altament especialitzades que fan de barrera permeable entre la sang i els hepatòcits i representen al voltant del 15% de les cèl·lules hepàtiques. Són considerades les cèl·lules més permeables del cos de tots els mamífers i es caracteritzen per tenir fenestres i absència de diafragma i membrana basal. Amés, tenen una capacitat endocítica mes elevada que la resta de tipus cel·lulars humans que els permet, mitjançant l'activitat lisosomal, la neteja de productes de rebuig presents a la sang i el transport de molècules de mida elevada. Els receptors que li permeten tenir una endocitosis molt activa són els anomenats receptors *scavenger* (SR), el receptor de manosa i el receptor Fc gamma IIB2 <sup>71</sup>. Els receptors de manosa els hi atorguen capacitats de barrera immunitària per a la neteja bacteriana.

Són les principals encarregades de mantenir una pressió portal baixa independentment dels canvis al reg sanguini deguts a la digestió mitjançant la regulació del to vascular. També tenen la capacitat de regular altres tipus cel·lulars presents en el teixit, de fet tenen una

estreta relació amb les HSC; mantenen la quiescència d'aquestes per tal d'inhibir la vasoconstricció i el desenvolupament de fibrosi. Interaccionen amb les cèl·lules immunitàries i les plaquetes per a respondre davant de dany tissular i col·laboren en la resolució d'aquests <sup>72</sup>. En situacions patològiques, les LSEC es capil·laritzen i perden les seves propietats protectores promovent l'angiogènesi i la vasoconstricció de manera que juguen un paper important en el desenvolupament i progressió de la malaltia hepàtica.

Les seves fenestres estan organitzades en clústers i varien de mida i nombre depenent de la seva localització al fetge de manera que a les regions peri-portals són menys abundants però més grans i a les regions centrilobulars són més abundants i més petites <sup>73</sup>. Amés, tenen la capacitat de variar de manera dinàmica adaptant-se a l'estat de nutrició i salut de l'organisme. Una explicació per aquesta distribució seria la disminució progressiva de l'oxigen al llarg del lòbul que incrementa la necessitat d'intercanvi amb la sang però també podria tenir relació amb la maduresa de les LSEC al llarg del lòbul. El citoesquelet juga un paper essencial en la formació de fenestres i estudis demostren que VEGF es un factor important en la regulació d'aquestes <sup>5,73</sup>.

En estat fisiològic, les LSEC retenen els eritròcits mentre que altres components de la sang entren a l'espai de Disse. Les molècules petites i els gasos difonen lliurement a través de les fenestres i les grans ho fan mitjançant la formació de porus a la membrana de les LSEC.

Les LSEC es troben normalment en un estat quiescent amb vides llargues i baix nivell de proliferació, tot i així, han de ser renovades per al manteniment de la funcionalitat del teixit. Les fonts de les que procedeixen aquestes noves LSEC són altres LSEC madures, LSEC progenitores residents o intra-hepàtiques, o progenitores derivades del moll d'os, aquestes últimes rarament participen en la renovació de les LSEC al fetge sa però són les que lideren el procés davant d'un dany. VEGF i FGF són alguns dels factors que estimulen la renovació de les LSEC <sup>74</sup>.

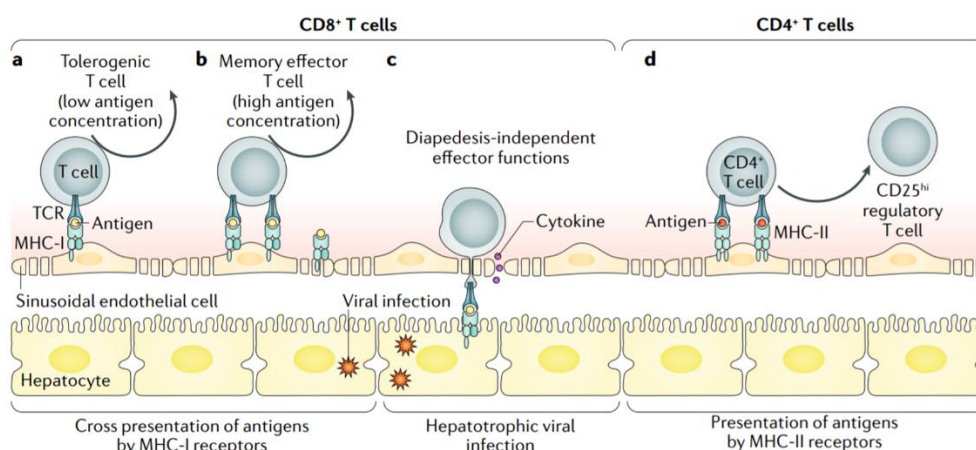
Una característica única de les LSEC és la seva capacitat de reaccionar davant de l'estrès mecànic que suposa la força física del fregament o fricció del reg sanguini <sup>1</sup>. Aquesta força depèn de la intensitat de la circulació però també de la viscositat de la sang i al radi cúbic del vas <sup>73</sup>. L'endoteli té la capacitat de secretar factors vasodilatadors o vasoconstrictors per a regular la pressió sanguínia i la manca d'aquesta capacitat s'anomena disfunció endotelial. Un dels factors principals involucrat en la resposta a l'estrès per fricció és el factor Kruppel 2 (KLF2) que incrementa la secreció de factors vasodilatadors com l'òxid nítric (NO) per part de les LSEC a través de l'activació de la sintetasa endotelial d'òxid nítric (eNOS) <sup>75,76</sup>. També inhibeixen factors vasoconstrictors com l'endothelin-1 o mantenen les HSC en quiescència evitant el seu efecte constrictor de sinusoides quan es troben actives <sup>77</sup>.



### 3.2.1.4.1. LSEC, les portes de la immunitat al fetge

Les cèl·lules que formen el sinusoides han de tenir la capacitat de diferenciar entre les molècules nocives i aquelles inofensives. Per a això, presenten com a primer pas crític l'habilitat d'activar la resposta immunitària innata com són els receptors TLR per al reconeixement de LPS i la neteja de patògens microbians <sup>78</sup>. També contenen tota una col·lecció d'altres receptors caçadors que fan a aquestes cèl·lules excepcionals i que destaquen el seu paper a la inflamació del fetge. Expressen ICAM-1/3 (LSIGN) i la proteïna vascular d'adhesió 1 (VAP-1) que permeten l'adhesió de leucòcits i la seva migració transendotelial. Amés, tenen la capacitat de modular el comportament de la resposta immunitària adaptativa mitjançant l'activació de limfòcits cap a tolerants induint l'expressió de CD8<sup>+</sup> o induint la diferenciació de les Tregs cap a immunosupressores <sup>79,80</sup>.

#### A. PRESENTACIÓ D'ANTÍGEN



#### B. RECLUTAMENT DE LIMFÒCITS

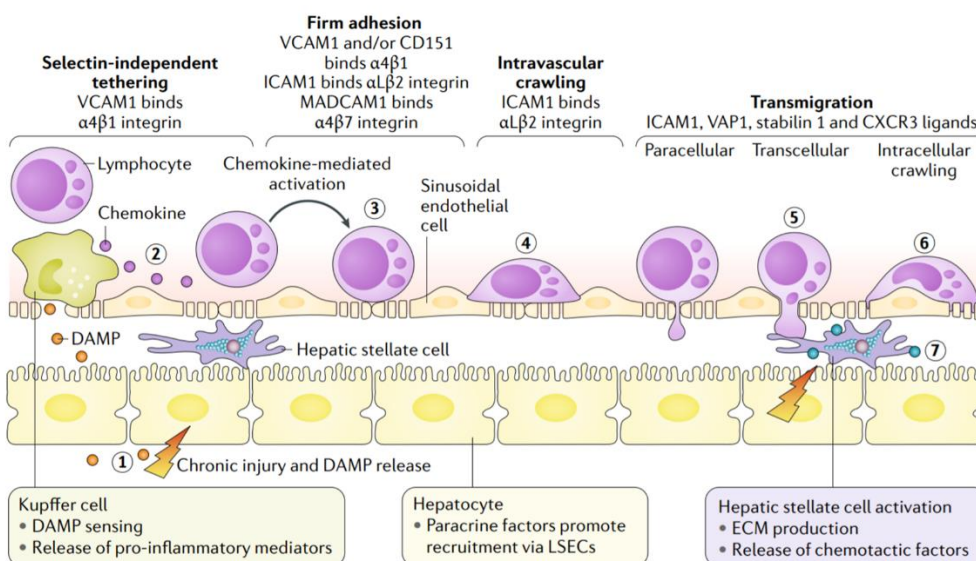


Figura 7. Paper de les LSEC en la resposta immunitària adaptativa i innata (extret i modificat de Shetty et al, 2018)

Altres receptors s'han estudiat com stabilin-1, stabilin-2, CD32, SRB1 i lectines de tipus C, aquestes últimes molt reconegudes per el seu paper davant d'infeccions per Èbola, HIV i HCV.

Podríem dir llavors que a part de ser la primera barrera cap a l'interior del parènquima que permet la resposta immunitària, també tenen capacitat de modular la resposta immune que circula per el sinusoides amb la seva capacitat presentadora d'antigen. La reacció de tolerància activant les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> la duen a terme amb l'increment d'expressió del lligand 1 per a la mort programada (PDL1) que activa els receptors PD1 a les cèl·lules T nadiues. El canvi a resposta efectiva i no tolerant permetent el canvi de les cèl·lules T cap a efectores, és a través del receptor de cèl·lules T activades (TCR) que pot sobrepassar la resposta mediada per PD1. En aquesta canvi de tipus de resposta hi estan involucrades les interleuquines IL2 i IL6<sup>81,82</sup>. Estudis han demostrat també el paper de les LSEC en l'expressió del complex d'histocompatibilitat II (MHC II) i el desenvolupament de cèl·lules T CD4<sup>+</sup><sup>83</sup>. Quan les LSEC no estan estimulades, expressen nivells baixos de quimioquines, però quan s'estimulen poden expressar CXCL9-CXCL11, CCL25, CX<sub>3</sub>CL1 i CXCL16.

### 3.3. Patologia del fetge

La malaltia crònica del fetge (CLD) és un problema important a la salut mundial ja que hi ha més de 800 milions de persones afectades i la mortalitat és d'aproximadament 2 milions d'individus a l'any<sup>84</sup>.

Les diferents malalties que pateix el fetge tenen lloc en diferents etapes de desenvolupament i les causes principals són l'obesitat, l'alcohol, la diabetis i les infeccions virals<sup>85</sup>. La malaltia evoluciona des de fetge gras (NAFL) ja sigui per alcohol (AFLD), o per altres causes relacionades amb la dieta, problemes metabòlics o malalties genètiques (NAFLD) cap a fibrosi que en estats avançats serà considerada cirrosi i pot en alguns casos derivar a càncer de fetge. El carcinoma hepatocel·lular pot créixer en fetges afectats per patologies amb etiologies diverses, però acostuma a ser l'última etapa de la malaltia després de la cirrosi<sup>86</sup>

#### *Figura 8.*

El risc de malaltia hepàtica incrementa amb l'edat i la seva incidència és diferent segons el sexe de manera que és més comú en homes amb edats a partir dels 50-60 anys<sup>87</sup>.

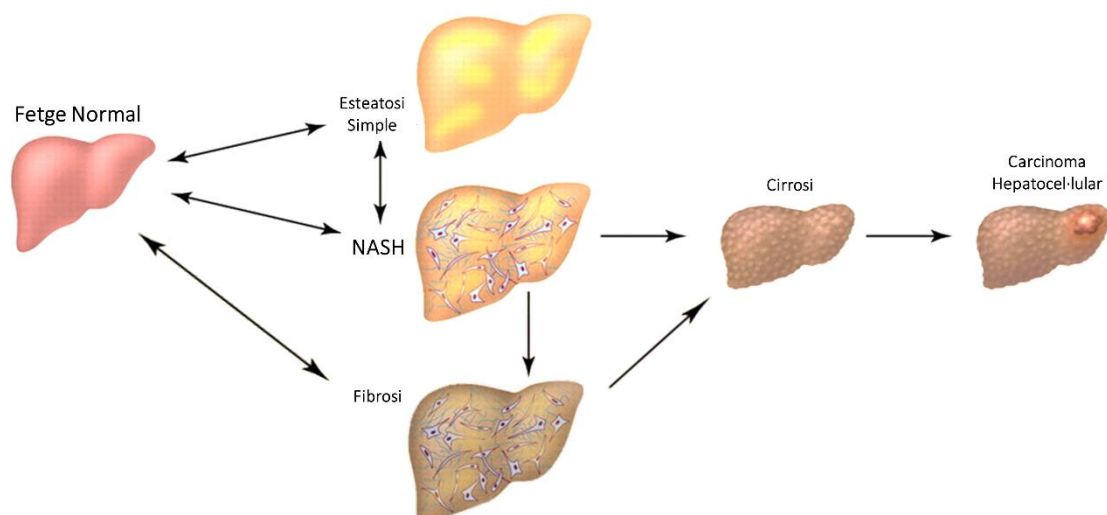


Figura 8. Progressió de la malaltia hepàtica (extret i modificat de Hobbs et al., 2011)

### 3.3.1. NAFLD i NASH

La malaltia del fetge no alcohòlica (NAFLD) i la malaltia del fetge alcohòlica (AFLD) es diferencien en la seva etiologia, però comprenen el primer pas de la malaltia hepàtica que consisteix en l'acumulació de triglicèrids als hepatòcits. Sovint la causa més comú és la resistència a insulina i l'obesitat. L'acumulació excessiva de lípids altera la funcionalitat dels hepatòcits i promou la inflamació del teixit que es traduirà en l'avenç de la malaltia i el desenvolupament d'esteato-hepatitis no alcohòlica (NASH) <sup>88</sup>. Podem diferenciar entre NAFL que seria simplement acumulació de greix al fetge, i NASH, que seria l'aparició d'esteato-hepatitis. Aquesta diferència radica en que mentre que NAFL es caracteritza per la presència de greix en més d'un 5% del parènquima sense necessitat de dany als hepatòcits, el NASH comprèn alteracions necro-inflamatòries en el que els hepatòcits pateixen un dany intens en un microambient d'esteatosi <sup>89</sup>.

Hi ha quatre processos principals encarregats de mantenir l'homeòstasi dels lípids que es veuen afectats en NAFLD aquests son: l'absorció de lípids circulants, la lipogènesi de *novo* (DNL), l'oxidació d'àcids grassos (FAO) i l'exportació en VLDL **Figura 9**. En estat patològic, l'absorció i el DNL es veuen incrementats mentre que l'elevació de FAO no és suficient per a compensar el dany <sup>90</sup>.

Les conseqüències principals del NAFLD són una desregulació del control de la ingesta que sol resultar en una sobrealimentació, disbiosi i disfunció intestinal, resistència a insulina, secreció anormal d'adipoquines i hormones gastrointestinals i activació de factors pro-inflamatoris. A mida que la malaltia evoluciona cap a NASH, aquests mecanismes adquireixen importàncies diferents. Es considera que el desenvolupament d'aquesta malaltia requereix dos *hits* o cops: acumulació de TAG primer i acumulació d'estrès

oxidatiu (ROS) després. Aquest segon hit té, però, processos variats involucrats que inclouen la resistència a insulina, la peroxidació de lípids, inflamació i estrès del reticle endoplasmàtic <sup>91</sup>.

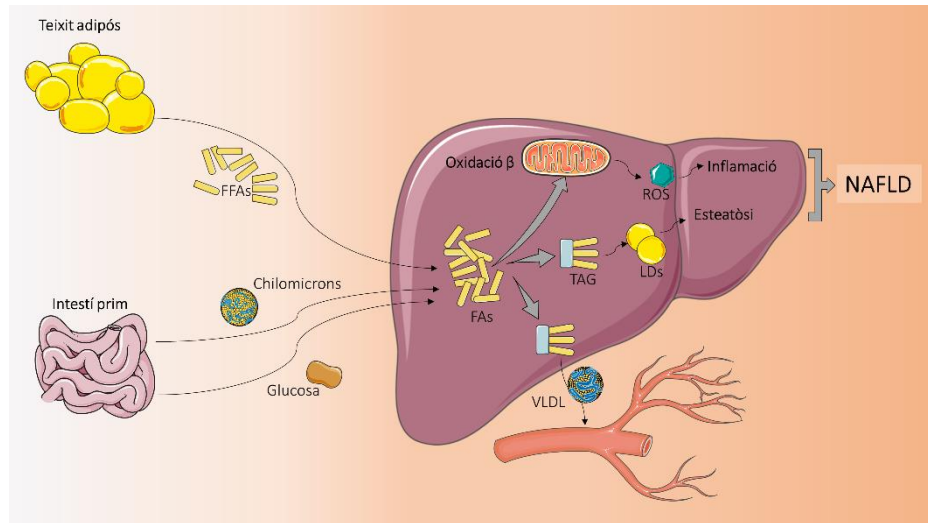


Figura 9. Processos involucrats en l'acumulació de greix al fetge i el desenvolupament de NAFLD. FFAs: àcids grassos lliures, FA: àcids grassos,

El NAFLD representa la causa més comú de malaltia al fetge als països occidentals i s'està difonent a tots els països desenvolupats amb una prevalença del 25% en adults creixent en paral·lel amb la incidència de diabetis i obesitat <sup>92</sup>. Fins ara, el millor mètode de diagnosi més utilitzat requereix biòpsia i la patogènesi és complexa, multifactorial i involucra factors genètics, metabòlics i mediambientals. Altres mètodes no invasius serveixen per a fer una valoració de l'estat del fetge i també són utilitzats de manera generalitzada: triglicèrids, gamma-glutamil transferasa, insulina, amino-transferases en sèrum, però també la circumferència de la cintura, el BMI, presència de síndrome metabòlic o diabetis de tipus 2 <sup>93</sup>.

Tot els tipus cel·lulars del fetge juguen un paper en l'esteatosi, i en especial les HSC ja que l'acumulació de greix als hepatòcits promou la seva activació a través de la producció incrementada de  $TGF\beta$ . La saturació de triglicèrids als hepatòcits contribueix a la producció de factors lipotòxics que provocaran la mort cel·lular derivada de disfunció mitocondrial i acumulació de ROS. Això s'ha demostrat amb el tractament d'hepatòcits en cultiu amb àcid palmític que no només indueix apoptosi sinó que activa la secreció d'exosomes que activen directament les HSC <sup>54,94</sup>. Altres tipus cel·lulars importants pertanyen al sistema immunitari com són els limfòcits CD8+T i les NKT que estimulen la reprogramació metabòlica dels hepatòcits i indueixen un fenotip secretor de citokines que ajuden a l'establiment de NASH i HCC. En aquest sentit, les plaquetes també contribueixen a l'establiment de fetge gras, principalment la càrrega, l'activació i l'adhesió d'aquestes provoquen l'activació de la resposta immunitària a través de la seva interacció amb les KC i el conseqüent reclutament de limfòcits T citotòxics <sup>95</sup>.

Així doncs, en un estat patològic amb NAFLD trobaríem un increment de citoquines inflamatòries com TNF $\alpha$ , interleuquines com IL1 $\beta$ , IL6 al fetge tot promovent l'activació de KC, HCS i les cascades inflamatòries que duren al desenvolupament de fibrosi <sup>91</sup>.

### 3.3.1.1. L'obesitat i el fetge gras

La incidència de l'obesitat incrementa de manera preocupant a la cultura occidental a on es consumeix una dieta molt rica en greixos i carbohidrats. La incidència de NAFLD és del 10% superior en persones amb sobrepès i de fet es creu que en els pròxims 20 anys pot ser la principal causa de morbiditat i mortalitat relacionades amb el fetge així com la causa més comú de transplantament de fetge.

El teixit adipós és molt actiu a nivell endocrí i produeix hormones i citoquines de manera continuada, són les anomenades adipoquines o adipocitoquines. Aquestes adipoquines tenen la capacitat de modular la inflamació, les interaccions immunitàries i la resistència a insulina. En aquest sentit, l'adiponectina i la leptina juguen papers protectors en l'esteatosi i la síntesi de triglicèrids; l'adiponectina amb un efecte invers i la leptina incrementant en paral·lel amb la malaltia. Estan alterades en NAFLD de manera que la producció d'adiponectina està molt reduïda i la de leptina molt elevada <sup>91</sup>. Les regions d'emmagatzematge de greixos són anomenades *fat depots*, aquests es troben fora del fetge envoltant els òrgans vitals, al peritoneu, les gònades i el mesenter, o també a nivell subcutani i poden contribuir a agreujar la malaltia hepàtica. Els *fat depots* viscerals drenen el seu contingut a la vena porta i per tant al fetge, de manera que contribueixen al dany hepàtic incrementant la quantitat d'àcids grassos lliures i citoquines pro-inflamatòries.

La dieta és responsable de l'acumulació del 15% de triglicèrids totals del fetge en NAFLD <sup>96</sup>. Se sap però, que més que el consum de greix, els carbohidrats són els principals responsables del desenvolupament de NAFLD ja que proporcionen acetyl-CoA per a l'entrada al cicle de Krebs que proporciona l'esquelet per a la formació dels triglicèrids. I en aquest sentit, la fructosa és més perjudicial que la glucosa. S'ha demostrat l'eficàcia de canvis en la dieta i l'increment d'exercici físic pel que fa a la disminució de marcadors de dany hepàtic i inflamació. L'obesitat pot derivar en resistència a insulina. La insulina estimula el consum de glucosa i per tant l'acumulació de greix sobretot al múscul, el teixit adipós i el fetge. Si hi ha resistència a insulina, la lipasa sensible a hormones no és suprimida i el teixit adipós secreta àcids grassos a la circulació que s'acumularan al fetge i al pàncreas <sup>93</sup>.

No hem d'oblidar el paper de l'eix fetge-intestí que juga un paper més que destacable en el desenvolupament de malaltia al fetge i càncer en un context d'obesitat. Les alteracions en la microbiota intestinal derivades de l'obesitat incrementen els nivells d'àcid deoxicòlic (DCA), un metabòlit bacterià que causa dany al DNA. Amés, el DCA induïx un fenotip secretor senescent en les HSC que contribuiran a generar un ambient inflamatori pro-tumoral al fetge <sup>97</sup>.

Molts estudis han descrit la relació de l'obesitat amb el desenvolupament de càncer de fetge i entre ells destaca l'estudi realitzat pel grup de recerca d'en Michael Karin que demostra com la inflamació derivada de l'obesitat, indueix l'expressió de citoquines com IL6 i TNF que activen l'expressió de l'oncogen STAT3 i amb aquest, els processos oncogènics <sup>98</sup>. També s'ha vist que alteracions en el metabolisme dels lípids modifiquen la infiltració de cèl·lules inflamatòries al tumor de manera que les cèl·lules TCD4+ i les CD8+ no fan la seva funció d'immunovigilància anti-tumoral <sup>42</sup>.

### 3.3.2. Fibrosi

La progressió de la CLD, independentment de l'etiologia, es caracteritza per un dany parenquimàtic crònic així com per una activació continuada de senyals inflamatòries que porten a una activació de la fibrogènesi per a intentar resoldre el dany (*wound healing*). Així doncs, el procés de fibrosi té com a principal objectiu la regeneració del teixit hepàtic després d'un dany i es caracteritza per l'acumulació de teixit connectiu a la matriu extracel·lular (ECM) sintetitzat per els fibroblasts del fetge (HSC).

El problema o malaltia esdevé quan el dany és crònic i els processos de fibrogènesi s'allarguen en el temps generant un excés de matriu extracel·lular que alterarà la funcionalitat del teixit <sup>60</sup>. Llavors, el dany hepàtic s'acumula de tal manera que condueix a una disfunció del teixit que es veurà reflectit en secreció alterada de proteïnes del sèrum o factors de coagulació així com descontrol de glicèmia, metabolisme d'aminoàcids, secreció biliar i colèstasi <sup>99</sup>. En el procés de colèstasi substàncies que normalment son secretades del fetge a través de la bilis, s'acumulen i promouen un ambient tòxic que indueix apoptosi als hepatòcits cosa que promourà l'activació de les HSC des d'un fenotip quiescent a un de miofibroblàstic acumulant matriu extracel·lular de manera excessiva. La fibrosi va normalment acompanyada d'alteracions en l'arquitectura del teixit, infiltració immunitària, reducció d'elasticitat i deteriorament de l'estructura i funcionalitat de l'òrgan. L'estat de sobre activació de fibrogènesi, però, és reversible si l'estímul que causa el dany desapareix <sup>9,54</sup>.

Quan aquesta malaltia es troba en estats molt avançats i no reversibles, passa a anomenar-se cirrosi i es caracteritza per la formació de nòduls a on el teixit sa es troba envoltat per teixit connectiu <sup>61</sup>. L'activació del component immunitari i altres tipus cel·lulars del fetge com les HSCs i les LSECs donen lloc a l'acumulació de fibra extracel·lular (col·lagen i altres components de la matriu) conduint d'aquesta manera a fibrosi hepàtica que, amb la persistència dels estímuls, evolucionarà cap a cirrosi degenerant tot el funcionament i homeòstasi del teixit i generant un ambient propici per al desenvolupament de càncer.

Els reactius lliures d'oxigen són un factor important en la inducció de fibrosi i en totes les etapes del desenvolupament de la malaltia hepàtica. Els ROS i l'estrès oxidatiu causen dany als hepatòcits que derivarà en mort cel·lular i senyalització inflamatòria que activarà les HSC. De fet, l'alteració de la senyalització redox com disfunció mitocondrial o les oxidases NAPDH, és considerada una diana interessant per al tractament de la fibrosi <sup>100</sup>. De la

peroxidació de lípids per part dels hepatòcits o cèl·lules immunitàries activades també en deriven altres radicals oxidatius com els 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE). Els HNE col·laboren en la perpetuació de dany i mort cel·lular i l'activació de cèl·lules i senyals pro-fibrogèniques <sup>101</sup>.

L'angiogènesi és un procés estretament relacionat amb la fibrogènesi, ja que s'estimulen mútuament, contribuint a l'evolució de la malaltia a través de les LSEC i la seva secreció angiocrina; factors paracrins produïts per les cèl·lules endotelials que mantenen l'homeòstasi del teixit així com l'equilibri de l'auto-renovació cel·lular, la diferenciació de les cèl·lules mare i que poden afavorir la regeneració del teixit però també el creixement de tumors. Les LSEC sota situacions fisiològiques tenen activa la via del CXCR7-Id1 que produeix factors angiocrins de regeneració però davant de dany crònic, aquesta via queda inhibida i s'activa la del CXCR4 que és pro-fibrogenica <sup>102</sup>. En la relació entre angiogènesi i fibrogènesi també hi intervenen les HSC ja que produeixen factors com VEGF del que elles mateixes en tenen receptor (VEGFR2). Formen un *loop* positiu d'auto-activació que contribueix a l'activació de l'angiogènesi patològica amb la formació de vasos mals formats que agreujaran la malaltia a través de l'increment de zones hipòxiques que desproveiran als hepatòcits d'oxigen i nutrients amb la conseqüent necrosi hepàtica, increment d'inflamació i amplificació del dany hepàtic.

Altres components del teixit afecten a l'avenç de la fibrosi com són els TIMPS anomenats en apartats anteriors. Durant la CDL, aquests incrementen la seva expressió i els encarregats de remodelar la matriu extracel·lular no ho poden fer de manera eficient. Amés, hi ha un reemplaçament de col·lagen IV per col·lagen I i III fibril·lar a l'espai de Disse que promourà l'activació de les HSC i a la capil·larització dels sinusoides. La formació dels septes fibròtics marcaran el precedent de l'inici de la cirrosi <sup>101</sup>.

Ja que la fibrosi fomenta l'estat crònic d'inflamació i és el procés que permet l'avenç de la malaltia i la degeneració del teixit, és una peça clau en la troballa de tractaments per la prevenció de cirrosi i càncer. Estudis han trobat alguna diana interessant que permet la reducció de la fibrogènesi com és el cas de STAT3 que en ser inhibit a les cèl·lules estrellades per una droga específica (HJC0123), aconseguia reduir el cicle cel·lular, incrementar l'apoptosi i reduir l'expressió de proteïnes com la fibronectina i el col·lagen tipus I i per tant, disminuint les propietats fibrogèniques <sup>57</sup>. La inhibició de vies metabòliques que activen les HSC també és una estratègia puntera que presenta potencial terapèutic. El nostre grup ha demostrat l'eficàcia de la inhibició de PFKFB3 fent servir un antagonista anomenat 3-(3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propè-1-ona (3PO). En inhibir la glicòlisi, la gravetat de la fibrosi es veia reduïda en experiments amb HSC humanes, de rata i de ratolí <sup>70</sup>.

### 3.3.3. Cirrosi

La cirrosi és el factor de risc més important per al desenvolupament de carcinoma hepatocel·lular i de fet sol ser la causa de mort més comú d'aquests pacients. La prevalença

de la cirrosi és de entre el 4,5 i el 9% a tot el món sent, molt probablement, una malaltia amb una subestima derivada de que molts pacients són asimptomàtics. El risc de mortalitat el trobem quan la cirrosi es descompensa o evoluciona cap a HCC, cosa que s'estima que succeeix en el 20-25% dels casos <sup>84</sup>.

La cirrosi és una CLD en estat molt avançat amb la presència de necroinflamació molt estesa per tot el teixit i que es caracteritza per l'alteració de l'estructura cel·lular del fetge de manera que es formen nòduls regeneratius de parènquima envoltats per septes fibròtics. També es caracteritza per canvis importants en l'arquitectura vascular de l'òrgan que poden donar lloc a hipertensió portal i complicacions relacionades com sagnat de varius, encefalopatia hepàtica, ascites, síndrome hepato-renal, i altres <sup>103</sup>. Afegit a tot això, la presència d'obesitat molt comú en aquests pacients, incrementa el risc de descompensació o aparició de HCC.

Pel que fa a l'arquitectura vascular alterada, parlem concretament de la defenestració de les LSEC i de l'aparició de membrana basal. Tant la defenestració com la capillarització del parènquima són promotors actius de la fibrosi que ajuden a establir un quadre de cirrosi.

Bàsicament, en a un fetge cirròtic hi trobaríem tots els mecanismes de la fibrosi presents de manera continuada i una disfunció hepàtica creixent. Algunes de les citoquines i factors principals involucrades en les complexes xarxes que orquestren les vies de senyalització que activen les HSC i la fibrogènesi són PDGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL1 i IL17 <sup>104</sup>. Altres tipus de molècules s'han vist involucrades en el desenvolupament de cirrosi com són els àcids ribonucleics microscòpics (miRNAs); petites seqüències de RNA capaces de regular la transcripció i la traducció de molts gens i poden jugar un paper en la fibrogènesi com són el miR-181b, miR-214-5p, miR-221, miR-222 i miR199a <sup>105-108</sup>.

### 3.3.4. Càncer de fetge

El càncer de fetge i en concret el carcinoma hepatocelular (HCC), acostuma a emergir en un context de malaltia crònica al teixit, és un procés que requereix diversos passos o *hits* per a evolucionar des de lesions pre-canceroses fins a càncer avançat. Té una incidència de 800.000 casos anuals a nivell mundial, és el 5è càncer més comú i la 2a causa més comú de mort per càncer <sup>84,109</sup>.

Al fetge hi poden haver diferent tipus de lesions carcinogèniques depenent del tipus cel·lular en el que s'inicia el procés. Podem parlar de càncer primari si s'inicia al teixit del fetge o càncer secundari si ha arribat al fetge des d'algun altre òrgan. En aquest cas ens centrarem en les lesions primàries.

Les lesions benignes són les més comuns degut al dany continu que pateix el teixit, aquestes no son canceroses i no acostumen a evolucionar a malignes, per tant no necessiten tractament. En podem trobar amb forma d'hemangioma, d'adenoma o d'hiperplàsia nodular.



El carcinoma hepatocel·lular o HCC és la forma més comú de càncer de fetge i deriva del principal tipus cel·lular del fetge que són els hepatòcits. És el més comú en pacients amb cirrosi o altres lesions hepàtiques com hepatitis B, C o abús del consum d'alcohol i és del que hi ha més investigació i informació enregistrada. La incidència és més elevada en homes que en dones i és més comú en persones d'edat avançada. El carcinoma fibrolamel·lar és un tipus poc freqüent de HCC que apareix en persones amb 20-30 anys i no està lligat a cap dany hepàtic conegut. Al 2010 la OMS va publicar una subclassificació morfològica que a part d'incloure el fibromel·lar, també inclou el cirròtic, carcinoma desdiferenciat, carcinoma semblant al limfo-epiteloma, i HCC sarcomatós <sup>110</sup>.

S'han diferenciat altres lesions tumorals al fetge en funció de l'origen cel·lular. El colangiocarcinoma és un càncer que s'origina als conductes biliars per on passa la bilis que ajuda al fetge a fer la digestió i l'angiosarcoma o hemangiosarcoma s'inicia a les cèl·lules dels vasos sanguinis. Aquest últim és poc comú i acostuma a aparèixer en persones d'edat molt avançada. També existeix l'hepatoblastoma, que pot tenir origen cel·lular divers i apareix en infants entre 0 i 3 anys, la causa és desconeguda <sup>111</sup>.

### 3.4. Carcinoma hepatocel·lular (HCC)

El carcinoma hepatocel·lular tal i com hem anomenat anteriorment, és un procés que té lloc en múltiples passos que suposen l'acumulació successiva d'alteracions moleculars requerides per a la conversió maligna. La supervivència mitjana del és de 6 a 20 mesos <sup>112</sup>. Curiosament, la incidència del càncer de fetge s'ha triplicat des de 1980 a escala mundial i es creu que l'obesitat epidèmica present a la societat actual n'és la major responsable. De fet al voltant del 80% de les persones amb obesitat presenten evidències de NAFLD. Aquesta obesitat i les seves conseqüències s'han convertit en un problema major que amenaça la salut de milions de persones a tot el món i la implementació de modificacions a l'estil de vida per a promoure la pèrdua de pes amb activitat física i dieta saludable consisteixen un repte d'interès general. La relació causal entre l'obesitat i el càncer de fetge és clara i té un gran impacte socio-econòmic ja que les complicacions que deriven del càncer de fetge acostumen a ser molt recurrents i requereixen moltes estades als hospitals derivat de la manca de tractaments efectius.

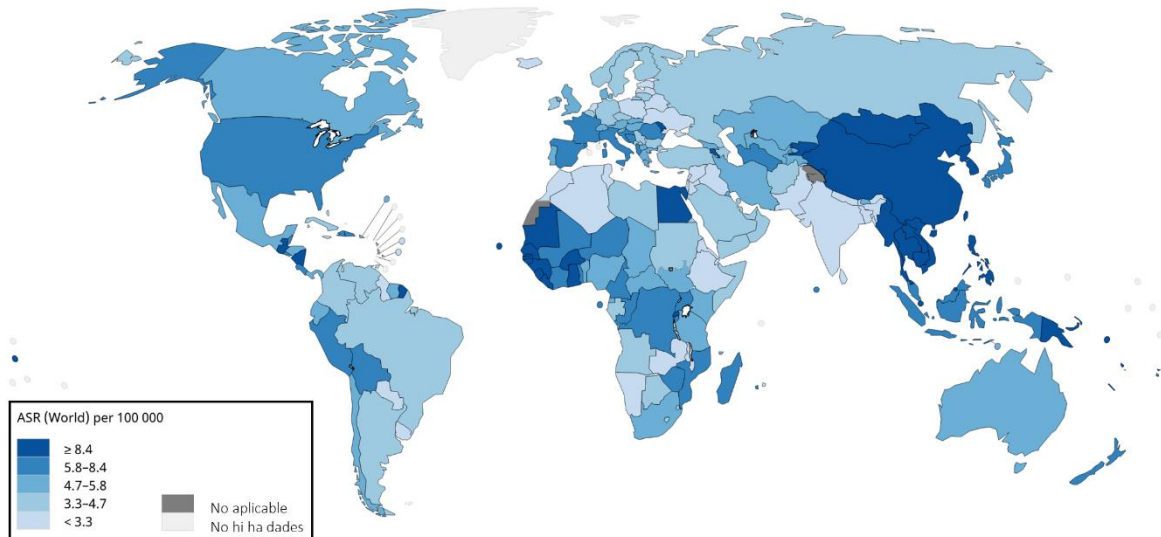
#### 3.4.1. Factors de risc

Els risc de desenvolupar càncer de fetge depèn de molts factors que inclouen l'edat, la genètica, el sexe, l'estil de vida i el medi ambient *Figura 10*.

La majoria de persones diagnosticades tenen edats per damunt dels 60 anys i això té sentit ja que en ser una malaltia que requereix dany acumulat, necessita temps per a establir un microambient propici per al desenvolupament del càncer. Tal i com hem descrit anteriorment, la cirrosi és el factor de risc més important per al desenvolupament de càncer

al fetge (sobretot HCC) independentment de la causa d'aquesta, que pot derivar d'infeccions víriques, consum d'alcohol, factors genètics, fetge gras o problemes biliars.

A. Estima de la incidència mundial de cancer de fetge al 2018 corregit per l'edat



B. Estima de la mortalitat mundial per cancer de fetge al 2018 corregit per l'edat

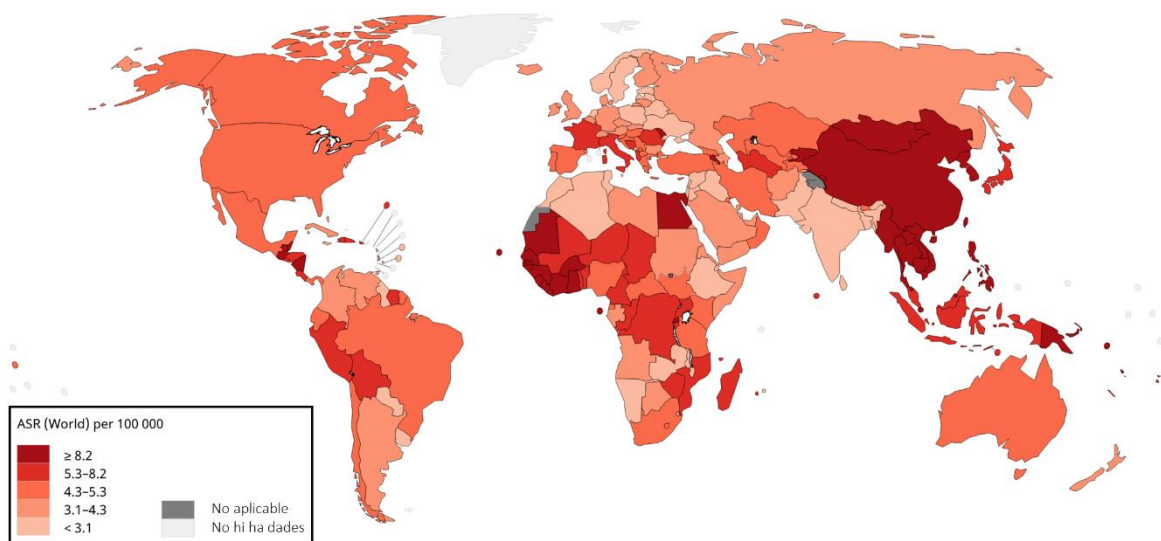


Figura 10. Estadístiques globals del càncer de fetge: incidència i mortalitat. Informació i gràfic extret de GLOBOCAN 2018: <https://gco.iarc.fr/today/home>.

Estudis epidemiològics defensen que les hepatitis virals B i C són la causa del 80% dels casos a tot el món <sup>113</sup>. HIV és també un virus que pot causar càncer de fetge ja que el cos es troba en un estat constant d'immunosupressió que no li permet defensar-se contra infeccions que poden ocasionar lesions al fetge.

Altres factors relacionats amb l'estil de vida occidental juguen un paper clau en l'increment d'incidència de HCC. Estudis han demostrat que el consum de tabac incrementa el risc de càncer de fetge així com molts altres tipus de tumors <sup>114</sup>. El sobrepès o l'obesitat també incrementen el risc ja que causen diabetis, síndrome metabòlic, NAFLD i NASH i manté l'organisme en un estat continu d'inflamació i dany <sup>115</sup>. El consum d'alcohol causa cirrosi i per tant incrementa el risc a les cèl·lules d'esdevenir canceroses, però també pot tenir un efecte directe causant mutacions al DNA de les cèl·lules del fetge i provocar una transformació maligna <sup>116</sup>.

Toxines que es troben al medi ambient o als productes que consumim com l'aflatoxina present en cacauets, blat, soja, mongetes, i arròs són hepato-carcinogèniques i incrementen la probabilitat d'aparició de HCC <sup>117</sup>. Agents químics com el vinil de clor que conforma el PVC o l'arsènic i el triclor-etilè també s'han estudiat i relacionat amb HCC.

### 3.4.2. Síntomes

El càncer de fetge, igual que la majoria de càncers, no és particularment dolorós almenys en els primers estadis. Hi ha alguns símptomes, però, que si poden suggerir que la persona té un tumor al fetge i aquests són: icterícia, mal a la part abdominal superior, pèrdua de pes inesperada i pèrdua de gana <sup>118</sup>.

Aquesta manca de dolor en els estadis primerencs, és la causa de que molts dels casos detectats es trobin en estat avançat i possiblement irreversible. De fet, sovint el càncer de fetge és detectat en els pacients que acuden a fer-se estudis rutinaris per altres motius com pot ser un altre tipus de càncer. Un escàner complet de tot el cos revelarà els llocs a on el càncer primari ha pogut metastatitzar. Molts dels pacients són diagnosticats massa tard.

### 3.4.3. Diagnòstic

Degut a l'increment de la incidència i de la gravetat dels casos detectats, és primordial invertir recursos en trobar mètodes de diagnòstic precoç.

Els nivells d'alfa-fetoproteïna (AFP) en sang és una de les mesures que es prenen en els pacients dels que se sospita la presència de càncer de fetge. AFP és un marcador tumoral elevat en el 60-70% dels pacients amb HCC i tots els pacients amb nivells elevats (>10ng/ml) haurien de ser escanejats amb ultrasons abdominals, tomografia computacional (CT) o una ressonància magnètica (MRI). Generalment la mesura del AFP es un bon indicador de malaltia si els nivells estan per damunt de 400 ng/ml però s'haurien de descartar falsos positius deguts a altres càncers. Els nivells d'AFP poden arribar a doblar-se cada 2-3 mesos i per això és recomanable mesurar els nivells cada 3 mesos en pacients de risc per HCC tot i que de rutina se sol monitoritzar cada 6 mesos en aquests pacients de risc <sup>119</sup>. La proteïna C reactiva és també utilitzada per a valorar el prognosi del pacient, estudis demostren que nivells >10mg/L poden indicar reducció de la supervivència i

increment de la recurrència <sup>120</sup>. Per a mesurar el dany hepàtic també s'analitzen els nivells de transaminases a la sang ALT i AST (ALT: alanina transaminasa, AST: aspartat transaminasa).

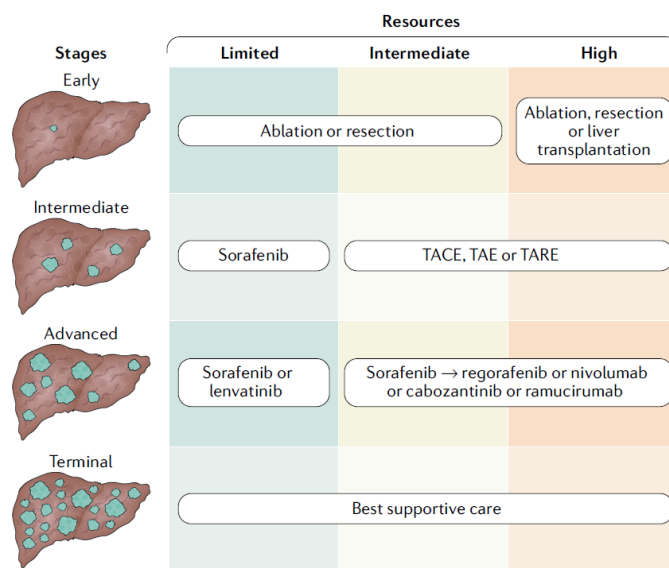
El diagnòstic radiogràfic per ultrasons abdominals, CT, MRI o angiografia depenen molt de l'equipament i l'experiència en la interpretació. Per a tumors més grans de 1cm la precisió en el diagnòstic es del 60-80% i incrementa amb la mida del tumor <sup>121</sup>.

El diagnòstic per biòpsia i estudi histològic està indicat quan el diagnòstic per altres mètodes no és clar. En aquests casos, hi ha unes categories definides per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) que estableixen uns tipus de HCC histològics en funció de l'organització estructural de les cèl·lules tumorals i també l'han caracteritzat i classificat en funció del nivell de diferenciació de les cèl·lules des de moderat a poc diferenciat. Altres mètodes de classificació han estat definits per entitats com la Unió Internacional Contra el Càncer (UICC) que es basa en el nombre de tumors, mida, invasió vascular i metastasi. És sempre important tenir en compte l'estat general del fetge a part de la lesió maligna ja que el tractament pot variar en pacients amb cirrosi molt avançada. Per a valorar la salut general de l'òrgan es mesura l'albumina al sèrum, la bilirubina, la protrombina, les ascites i l'encefalopatia. S'han descrit algunes molècules útils per a ajudar a la diferenciació d'una lesió maligna de benigna, sobretot quan la lesió aparentment no sembla haver-se desdiferenciat: CD34 mostrant capil·larització sinusoidal difusa, panell de glutamina sintetasa, glicpican-3, la proteïna de xoc per calor 70 o mesurar la reticulina ja que mentre que les lesions benignes en solen retenir, les malignes generalment en perden l'expressió <sup>110</sup>.

#### 3.4.4. Tractament

El HCC és molt difícil de classificar i és per definició molt heterogeni. Per aquest motiu, la teràpia dirigida que tan bons resultats ha donat amb altres tipus de càncer, és poc efectiva en fetge i les investigacions indiquen que és poc probable que es pugui aconseguir una teràpia amb una diana única per a tots els casos de HCC. Aquest tipus de càncer requereix teràpia personalitzada amb combinació de dianes terapèutiques. Tot i així, alguns dels gens més comunament mutats són: *TERT*, *TP53* o *CTNNB1* <sup>122</sup>.

El HCC primerenc pot ser tractat amb ablació local, resecció quirúrgica o transplantament de fetge. L'elecció del tipus de tractament depèn de les característiques del tumor, de l'estat i funcionalitat general del fetge, l'edat, comorbiditats, la disponibilitat d'aparells mèdics i l'experiència de l'especialista <sup>121</sup>. Per a pacients amb HCC en estadi intermedi es recomana el tractament mitjançant catèter dirigit a la regió d'interès o embolització trans-arterial (TACE) que consisteix en la injecció d'una gent citotòxic per l'artèria que alimenta el tumor <sup>121</sup>. Finalment, algunes drogues s'han utilitzat per al tractament de HCC avançat, un bon exemple és el Sorafenib, un inhibidor de tirosina quinasa 3 que a ofert resultats modestos, especialment en pacients amb hepatitis C. Altres exemples són Lenvatinib, Reforafenib, Cabozantinib i Nivlumab que han donat bons resultats com a tractaments de segona línia <sup>123</sup> **Figura 11.**



**Figura 11.** Estratègies terapèutiques per al tractament de càncer de fetge en funció de l'estat de la malaltia i dels recursos disponibles (extret de Yang et al, 2019).

### 3.4.5. Mecanismes moleculars involucrats en HCC

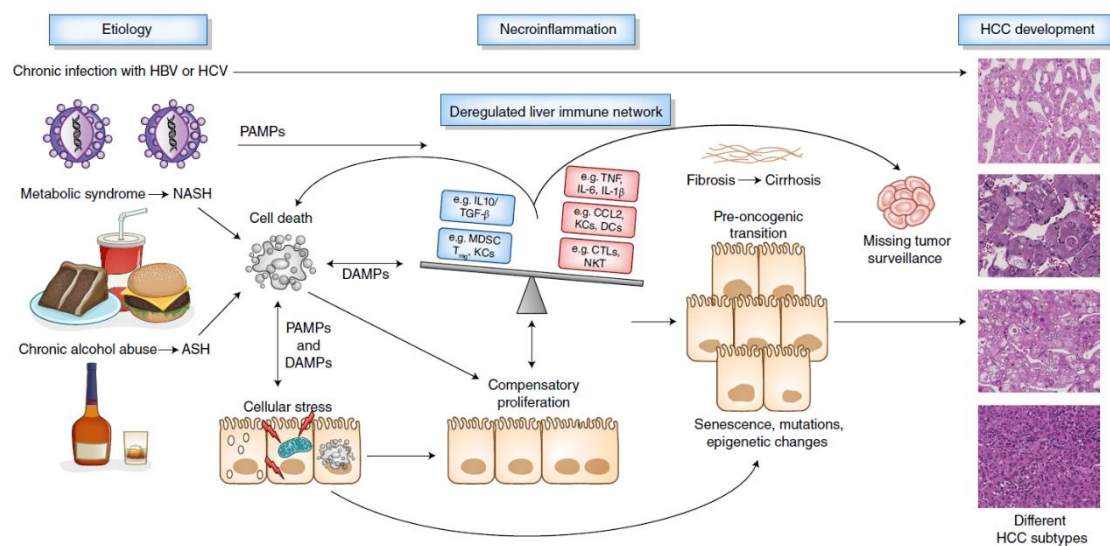
Evidències mostren la importància del metabolisme en el càncer de fetge però també el paper del microambient tumoral així com marcadors de superfície i modificacions epigenètiques. Així doncs, hi ha tota una sèrie de factors genètics i no genètics que alterats, atorguen a les cèl·lules danyades del fetge la capacitat de sobrepassar totes les barreres i els controls i desenvolupar-se complint els trets distintius d'una cèl·lula tumoral. Aquests trets distintius s'han descrit i classificat àmpliament com: inflamació, resistència a apoptosi, senescència, proliferació, evasió de supressors del cicle cel·lular, angiogènesi, metabolisme, invasió i metàstasi, canvis epigenètics i inestabilitat genòmica.

#### 3.4.5.1. Inflamació

El 90% dels casos de HCC es desenvolupen a conseqüència d'un ambient inflamatori crònic del qual els macròfags són el tipus cel·lular inflamatori més abundant. Aquests macròfags, tant els específics de teixit com els infiltrats, contribueixen tant al creixement cel·lular com a l'angiogènesi i per tant tenen un paper clau en la metàstasi del carcinoma hepatocel·lular. En un primer moment són els encarregats de la immunovigilància i per tant són la primera barrera davant de processos carcinògens. Tot i així, poden fer un canvi de fenotip i convertir-se en els anomenats macròfags associats a tumor (TAM), aquests són altament pro-inflamatoris i generen les senyals necessàries per a fomentar un ambient pro-tumorigenic que inhibeix la resposta immunitària encarregada d'eliminar cèl·lules mutades. Aquesta conversió maligna es veu afavorida pel microambient tumoral ric en factors pro-tumorals i també pro-angiogènics com VEGF, PDGF, TGFβ (factor de creixement tumoral

$\beta$ ) i FGF (factor de creixement de fibroblasts). La interleuquina 6 (IL6) i TGF $\beta$  promouen el creixement tumoral i la IL6 en conjunt amb TNF $\alpha$  promouen la invasió i la metastasi<sup>124,125</sup> **Figura 12.** La funció de les KC també es veu alterada i dirigida cap a la promoció de HCC a conseqüència de la presència de cèl·lules supressores derivades de cèl·lules mieloides CCR2<sup>+</sup> reclutades per les citoquines associades a hepatòcits senescents<sup>126</sup>. Hi ha una xarxa de factors que es combinen per a facilitar el desenvolupament dels processos oncològics de manera que també podem trobar TGF $\beta$  en conjunt amb la interleuquina 10 (IL10) suprimint la resposta immunitària que ataca el tumor. Aquestes cascades de senyalització tenen fins i tot la capacitat d'activar altres tipus cel·lulars com els limfòcits T *helpers* de tipus 2 (Th2) que a la vegada reclutaran limfòcits T reguladors (Tregs) involucrats en la immunotolerància<sup>127,128</sup>.

Els TAMS tenen una expressió elevada del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) que és considerat un factor promotor de tumors ja que activa la via de senyalització de IL6 i amb això el creixement dels hepatòcits<sup>129</sup>. En condicions normals, IL6 s'expressa després de patir un dany hepàtic per tal de restablir l'homeòstasi com a resposta a la interleuquina 1 $\beta$  secretada (IL1 $\beta$ ) per els hepatòcits moribunds, però en càncer aquesta senyal està constantment activa. Amés a més, EGFR s'ha trobat amb expressió elevada en els teixits del voltant dels tumors de pacients indicant la presència de cirrosi i una mala prognosi<sup>130</sup>.



**Figura 12.** Relació entre la inflamació crònica i el desenvolupament de HCC (extret de Ringelhan et al, 2018)

En aquest sentit, la via de senyalització del factor nuclear *kappa-light-chain-enhancer* de cèl·lules B activades (NF- $\kappa$ B) també juga un paper important en el desenvolupament de càncer a través de la inflamació amb l'activació de gens que codifiquen per a citoquines (IL1, IL2, IL6, IL12, TNF i d'altres), quimioquines (IL8, MCP1, RANTES, etc) molècules d'adhesió (ICAM, VCAM, E-selectin) proteïnes de fase aguda i enzims efectors induïbles. NF- $\kappa$ B és segrestat per quinases IK $\beta$  (IKK) al citoplasma i no serà alliberat fins que les IK $\beta$

siguin degradades per senyals pro-inflamatòries com TNF o IL1 $\beta$ . És secretat principalment per hepatòcits i KC, participant activament en la progressió dels tumors<sup>131,132</sup>. La llista de factors involucrats en el desenvolupament de càncer lligat a inflamació és molt extensa i formen xarxes complexes relacionades les unes amb les altres permetent l'adaptació i compensació de senyals amb l'objectiu final de permetre la supervivència i evolució de les cèl·lules tumorals. Un altre factor relacionat amb un mal prognosi és el factor de traducció de senyal i activació de la transcripció 3 (STAT3) que forma part també de la via de senyalització de IL6 però que s'ha relacionat amb altres factors com EGF o l'acumulació de reactius lliures d'oxigen (ROS). STAT3 s'expressa sobretot en macròfags i tot i que la senyalització inicial pretén evitar o prevenir la inflamació crònica, una vegada el teixit es troba alterat i la malaltia ja s'ha establert, STAT3 promou l'oncogènesi a partir de l'oncogen Src<sup>133,134</sup>.

Un tipus cel·lular essencial en l'establiment del microambient inflamatori són els fibroblasts associats a càncer (CAFs) que deriven principalment de les HSC. Aquest tipus cel·lular roman actiu secretant components de la matriu extracel·lular i interaccionant de manera activa amb les cèl·lules canceroses promovent la invasió i creixement i inhibint l'apoptosi. També s'ha relacionat amb la promoció d'un microambient immunosupressor reduint la infiltració de cèl·lules T als tumors<sup>135</sup>. La identificació d'aquest tipus cel·lular és complexa degut a que molts dels marcadors que expressen són compartits amb altres tipus cel·lulars. Els marcadors principals són:  $\alpha$ -SMA, proteasa d'activació de fibroblasts (FAP $\alpha$ ), proteïna específica de fibroblasts 1 (FSP-1), Tenascin-C, Periostin, antigen 2 neuronal-glial (NG2), Podoplanin i proteïna 5 associada a microfibril (MFAP5). Els pacients amb un perfil elevat de CAFs tenen un ambient inflamatori exacerbat que incrementa el risc de metastasi<sup>136</sup>. S'han relacionat també amb la promoció d'EMT a causa de la inducció de la secreció de TGF- $\beta$ <sup>137</sup>.

Pel que fa als limfòcits de la resposta adaptativa i innata, s'ha vist que els limfòcits T CD8+ tenen rols duals oposats ja que promouen la inflamació i neteja de cèl·lules danyades però a la vegada poden promoure una resposta tolerant. S'ha vist que quan estan actius promouen la producció de citoquines mitogèniques entre les quals es troba la limfotoxina- $\beta$  que causa dany als teixits i que s'ha relacionat amb la promoció de HCC<sup>138</sup>. A la vegada però, els limfòcits T CD8+ són el principal grup de limfòcits dins del grup de limfòcits infiltrants de tumor (TILs) que són considerats anti-tumorals ja que secreten grànuls lítics de membrana que contenen perforines i granzimes i degraden les cèl·lules alterades. Calen més estudis per definir els rols oposats de CD8+T i en quins estadis es duen a terme; aquests estudis podrien revelar l'existència de subgrups dins dels CD8+T<sup>109</sup>. Les cèl·lules CD4+T també tenen papers oposats i poden oscil·lar des de cèl·lules efectores a cèl·lules reguladores<sup>139</sup>. En models de NASH s'ha observat que la pèrdua de les cèl·lules CD4+T derivada de l'alteració del metabolisme per excés de lípids promou el creixement de HCC<sup>42</sup>. En relació a les CD4+ T, el subgrup Th17 i la interleuquina IL17 produïda per aquestes, s'ha descrit com a pro-tumorigènica en NASH per l'estimulació de l'alliberament de FA que danyen el DNA dels hepatòcits<sup>140</sup>. Altres subgrups són les anomenades anteriorment Th2 amb un rol pro-tumoral i les Th1 que s'han relacionat amb bon pronòstic i participen en l'estimulació de la resposta citotòxica<sup>141</sup>. El paper dels limfòcits B en el desenvolupament

de HCC és també un tema de controvèrsia, tot i que els resultats d'un estudi en el que en causaven la seva deleció, suggerien un comportament dependent de l'estadi de la malaltia en el que les cèl·lules T prevenen l'aparició inicial de tumors mentre que les B limiten el creixement de les cèl·lules tumorals ja establertes <sup>142</sup>. Les cèl·lules NKT poden promoure l'absorció de lípids per part dels hepatòcits a partir de la proteïna LIGHT, i contribuir d'aquesta manera a la inflamació i al HCC però el seu paper encara s'ha d'aclarir ja que també s'ha vist que juguen un paper important en la vigilància anti-tumoral. A diferència de tots els altres tipus cel·lulars, sembla ser que les cèl·lules NK si que tenen un clar efecte protector davant de NAFLD, NASH i el desenvolupament de HCC. D'acord amb això, s'ha vist que en casos de HCC i a través de la via de STAT3 i la sobre-expressió de IL10 i TGFβ, les NK s'esgoten i es redueixen facilitant d'aquesta manera el desenvolupament de càncer <sup>143</sup>.

#### 3.4.5.2. Resistència a apoptosi

Pel que fa a l'apoptosi, aquesta té una relació estreta amb la malaltia del fetge subjacent, el tipus de dany hepàtic i la predisposició individual del tipus de lesió. L'objectiu principal de l'apoptosi és l'eliminació de cèl·lules infectades, danyades o senescentes i per tant és una barrera de seguretat essencial per al manteniment de l'homeòstasi de l'organisme que quan es troba en desequilibri és també essencial per al desenvolupament de lesions malignes com HCC. Hi ha diferents vies per les quals es pot desenvolupar l'apoptosi i aquestes són la via extrínseca per receptors de superfície, via intrínseca a través del mitocondri i el reticle endoplasmàtic i per últim la via que utilitza les cèl·lules NK o limfòcits T i la seva secreció de perforina o granzimes <sup>144</sup>.

Hem de tenir en compte que qualsevol estímul que causi dany hepàtic activarà les vies de senyalització de mort cel·lular i aquesta pot donar-se de maneres diferents com autofàgia, necroptosi, piroptosi, ferroptosi o la combinació d'aquests <sup>145</sup>. Sembla ser, que davant de processos carcinogenics al fetge, sobretot aquells relacionats amb NASH, les causes més directes de dany als hepatòcits són l'estrès oxidatiu i la disfunció mitocondrial. Aquests estímuls portaran a l'activació de la mort cel·lular a través de la via de senyalització de la família de proteïnes anomenades cèl·lula B limfoma 2 (BCL-2) i la conseqüent activació de les caspases, i les quinases N-terminal c-Jun <sup>146</sup>.

Així doncs, durant CLD l'apoptosi es veu regulada per les proteïnes BCL-2 a la membrana mitocondrial exterior (OMM). Tenim les BCL-2 pro-apoptòtiques que són proteïna X associada (BAX), i la *killer* antagonista 1 (BAK) que són les encarregades d'activar les cascades de senyalització de les caspases al citoplasma mitjançant la permeabilització de la OMM i la secreció de citocrom c entre d'altres <sup>147,148</sup>. Per altre banda tenim les proteïnes BCL-2 de supervivència (BCL-xL) que limiten la permeabilització de la OMM i que no permeten que la cascada de senyalització sigui suficientment elevada per a aconseguir que la cèl·lula esdevingui apoptòtica i per tant promovent la supervivència de cèl·lules danyades <sup>149</sup>.



El que s'observa en nombrosos casos d'HCC son alteracions en el programa anti-apoptòtic i pro-apoptòtic de BCL-2 com per exemple la baixada d'expressió de BAX i alteracions a p53 o alteracions més avall de la via de senyalització en forma d'inhibició de les caspases per XIAP. TFG- $\beta$  s'ha vist també involucrat en l'alteració de l'apoptosi a les cèl·lules tumorals <sup>150</sup>.

Estudis han demostrat que la inhibició de l'apoptosi pot ser un ingredient clau per a l'inici dels processos carcinogènics i de fet aquesta característica s'ha relacionat amb la resistència a quimioteràpia. S'ha vist que Apo1, un inductor potent de la via mort cel·lular per receptor i el mediador d'apoptosis p53 (PUMA), inductor de la via apoptòtica mitocondrial, poden ser promotors de tumorigènesi <sup>144</sup>. L'explicació d'aquest succés requereix més investigació però es creu que Apo1 en estadis primerencs podria reclutar alguna proteïna que reguli l'activació de JNK i l'autofàgia, reprimint el seu potencial pro-apoptòtic i funcionant com a iniciador de tumor. Aquest estudi destaca la importància de considerar que cada etapa del desenvolupament tumoral pot requerir vies de senyalització oposades i que una molècula amb un paper anti-tumoral per a la iniciació de tumors pot tenir un rol pro-tumoral per a la promoció d'aquest.

La via de senyalització de NF- $\kappa$ B és important ja que amés d'estar associada a les vies del metabolisme i la resposta inflamatòria, promou la supervivència cel·lular davant de senyals d'estrès com ROS amb l'activació de vies semblants a les de p38 MAPK. Aquesta proteïna està relacionada amb proteïnes anti-apoptòtiques com cIAP, XIAP, BCL2 anti-apoptòtiques, cFLIP, TRAF1, TRAF2 i GADD45 $\beta$ <sup>151-153</sup>. Un regulador molt important de NF- $\kappa$ B és la quinasa 1 que interacciona amb el domini de mort cel·lular (RIPK1). Una altre que relaciona el sistema immunitari amb l'apoptosi és la quinasa 1 activada per MAP3 i TGF $\beta$  (TAK1) amb un paper clau en l'activació de la resposta immunitària adaptativa. La seva activació a les cèl·lules parenquimàtiques inhibeix l'apoptosi a través de la secreció de TNF i l'activació de la via de NF- $\kappa$ B. Així, doncs, RIPK1 i TAK1 són dianes terapèutiques interessants <sup>151</sup>.

Les vies per les que l'apoptosi pot obrir-se camí són molt més àmplies de les que s'havien definit fins al moment, de fet, un estudi en leucèmia limfocítica crònica (CLL) va demostrar que els nivells d'algunes molècules poden atorgar a aquestes rols duals. És el cas de STAT3, que tot i haver-se demostrat el seu paper anti-apoptòtic i oncogènic, sembla ser que nivells molt elevats activen directament caspasa-3 i per tant l'apoptosi, tornant STAT3 una molècula pro-apoptòtica en CLL <sup>42</sup>.

La ferroptosi és un mecanisme de mort cel·lular que s'ha descobert recentment i té lloc a conseqüència de l'acumulació de peròxid de lípids dependents de ferro. La inducció de la ferroptosi pot deure's a molècules petites de classe 1 (inhibidors del sistema Xc) o a inductors de classe 2 (inhibidors de GPx4)<sup>154</sup>. La ferroptosi no causa els canvis morfològics observats en l'apoptosi com la condensació de la cromatina sinó que es manifesta amb l'encongiment de les mitocondries i l'increment de la densitat de les seves membranes <sup>155</sup>. Estudis han demostrat que la ferroptosi és un mecanisme important en HCC i que aquest està regulat per la proteïna retinoblastoma (RB) de manera que la baixada d'expressió de RB, fa les cèl·lules del HCC més susceptibles a ferroptosi <sup>156</sup>.

La caspasa-3 és un membre de la família de proteases d'àcid cisteïn-aspartic i juga un paper central en l'execució de l'apoptosi cel·lular. S'expressa a tot l'organisme i manté l'homeòstasi de la renovació de cèl·lules danyades als teixits però també s'ha vist incrementada en alguns càncers com HCC <sup>157</sup>. Un estudi ha relacionat aquesta caspasa-3 amb l'increment d'incidència de HCC promogut per DEN. Contràriament al que s'esperaria, a conseqüència de la deleció de caspasa-3 i l'administració del mutagen dietil nitrosamina (DEN), les cèl·lules incrementen la MAP quinasa p38 a través de la secreció de IL1 $\alpha$  i TNF $\alpha$  per part dels hepatòcits amb el resultat d'una incrementada mort cel·lular i la conseqüent proliferació compensatòria que es pot descontrolar. Això podria indicar que el paper de la caspasa-3 en la inhibició de l'hepatocarcinogènesi induïda per DEN és a través de la supressió de p38 i de la mort dels hepatòcits i per tant amb un rol diferent al que la sol definir <sup>158</sup>.

### 3.4.5.3. Senescència

La senescència és un procés biològic que té lloc a les cèl·lules envellides o danyades de tot l'organisme amb l'objectiu d'aturar el cicle cel·lular i evitar la progressió de cèl·lules amb potencial cancerós. També succeeix davant d'un estímul d'estrès per a evitar que les cèl·lules inverteixin la seva energia en dividir-se. Les cèl·lules mieloides són les encarregades de detectar i eliminar les cèl·lules senescentes, però en HCC ens trobem amb aquest procés alterat de manera que els hepatòcits danyats romanen al teixit sense ser eliminats i promouen els processos de carcinogènesi a través del seu secretoma pro-inflamatori. Les cèl·lules senescentes són difícils d'identificar però acostumen a expressar almenys dos o tres dels següents marcadors: SA- $\beta$ Gal, p16INK4A, p21 i IL6 o IL1 $\alpha$ <sup>159</sup>. Les vies moleculars principals involucrades són la de p53 i RB i els estímuls que inicien l'entrada en senescència acostumen a ser dany al DNA, alteracions als telòmers, estrès oxidatiu i expressió d'oncogens. Altres gens importants són els relacionats amb el cicle cel·lular com CDKN2A, CDKN1A i LMNB1 <sup>160</sup>. Una altre que també s'han relacionat amb la regulació negativa de la senescència és IL6/STAT3/TERT<sup>161</sup>. Cal ser prudents, però ja que interleuquines com IL6, s'han vist jugant papers duals en relació a senescència en funció de l'estadi de malaltia i de si és una secreció de tipus paracrina o autocrina.

Les cèl·lules senescentes desenvolupen un fenotip secretor anomenat SASP que té un efecte directe sobre les cèl·lules veïnes i que conté factors com IL6, IL1 $\alpha$ , CXCL1, CXCL2 però el contingut en citoquines, quimioquines, factors de creixement i proteases és molt ampli. Estudis han demostrat la importància del SASP secretat per HSC senescentes en el desenvolupament i progressió de HCC en ratolins obesos i destaquen el paper de la comunicació entre els intestins i el fetge en aquest procés <sup>97,162</sup>. En estadis inicials de CLD, la senescència de les HSC per la via de ATM-ATR permet l'expressió de NKG2D a la seva superfície i així redueixen la fibrosi al fetge a través de l'eliminació d'aquestes cèl·lules senescentes per part de les cèl·lules NK <sup>163</sup>.

El SASP pot tenir llavors un paper pro-tumoral però també anti-tumoral ja que per una part evita l'entrada en cicle cel·lular de cèl·lules amb mutacions al DNA i recluta el

component immunitari per a la seva eliminació, però també pot propiciar un ambient inflamatori perjudicial. De fet, la presència d'un estroma senescent s'ha relacionat amb baixa supervivència en pacients amb HCC degut, possiblement, a la inducció d'un ambient immunosupressor que permet el creixement tumoral. En aquest sentit, un estudi va demostrar que els hepatòcits senescents secretaven CCL2 que reclutaven cèl·lules mieloides immadures CCR2<sup>+</sup> que tenien la capacitat de diferenciar-se en macròfags i eliminar les cèl·lules senescents pre-canceroses, però a la vegada, aquestes inhibien les cèl·lules NK de manera que permetien la proliferació de les cèl·lules canceroses ja establertes al teixit <sup>126</sup>.

#### 3.4.5.4. Proliferació i evasió de supressors del cicle cel·lular

Entre alguns dels canvis primerencs detectats a les lesions pre-canceroses estan aquells relacionats amb un increment de proliferació i disminució de proteïnes supressores de tumors. Estudis han relacionat aquests canvis amb la inducció de factors de creixement com el factor 2 semblant a insulina (IGF2) i TGF $\alpha$  i la disminució de p53 i pRb <sup>164</sup>.

Anàlisis de transcriptòmica han demostrat la sobre-expressió d'alguns gens específics relacionats amb la proliferació cel·lular. Els exemples més destacables són CENPF (proteïna F del centròmer), una proteïna essencial per a la formació i funcionalitat del fus mitòtic i FOXM1, un factor de transcripció que regula el cicle i la proliferació cel·lular així com la reparació de l'ADN<sup>165</sup>. Altres vies que s'han relacionat estretament amb la supervivència i proliferació tumoral en HCC són EGF/EGFR, HGF/MET, IGF/IGFR, PI3K/AKT/mTOR i RAS/MAPK <sup>166</sup>. Tot i així, el HCC s'ha definit per ser molt heterogeni i multifactorial i trobar mutacions definitòries comuns a tots els casos és encara un misteri per resoldre.

STAT3 és un factor de transcripció de la família de la quinasa Janus i participa en un gran nombre de processos destacant per el seu paper en l'activació de factors de creixement i citoquines. De fet és considerada una diana amb molt potencial terapèutic ja que es veu usualment activa i incrementada en càncer i s'ha demostrat que la seva inhibició disminueix la progressió de tumors *in vitro*, *in vivo* i inclús a estudis clínics <sup>57,167</sup>. És considerat un oncogen que atorga resistència a apoptosi tot i que com ja hem descrit anteriorment, pot tenir funcions contràries depenent de la seva concentració. Entre les citoquines i factors de creixement que l'activen hi trobem IFN, IL6, IL1, alsoneuropoietina (NP), factor neurotòfic ciliar (CNTF), cardiotrofina 1 (CT-1), citoquina semblant a cardiotrofina (CLC), oncostatina M (OSM), factor inhibidor de leucèmia (LIF), IL27, IL31, IL5, proteïna 2 morfogenètica (BMP2), EGF, HGF, PDGF i altres<sup>168</sup>. El seu paper en la supervivència cel·lular es demostra en estudis que relacionen a STAT3 directament amb la proteïna anti-apoptòtica BCL-xL de la família de les BCL2 <sup>169</sup>.

### 3.4.5.5. Angiogènesi

L'angiogènesi és el procés biològic que permet la formació de nova vasculatura a partir de vasos ja existents i té lloc de manera natural a tot el cos però també és un mecanisme que participa de moltes malalties amb l'anomenada angiogènesi patològica. L'angiogènesi és en general un procés estrictament regulat ja que l'activació excessiva promou la formació de vasculatura anormal que altera el funcionament fisiològic dels teixits i que pot donar lloc a patologies<sup>170</sup>. En el cas del fetge, l'angiogènesi patològica té lloc sobretot a nivell extrahepàtic generant vasos porto sistèmics colaterals i amb això l'agreujament de les pertorbacions hemodinàmiques a nivell esplàncnic i la hipertensió portal. Aquest procés de formació de nova vasculatura és també considerada un tret distintiu dels processos carcinògens permetent no només l'alimentació del tumor i el seu creixement sinó també la seva disseminació a altres òrgans<sup>171</sup>.

Els nòduls displàsics reben sang preferiblement de la vena porta de manera semblant als nòduls de regeneració, però hi sol haver un canvi a sang arterial quan el nòdul avança cap a HCC temprà. Les LSEC perden els seus marcadors i incrementen els nivells d'integrines, incrementant la capacitat angiogènica, pro-coagulant i fibrinolítiques<sup>172</sup>. Les LSEC peritumorals s'han vist incrementant la secreció de factors pro-tumorals tals com IL6<sup>173</sup>.

Els mecanismes que permeten els processos d'angiogènesi patològica i fisiològica són bastant semblants; mentre l'angiogènesi fisiològica forma vasos funcionals i recoberts de perícits que permeten l'equilibri homeostàtic, l'angiogènesi derivada de tumors atorga a les cèl·lules tumorals la capacitat de sobreviure, propagar-se i envair altres teixits. Normalment, en situacions patològiques aquests vasos són immadurs i filtrants. Quan una cèl·lula tumoral creix de manera descontrolada, queda una regió interior en el microambient tumoral a on hi manca el subministrament de sang i per tant es formen zones hipòxiques amb falta de nutrients que seran un dels principals estímuls per a la formació de nous vasos<sup>174,175</sup>.

L'angiogènesi tumoral és un procés que segueix quatre passos: primer, la membrana basal dels teixits resulta danyada; segon, les cèl·lules endotelials migren; tercer, les cèl·lules endotelials creixen i s'estabilitzen; i quatre, factors angiogènics romanen actius i presents promovent l'angiogènesi contínuament<sup>174</sup>. Aquest procés és tan important en càncer que sovint, s'han relacionat els nivells dels factors pro-angiogènics amb l'agressivitat de les cèl·lules tumorals i s'han fet servir per a identificar pacients d'alt risc amb mal pronòstic<sup>176,177</sup>.

En el context de malaltia hepàtica, hi ha tres factors principals promovent l'angiogènesi patològica: factor de creixement vascular endotelial (VEGF), factor de creixement de la placenta (PIGF) i el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF)<sup>178</sup>. L'increment del nombre de vasos sanguinis al fetge pot arribar a incrementar el reclutament de cèl·lules inflamatòries que poden estimular, en un *loop* positiu, la inflamació del teixit activant els miofibroblasts profibrogenics que donaran com a resultat l'inici de processos de fibrogènesi. A més a més, aquesta nova vasculatura té una estructura diferent de l'especialitzada vasculatura intrahepàtica amb capacitat de formar xarxes sinusoidals

perfectament interconnectades. Són desorganitzades, caòtiques i filtrants de manera que en comptes de millorar la perfusió dels hepatòcits, comprometen la distribució de l'oxigen i els nutrients per tot el parènquima generant dany hepàtic i hipòxia <sup>179</sup>. Quan els miofibroblasts estan sobre activats i en procés de fibrogènesi, l'efectivitat de la resposta immunitària es troba compromesa i el teixit queda descompensat exposat a senyals excessives d'inflamació i de factors pro-angiogènics que poden arribar a tenir un efecte de transdiferenciació en els mateixos miofibroblasts i promoure processos de proliferació, quimiotaxi i producció de matriu extracel·lular <sup>180</sup>. Per aquest motiu, l'angiogènesi s'ha convertit en un dels tractaments més interessants en totes les patologies hepàtiques no únicament aquelles relacionades amb processos carcinògens; per exemple, el Sorafenib, un inhibidor multi-quinasa que actua sobre VEGFR, PDGF i Raf, ha permès una disminució marcada de neovascularització intrahepàtica, fibrosi i inflamació en models animals de cirrosi <sup>181</sup>. L'eficàcia del Sorafenib s'ha demostrat també en estudis clínics, millorant la supervivència de pacients amb HCC avançat<sup>176</sup>.

L'angiogènesi juga un paper amb una relació molt estreta amb la resposta immunitària. El HCC sovint porta a la trans-diferenciació endotelial que implica la pèrdua de marcadors de LSEC i presentació de quimioquines CXC i CC així com expressió de ICAM1, CAP1 i CD151 que promouen el reclutament de limfòcits. La proteïna stabilin1 també s'expressa i pot promoure el reclutament de cèl·lules Treg incrementant la immunotolerància del teixit i l'evasió de la mort per part de les cèl·lules tumorals <sup>182</sup>.

Quan parlem de l'angiogènesi com a diana terapèutica és important considerar sempre que és un procés requerit per al manteniment de l'homeòstasi i que per tant només ens interessa reduir l'angiogènesi patològica i aquells factors elevats de manera excessiva. Això és especialment important en el context de malaltia hepàtica ja que els pacients sovint tenen problemes de coagulació i varius molt sensibles al trencament i sagnat.

#### 3.4.5.6. Metabolisme

La importància del metabolisme en la transformació maligna radica en l'adquisició de la capacitat de sobreviure en un microambient hipòxic o hostil. D'aquesta manera, les cèl·lules canceroses poden proliferar formant grans masses sense perdre tota la part cel·lular que queda lluny de vasos sanguinis fins que han tingut lloc els processos d'angiogènesi patològica. Així doncs, hi ha un canvi metabòlic ja descrit en apartats anteriors que és l'anomenat efecte Warburg, en el que mitjançant la glicòlisi aeròbica les cèl·lules tumorals obtenen l'energia i biomassa necessàries per a la proliferació cel·lular<sup>183</sup>.

La inducció de la glicòlisi a partir de HIF-1 està associada amb una elevada agressivitat de tumors. En aquesta via, hi ha un jugador molt important que és el transportador de glucosa 1 (GLUT1) ja que permet que les cèl·lules absorbeixin la glucosa <sup>184</sup>. Així doncs, HIF-1 indueix l'expressió de GLUT1 però també hi ha altres reguladors que participen en aquest increment de GLUT1 com són PI3K, AKT i p53. L'expressió GLUT1 s'ha vist associada a tumors més avançats i proliferatius <sup>185</sup>.

Una altre molècula important en relació al metabolisme en HCC és l'isoenzim piruvat quinasa M2 (PKM2) ja que estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat que el seu silenciament inhibeix la glicòlisi aeròbica. En relació amb PKM2, s'ha vist que el miR-122 el regula negativament unint-se a la seva regió no traduïda 3' (3'-UTR). Altres reguladors de la via de PKM2 són considerats importants en el metabolisme de HCC com són PARP14, PIM1 i Spry2 en forma d'activadors <sup>186,187</sup>.

Un estudi recent destaca el paper del metabolisme lipídic en el desenvolupament de HCC. Durant la progressió de NAFLD, el metabolisme lipídic es veu alterat i indueix l'ablació selectiva de les cèl·lules CD4+ intra-hepàtiques de manera que la funció mitocondrial queda deteriorada, generant elevats nivells de ROS i per tant dany oxidatiu amés d'una immunovigilància inefectiva<sup>42</sup>.

La identificació de marcadors per la glicòlisi en HCC podria ser una de les estratègies més interessants per al disseny de dianes terapèutiques.

#### 3.4.5.7. Invasió i metàstasi

En HCC, la invasió microvascular és un marcador de pronòstic així com la mida del tumor i els marcadors de proliferació tot i que és difícil de mesurar abans del transplantament. La invasió de la vena porta és un tret que té lloc en molts casos de HCC i que juga un paper essencial en l'expansió intrahepàtica del tumor, de fet, les metàstasis intra-hepàtiques tenen una incidència de més del 80%. Es poden donar també metàstasis extra-hepàtiques i es troben normalment als pulmons, als ossos, als nòduls limfàtics i al cervell <sup>188</sup>.

L'adquisició de la capacitat de fer EMT és essencial per a assolir el fenotip invasiu i es caracteritza per l'increment d'expressió de vimentina i la reducció de E-caderina. En HCC la EMT està controlada per diversos factors, alguns dels més importants són ZEB1 i ZEB2 i facilitada per factors de la matriu extracel·lular com periostin <sup>189,190</sup>.

Un component molt important de la població tumoral i que permet la iniciació del tumor i la recidiva clínica és la presència de cèl·lules iniciadores o cèl·lules mare tumorals (CSC). Aquesta subpoblació té la capacitat de renovar-se a si mateixa, diferenciar-se i desdiferenciar-se de manera que són un recurs essencial per a la resistència a quimioteràpia i radioteràpia <sup>191</sup>. Aquestes CSC del fetge es poden iniciar a partir d'hepatòcits diferenciats, hepatoblasts o progenitors hepàtics adults. Els gens relacionats amb la transició epitelial-mesènquima (EMT) i les cèl·lules mare embrionàries (ESC) solen estar incrementats en les poblacions de CSC. Estudis han demostrat que les vies de senyalització de Wnt/ $\beta$ -catenina i STAT3 són responsables de la regeneració del fetge i per això s'han relacionat amb el manteniment de les CSC en càncer<sup>192,193</sup>. Un altre factor important en el fenotip metastàtic ve derivat de la capacitat de dur a terme mimetisme vascular de les cèl·lules tumorals, formant canals que permeten l'expansió de les cèl·lules des-diferenciades. Molts factors han relacionat amb aquest fenomen, alguns d'ells són Twist1, Slug, ROCK i Notch1 <sup>188</sup>.

### 3.4.5.8. Inestabilitat genòmica

La inestabilitat genòmica és un jugador clau a la majoria de càncers humans inclòs el HCC, normalment es veu representada amb variacions al nombre de còpies (CNAs) amb guany o pèrdua als cromosomes però també en forma de mutacions somàtiques. Les tècniques novedoses de seqüenciació massiva d'última generació han permès mapejar totes les alteracions cromosòmiques específiques més abundants en pacients amb HCC <sup>165</sup>. També s'han pogut localitzar amplificacions d'oncogens com el *MET*, *MYC*, *TERT*, *CCND1* i *FGF19* i delecions de supressors de tumors com *PTEN*, *TP53*, *CDKN2A* i *CDKN2B* <sup>194</sup>.

Algunes mutacions s'han pogut associar a HCCs derivats d'etiologies específiques. Per exemple, *CTNNB1* s'ha associat al consum d'alcohol mentre que *TP53* s'ha associat a casos derivats de HBV. Hi ha encara moltes preguntes que necessiten resposta, però gràcies a la investigació integrativa que compren diferents disciplines, s'han pogut relacionar mutacions amb vies específiques. De manera que alguns d'aquests gens que guien el desenvolupament de HCC estan associats amb la reparació de l'ADN (*TP53*, *CDKN2A*, *RB1*), via de Wnt/ $\beta$ -catenina (*CTNNB1*, *AXIN1*), remodelació de cromatina (*ARID1A*, *ARID1B*, *ARID2*), activació de quinases mitogèniques (*RPS6KA3*), estrès oxidatiu (*NFE2L2*, *KEAP1*) i modificació d'histones (*MLL*, *MLL3*, *MLL4*)<sup>195,196</sup>.

### 3.4.5.9. Canvis epigenètics

Els canvis epigenètics són modificacions reversible al genoma que no afecten la seqüència de l'ADN. Aquestes modificacions són capaces de modular la transcripció gènica mitjançant la metilació, del ADN, modificacions a les histones o remodelació de la cromatina però també poden regular a nivell post-transcripcional a partir de RNAs no codificants (ncRNAs). Aquest tipus de regulació actua de manera que per exemple, la metilació de la regió promotora d'un gen pot afectar directament la seva transcripció reduint-la o incrementant-la<sup>197</sup>.

L'alteració dels patrons de metilació del ADN és un tret que s'observa de manera comú en molts càncers i entre ells, HCC. Aquestes alteracions actuen promovent la inestabilitat genòmica i el silenciament de gens supressors de tumors<sup>198</sup>. Estudis han demostrat patrons d'hipo-metilació generalitzats en regions canceroses indicant una possible desdiferenciació cel·lular<sup>199</sup>. La troballa de gens específics amb patrons alterats de metilació pot ser una eina de pronòstic i diagnòstic que ajudi al tractament de pacients. Altres grups de recerca han trobat gens híper-metilats com *EMILIN2*, *WNK2*, *TM6SF1*, *TLX3*, *HIST1H4F*, *TRIM58* i *GRASP* en pacients amb HCC associat a hepatitis B <sup>200</sup>. El més interessant, però, és la validació mecanística d'aquests gens com van fer en aquest estudi <sup>201</sup>, en el que van buscar quin dels seus gens híper-metilats eren gens supressors de tumors i van trobar-ne dos: el polipèptid de neurofilament pesat (NEFH) i la fosfodiesterasa 3 esfingomielina (SMPD3).

L'organisme conté proteïnes que permeten regular l'estructura de la cromatina i els seus patrons epigenètics que estan alterats en HCC com l'activador de l'homòleg de zeste 2 (EZH2)<sup>202</sup>.

### 3.5. Família de proteïnes CPEBs

La família de proteïnes d'unió als elements de poli(A)denilació citoplasmàtica (CPEBs) són proteïnes que s'uneixen al àcid ribonucleic (RNA) per a regular la traducció de proteïnes específiques que contenen a la seva seqüència elements de poliadenilació citoplasmàtica (CPEs) a la regió 3'-UTR del seu RNA missatger (mRNA) la seqüència consens de la qual és UUUUUAU.

La cua poly(A) dels mRNAs permet la regulació de la traducció de manera que quan aquesta cua és curta, els mRNAs queden retinguts al citoplasma i quan són requerits, la seva cua poly(A) s'allarga mitjançant els elements adequats i la seqüència és alliberada per a poder ser traduïda<sup>203</sup>. El control de la traducció a partir de canvis a la cua poly(A) al citoplasma es va descriure originalment com un mecanisme clau per a l'expressió gènica durant la meiosi i la mitosi ja que hi ha molts mRNAs amb caixes CPE relacionats amb el control del cicle. Avui en dia se sap que l'espectre de mRNAs regulats per les CPEBs es molt ampli i pot arribar a cobrir fins al 20% del genoma<sup>204</sup> amés, la regulació pot ser tant de repressió com d'inducció.

La proteïna descrita inicialment va ser CPEB1 i aquesta és la més llunyana a nivell evolutiu, però s'han descrit tres membres més d'aquesta família (CPEB2-4) que denoten la importància biològica de les seves funcions. Totes les CPEBs comparteixen els elements d'unió al RNA però difereixen en els dominis reguladors i els patrons d'expressió<sup>205</sup>.

#### 3.5.1. Funció y mecanismes

Així doncs, la importància de les CPEBs radica en la regulació de la traducció de mRNAs. Aquesta regulació pot ser dividida en tres nivells; la iniciació, l'elongació i la finalització, i l'etapa més complexa i que requereix més factors reguladors és la iniciació<sup>206</sup>. Les CPEBs poden actuar com activadores o repressores en funció dels components associats a ells i del context cel·lular i també tenen capacitat de gestionar la localització del mRNA.

L'estructura dels transcrits de RNA està dissenyada per l'evolució per tal de permetre un estricte control de manera que a l'extrem 5' de tots els transcrits eucariotes s'hi troba una seqüència anomenada Cap 5' i l'altre extrem, el 3', es troba bloquejat per una llarga cadena de 200 a 500 nucleòtids, concretament adenines (la cua poli(A))<sup>207</sup>. Aquest extrem 3' és essencial per al transport, l'estabilitat i la traducció de quasi tot els mRNAs eucariòtics. Tant el Cap 5' com la cua poli(A) són reconeguts per els factors iniciadors de la traducció (eIFs) que permeten el reclutament de la subunitat 40S dels ribosomes. Aquesta subunitat escaneja la regió 5'UTR en direcció 5'→3' fins a trobar un codó d'iniciació en el context



adequat. Faltarà llavors la unió de la subunitat major del ribosoma (60S) per a formar un ribosoma 80S que sigui catalíticament competent.

La iniciació requereix que s'associï el complex eIF4 al Cap 5'; aquest complex conté el factor eIF4E, l'helicassa de RNA eIF4A i la proteïna de bastida eIF4G. La unió d'aquest complex a la proteïna d'unió a la cua poli(A) de 3' (PABP/ePAB) permet el reclutament de eIF4F i la pseudo-circularització del mRNA de manera que els extrems queden propers l'un de l'altre. És llavors quan el complex de pre-iniciació 43S, que inclou la subunitat 40S i els eIFs associats, és reclutat després de la interacció de eIF3 amb eIF4G i escaneja l'extrem 5'UTR per a trobar el codó d'inici. Una vegada tot això ha tingut lloc, la subunitat ribosomal 60S s'unirà a la 43S per a formar un ribosoma 80S competent que llegirà tot el marc de lectura (ORF) del transcrit per a produir el polipèptid codificat<sup>208,209</sup> (*Figura 13*).

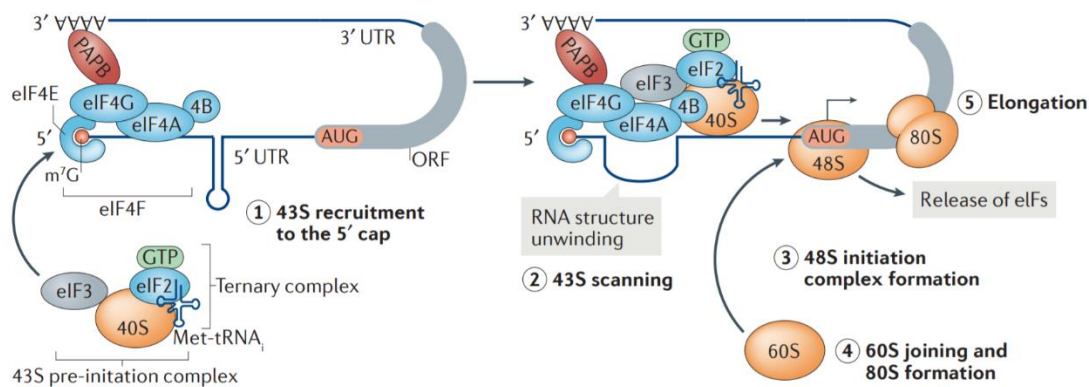


Figura 13. Mecanismes d'iniciació de la traducció (extret de Leppek i Barna 2018)

La família de proteïnes CPEB, regulen la circularització del mRNA unint-se a la caixa CPE a l'extrem 3' i evitant la poliadenilació del transcrit bloquejant la unió de PABP o promovent-la. CPEB s'uneix a Maskin i aquesta s'uneix a eIF4E. Quan la proteïna quinasa Aurora fosforil·la CPEB, aquesta s'activa i incrementa l'afinitat per el factor específic de tall i poliadenilació (CPSF) que reclutarà la polimerasa poli(A) i allargarà la cua poli(A) (*Figura 14*). Així doncs les CPEBs són factors que bloquegen la traducció però també indueixen la poliadenilació requerida per a que els transcrits es tradueixin<sup>210</sup>.

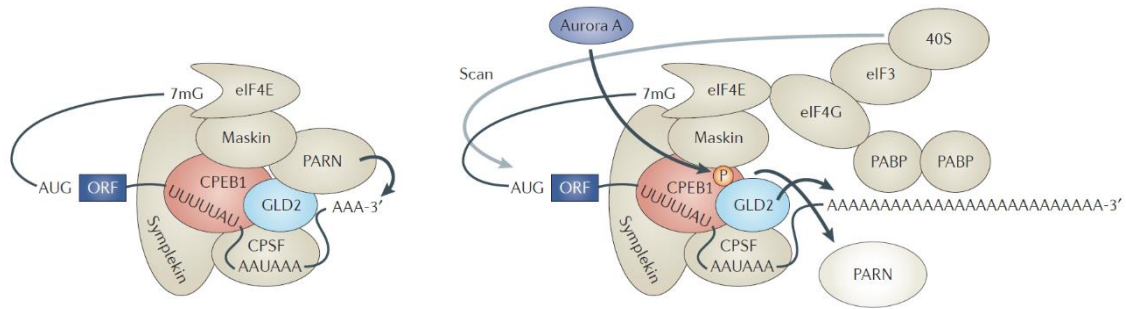


Figura 14. Mecanismes d'iniciació de la traducció per CPEB1 (extret d'Ambrogio 2013)

En el cas de CPEB1 sabem que la repressió de la traducció requereix d'una distribució específica de les caixes CPE que consisteix en la presència d'almenys dues CPEs separades per menys de 50 nucleòtids que probablement impliqui la formació d'un dímer. Aquest dímer altera el complex que permet la circularització del mRNA amb dos mecanismes; per una part evita la unió d'ePAB a la cua poli(A) ja que recluta PARN la qual redueix la mida de la cua i per l'altre, bloqueja o trenca la unió entre eIF4E i eIF4G amb intervenció d'una proteïna intermitja que encara no s'ha definit amb certesa. Els models que s'han descrit parlen de la proteïna Maskin o de eIF4E-T però es requereix més investigació per a definir el procés. Per l'activació, es requereix de la presència de dos motius d'hexanucleòtids (AAUAAA) anomenats Hex i la CPE per a la unió de CPEB i CPSF; a conseqüència de la fosforil·lació de la CPEB1, la cua poli(A) serà allargada per el reclutament de la polimerasa GLD2. Finalment l'activació requerirà de l'expulsió de PARN per a que GLD2 pugui ser efectiva i de l'estabilització del complex per *symplekin* <sup>203</sup>.

La classificació de la funció específica de cada CPEB és un repte i no ha estat encara establerta. Els dominis per a la unió de les CPEBs estan molt conservats amb la potencial conseqüència de solapament en el reconeixement de seqüències, però les diferents funcions descrites indiquen que els processos de substitució i compensació no acostumen a succeir <sup>211</sup>. Un estudi va revelar les funcions seqüencials i no redundants de les CPEBs en el cicle cel·lular i aquest es podria, possiblement, extrapolar a molts altres mecanismes biològics. En aquest cas, CPEB3 és l'únic membre dispensable per a la divisió mitòtica mentre que els altres tres són essencials; CPEB1 és necessari per a l'entrada en profase, CPEB2 l'entrada a metafase i CPEB4 per la citocinesi <sup>212</sup>.

Els 4 membres de la família comparteixen la seqüència de la seva terminació carboxil però l'extrem regulador amino-terminal és molt variable, el que els hi permet exercir mecanismes reguladors diferents. Per exemple, CPEB1 i CPEB4 acostumen a regular iniciació de la traducció mentre que CPEB2 s'ha relacionat amb l'elongació <sup>213</sup>. CPEB1 i CPEB4 són les principals involucrades en la regulació mitòtica i meiótica i en la transformació maligna <sup>214</sup>. A la regió carboxil-terminal que és la conservada, hi ha els llocs que reconeixen el mRNA i dues seqüències de dit de zinc. A la regió amino-terminal hi ha dominis reguladors variables entre les diferents CPEBs i en concret a CPEB1 s'hi troba una caixa o domini anomenada PEST que participa de la destrucció de la proteïna per mitjà del proteosoma.

A part del paper en malinitat, també s'ha vist la influència de CPEB1 en altres tipus de malaltia ja que té la capacitat de regular el desenvolupament de cèl·lules germinals, plasticitat sinàptica, senescència cel·lular i estudis han mostrat una estreta relació amb proteïnes que participen de les vies de senyalització de la insulina. De fet s'ha vist que la manca de CPEB1 incrementa PTEN i STAT3, dos reguladors negatius de la insulina i incrementa el desenvolupament de resistència a insulina en un context de HFD demostrant que CPEB1 regula la traducció d'aquestes dues proteïnes i que per tant és clau <sup>215</sup>.

### 3.5.2. CPEB4 a la malaltia hepàtica

CPEB4 juga un paper primordial en el desenvolupament de resposta adaptativa davant de l'acumulació de proteïnes mal plegades (UPR) al reticle endoplasmàtic (ER), un procés necessari per al manteniment de l'homeòstasi dels teixits i especialment en el fetge que està contínuament sotmès a estímuls d'estrès. De fet, s'ha vist que CPEB4 es necessària per a l'adaptació a estrès al ER degut a dieta greixosa (HFD) i a envelliment que promouen l'esteatòsi hepàtica. En aquest sentit, CPEB4 està regulada de manera dual, destacant la importància del seu paper. Per una banda, la transcripció del mRNA de CPEB4 està controlada per un rellotge circadià que consisteix en la regulació seguint les hores de llum en cercles de 24h. Per altre banda, la seva traducció està regulada pel UPR a partir de regions a la seqüència del CPEB4 en el seu 5'UTR. D'aquesta manera, CPEB4 se sintetitza només a conseqüència de senyals d'estrès i només seguint el seu rellotge circadià. Quan s'activa, CPEB4 té la capacitat de regular proteïnes del UPR tals com la proteïna d'interacció amb tioredoxina (TXNIP), proteïna 1 sobre-regulada per hipòxia (HYOU1), la subunitat 3 dolicol·fosfat manosil-transferassa (DPM3), transportador 2 d'ATP (TAP1), oxigenassa de heme 1 (HMOX1), proteïna rica en cisteïnes i dominis semblants a EGF 2 (CRELD2) i membre A de la família de torsines (TOR3A) entre altres, amb l'objectiu de restablir la funcionalitat del ER i l'homeòstasi mitocondrial. La participació de CPEB4 en la resolució de l'estrès és tan important que la seva manca facilita el desenvolupament i establiment de NASH <sup>216</sup>.

En el nostre laboratori s'ha demostrat el paper de les proteïnes CPEB en la regulació de VEGF i la seva implicació en la malaltia hepàtica. En aquest cas, el mecanisme de regulació involucra tant a CPEB1 com a CPEB4 i es dona en un context de cirrosi en el que hi ha una sobre-regulació d'Aurora quinasa A, que s'autofosforil·la al mesenteri i al fetge i que és l'encarregada de fosforil·lar i activar CPEB1. Bàsicament, i donada la funció de VEGF, l'efecte té una relació directa amb l'angiogènesi patològica que tants símptomes causa en la malaltia del fetge. Així doncs, CPEB1 promou un processament nuclear alternatiu del 3'UTR de VEGF i CPEB4 de manera que els elements repressors de la traducció queden eliminats. La sobre-expressió de CPEB4, a la vegada, promou la seva pròpia activació unint-se als seu mRNA i la poliadenilació citoplasmàtica del mRNA de VEGF incrementant la seva traducció i per tant promovent l'increment de proteïna VEGF de manera molt activa i participant d'un bucle de regulació positiva. El més interessant de tot això és que sembla ser que CPEB4 només regula l'angiogènesi patològica sense afectar la vascularització

fisiològica necessària per al manteniment de l'homeòstasi <sup>217</sup>. També hem vist el seu paper regulant la proliferació de les cèl·lules mare de la paret vascular dels vasos sanguinis que són les principals encarregades de diferenciar-se i iniciar processos de neovascularització en malaltia com és el cas de la hipertensió portal crònica. Aquestes característiques atorguen a CPEB4 potencial terapèutic ja que la seva inhibició afectaria només a l'angiogènesi patològica <sup>218</sup>. Per altre banda també hem vist que CPEB4 juga un paper important en l'activació de HSC a través de la regulació traduccional de PFKFB3 i la glicòlisi <sup>70</sup>. Els fetges fibròtics de pacients i rosegadors (ratolins i rates) incrementen els nivells de glicòlisi i PFKFB3 però això es veu alleugerat en inhibir o silenciar CPEB4.

El procés de diferenciació d'eritròcits terminal té lloc al fetge del fetus i aquest procés s'ha vist estretament relacionat amb CPEB4. Alteracions en CPEB4 poden provocar un desequilibri en la diferenciació d'eritròcits i en l'homeòstasi del ferro i l'oxigen a l'organisme. CPEB4 és induïda durant el procés de diferenciació per Gata1 i Tal1, adquirint una expressió molt elevada i jugant un paper clau en la finalització de l'eritropoesi. A la vegada que la seva transcripció incrementa, CPEB4 s'uneix al complex d'iniciació de la traducció eIF3 i reprimeix la traducció d'un gran nombre de mRNAs així com el seu propi als eritròcits, permetent la terminació del procés (Hu et al., 2014). Aquesta capacitat de CPEB4 de reprimir-se a ell mateix en un bucle negatiu és essencial per a aquest procés del desenvolupament.

S'ha descrit el seu paper en diversos tipus tumorals, sempre amb certa controvèrsia ja que té efectes oposats depenent del teixit i l'estadi de la malaltia; CPEB4 és una proteïna en la que la seva funció depèn completament del context en el que es trobi.

### 3.5.3. CPEB4 en càncer

CPEB4 participa en processos cancerígens en tipus de teixits molt variats i té efectes pleiotròpics que comprenen proliferació, invasió, metàstasi i evasió del sistema immunitari.

Estudis amb cèl·lules tumorals del tipus cèl·lula **pulmonar** no petita (NSCLC) mostren que CPEB4 promou la migració i invasió d'aquest tipus tumoral per la via d'Akt amb regulació també de Snail i MMP3. En aquest estudi també veuen que la producció de ROS que es veu incrementada quan CPEB4 no hi és fent relluir la implicació complexa d'aquesta proteïna en l'aparició de malaltia <sup>220</sup>. Un altre estudi, però, va demostrar que en pacients amb càncer pulmonar avançat, CPEB4 és un marcador de curta supervivència i per tant de mal pronòstic <sup>221</sup>.

El càncer de **pàncreas**, així com la majoria de lesions malignes, és una malaltia complexa a nivell genètic que resulta de l'alteració de l'expressió de molts gens i l'alteració de vies de senyalització variades. S'ha vist que la sobre expressió de CPEB4 en càncer de pàncreas i concretament en adenocarcinoma del conducte pancreàtic (PDA) és molt clara donant suport al creixement tumoral, la vascularització i la invasió. CPEB4 activa mRNAs que estan generalment silenciats, entre ells destaca l'activador de plasminogen de teixits (tPA) que tot i que els nivells de mRNA no varien entre teixit normal i teixit tumoral, si que ho

fa la proteïna. Moltes altres proteïnes es van veure incrementades en PDA, però les més significatives estaven relacionades amb factors de traducció (proteïnes ribosomals, factors d'iniciació de la traducció i subunitats del complex d'iniciació) <sup>222</sup>.

CPEB4 s'ha vist incrementada durant la progressió primerenca de **melanoma** i sembla ser que aquestes cèl·lules es tornen dependents de CPEB4 per a la prevenció de les aberracions mitòtiques i el pas de G1 a S durant el cicle cel·lular. S'ha vist que els principals responsables d'aquest efecte i que són regulats per CPEB4 són l'oncogen anomenat factor de transcripció associat a microftalmina (MITF1) i el modulador del trànsit de vesícules RAB7A <sup>223</sup>.

S'han dut a terme també diferents línies d'investigació pel que fa al paper de CPEB4 en tumors del **cervell**. La tendència general és que CPEB4 incrementa en el diferents tipus de lesions tumorals i promou l'agressivitat d'aquestes així com la proliferació i la vascularització <sup>222</sup>. L'astrocitoma és un dels tumors més comuns i més agressius del sistema nerviós central i l'expressió de CPEB4 s'ha vist elevada en aquestes cèl·lules tumorals. De fet, aquest increment d'expressió s'ha relacionat amb una major agressivitat tumoral en relació a la capacitat de proliferació, clonicitat i invasió i és considerat un marcador de mal pronòstic. Un dels principals participants en aquest increment de malignitat és la pujada de Vimentina <sup>224</sup>. CPEB4 s'ha descrit també com un bon marcador de mal pronòstic en pacients amb glioblastoma i s'ha vist com la seva supressió redueix la proliferació de cèl·lules derivades d'aquest tipus de tumor <sup>225</sup>. També s'ha vist un increment en invasió i migració que podria estar relacionat amb l'increment d'expressió de MMP9 i MMP2 derivats de la sobre expressió de CPEB4 <sup>226</sup>.

En relació amb CPEB4 i Vimentina, estudis corroboren la seva interacció i la seva participació en càncer de **mama**. En aquest tipus de càncer també s'observa un increment d'expressió de CPEB4 i s'associa a increment de metàstasi en pacients. El mecanisme pel qual CPEB4 assoleix un increment en el potencial metastàtic i de fer EMT de les cèl·lules es basa en l'increment d'expressió de Vimentina promogut per CPEB4 <sup>227</sup>.

Altres estudis han relacionat CPEB4 amb carcinoma **colorectal** i han vist que és un bon marcador de pronòstic reduint la supervivència dels pacients quan es troba sobreexpressada <sup>228</sup>. Això podria ser degut a que durant el càncer colorectal, la sobre expressió de CPEB4 incrementa Bcl-xl i redueix Bax, disminuint d'aquesta manera l'apoptosi de cèl·lules aberrants i promovent la progressió de cèl·lules tumorals. Això s'ha relacionat en part amb l'expressió reduïda del miR-203, que és un regulador negatiu de CPEB4 <sup>229</sup>.

En el cas del càncer **gàstric**, s'ha observat també una pujada en l'expressió de CPEB4 en els teixits amb conversió maligna i s'ha provat com a un factor relacionat amb increment de metàstasi i pronòstic desfavorable. S'ha demostrat que aquest efecte de CPEB4 és a través de l'EMT mediada per ZEB1 <sup>230</sup>.

CPEB4 també s'ha relacionat amb el càncer de **cèl·lula escamosa de coll i cap** però en aquest cas ha estat considerat un gen supressor de tumors. En el grup d'en Tao van observar disminució en l'expressió de CPEB4 en mostres de pacients d'aquest tipus tumoral i ho van considerar també un bon marcador de pronòstic ja que estava negativament associat

amb els graus histològics de les mostres. La híper-metil·lació de CPEB4 pot ser el responsable de la seva disminució <sup>231</sup>.

L'**osteosarcoma** és un tipus tumoral maligne poc comú de l'os associat a elevada agressivitat i a metàstasi primerenca amb un perfil genètic molt heterogeni. Aquest s'ha relacionat amb CPEB4 a través dels RNAs llargs no codificants (lncRNAs), concretament el RP11-361F15.2 que promou la tumorigènesi estimulando la polarització dels macròfags en TAMs que permeten la immunotolerància del teixit i per tant la migració i invasió dels tumors. En aquest sentit, aquest lncRNA activa l'expressió de CPEB4<sup>232</sup>.

El cas del **fetge** sembla diferent a la resta ja que CPEB4 té funcions dependents de l'estadi de la malaltia. Estudis han demostrat que CPEB4 es veu disminuïda en molts casos de HCC, els investigadors suggereixen que la baixada de CPEB4 es deu parcialment a la pujada del miR-550a i que aquest axis incrementa el potencial migratori i invasiu de HCC <sup>233</sup>. El paper de CPEB4, però, sembla ser complex i dependent de l'estadi del tumor i de fet s'han arribat a mostrar resultats paradoxals, ja que en altres estudis s'ha vist incrementada en estadis primerencs i disminuïda en estadis avançats <sup>234</sup>. Per aquest motiu van classificar l'efecte de CPEB4 en HCC com a bifàsic i associat a estadi tumoral amb possibilitat d'exercir funcions oncogèniques i supressores.

El paper de CPEB4 a la metàstasi s'ha revisat en molts estudis i tots semblen anar en la mateixa direcció indicant que CPEB4 promou invasió i metàstasi per regulació de vimentina o TGFβ<sup>235</sup>.

#### 3.5.4. CPEB4 com a diana terapèutica

El HCC és un tipus tumoral molt resistent a quimioteràpia i sol ser diagnosticat en estadis molt avançats, fet que dificulta les opcions de tractament i incrementa la mortalitat. Hi ha una necessitat sense precedents per al desenvolupament d'estratègies terapèutiques efectives i segures que permetin alleugerar el patiment dels pacients. Per tal d'assolir aquest objectiu és essencial entendre els mecanismes moleculars i cel·lulars involucrats en el procés de malignitat i relacionar-los amb els riscos més presents a la nostra societat com és l'obesitat.

En aquest sentit, CPEB4 és una proteïna que juga en paper tant protector com promotor de malaltia i per tant és essencial definir el marc en el qual aquesta pot ser utilitzada com a estratègia terapèutica.

D'entrada podríem afirmar que en HCC, aquesta proteïna no seria una bona diana terapèutica ja que juga un paper més aviat protector segons els nostres resultats. Això està recolzat per altres dades del nostre laboratori i altres publicacions que descriuen un paper de CPEB4 en la resposta a estrès a través de la via de UPR <sup>216</sup>. En aquest cas, CPEB4 incrementa als hepatòcits per a restablir l'homeòstasi cel·lular com a resposta primerenca a un estrès. Una vegada CPEB4 ha realitzat la seva funció, els nivells de la proteïna baixen, però podríem dir que es requereix per a confrontar l'esteatosi del fetge. També és important

seu paper activador de la traducció i expressió de PFKFB3 la relaciona amb el desenvolupament de fibrosi i amb càncer <sup>70</sup>.

CPEB4 juga un paper important en el creixement tumoral i la neovascularització d'aquests en altres tipus de tumors com pàncreas, adenocarcinoma, glioblastoma, melanoma i càncer de mama. També s'ha relacionat amb malalties neurodegeneratives.

El desenvolupament d'inhibidors petits de CPEBs o de teràpia vírica dirigida a cèl·lules que sobre expressin CPEB4 en certs tipus de tumors podria ser molt interessant.

## OBJECTIUS

---





## 4. OBJECTIUS

La nostra hipòtesi és que les proteïnes CPEBs i en concret la proteïna CPEB4 juga un paper fonamental en l'evolució de la malaltia crònica del fetge i l'aparició de lesions associades a obesitat o inflamació crònica. Creiem que CPEB4 pot tenir funcions duals, protectora i perjudicial, depenent de la fase de la malaltia en la que es trobi l'individu. Amés a més, la regulació post-transcripcional de l'expressió dels gens, podria estar re-programada de manera aberrant degut a l'exposició persistent a estrès nutricional (derivat de l'alimentació greixosa) i l'obesitat o sobrepès. Com a conseqüència, els animals romanen predisposats a presentar fenotips anormals i alteracions cel·lulars que podrien accelerar la progressió de la malaltia hepàtica cap a càncer de fetge.

Els objectius del projecte són:

- Identificar els mecanismes pels quals CPEB4 contribueix al desenvolupament de malaltia hepàtica i lesions al fetge des dels estadis inicials fins al final.
- Identificar els mecanismes biològics que relacionen l'obesitat o sobrepès amb el càncer de fetge.
- Estudiar el microambient inflamatori de les lesions hepàtiques en relació a la manca de CPEB4 i l'obesitat.
- Estudiar el potencial tumorigènic de les cèl·lules tumorals hepàtiques quan manca CPEB4.
- Intentar definir o acotar un marc d'acció terapèutica per a fàrmacs que podrien utilitzar CPEB4 com a diana.



# MÉTODES

---



## 5. MÈTODES

### 5.1. Models animals

#### 5.1.1. Generació de les línies *Knock out* (KO) de ratolí

Per a generar els animals transgènics per a CPEB4, primer vam haver de generar el ratolí que contingués la seqüència que permetés el tall de la proteïna d'interès (CPEB4<sup>lox/lox</sup>), per això, cèl·lules mare embrionàries de ratolí portadores del cassat  $\beta$ geo (el gen  $\beta$ -galactosidasa unit al gen de resistència a neomicina) a l'intró 1 de *Cpeb4* i seqüències loxP flanquejant l'exó 2 (clon EPD0060\_4\_E10; Sanger Institute) van ser microinjectades en blastòcits en desenvolupament. El ratolí quimèric resultant (CPEB4<sup>+/loxflp</sup>) va ser creuat amb ratolins C57BL6/J. Posteriorment, el cassat  $\beta$ geo va ser eliminat creuant aquests ratolins amb d'altres expressant la recombinassa FlpO (Tg.Pcag-Flp), obtenint com a resultat animals KO condicionals CPEB4<sup>lox/lox</sup>. Per a obtenir els animals amb la deleció ubiqüa i constitutiva de CPEB4, els CPEB4<sup>lox/lox</sup> es van creuar amb animals que expressaven la recombinassa de DNA Cre sota el control del promotor humà del citomegalovirus (B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J). La deleció de l'exó 2 del gen de *Cpeb4* va causar un desplaçament del marc de lectura del mRNA i la generació de diversos codons stop prematurs que donava com a resultat animals deficients per a la proteïna CPEB4 a tot el cos (CPEB4<sup>KO</sup>). La descendència va ser mantinguda i barrejada amb línies de ratolins CD57BL/6J-129S. Els animals amb la deleció específica de CPEB4 als hepatòcits (CPEB4<sup>LKO</sup>) va ser obtinguda mitjanant l'encreuament dels animals CPEB4<sup>lox/lox</sup> amb animals transgènics per a Cre-albúmina. La descendència va ser creuada durant 5 generacions amb els CD57BL/6J. Per a la generació dels animals amb la deleció de CPEB4 a la línia mieloide (CPEB4<sup>MKO</sup>) els animals CPEB4<sup>lox/lox</sup> van ser encreuats amb línies de ratolins transgènics amb LysM-Cre<sup>T/+</sup> (de Jackson Laboratory). La descendència va ser també creuada amb la línia CD57BL/6J. Per a obtenir animals amb deleció induïble de CPEB4 es van creuar els animals CPEB4<sup>lox/lox</sup> amb animals transgènics amb Cre-ERT2 que requereix tractament amb tamoxifè per a esdevenir actiu i delectonar el gen. La dosi intra-peritoneal injectada de Tamoxifè (Sigma; H6278) era de 9mg/40g de pes del animal. Els animals amb Cre van ser sempre comparats amb el seu WT homòleg que també tenia Cre (sense lox). El genotipatge es va realitzar amb PCRs rutinàries amb mostres de cua. Els animals immunodeprimits van ser obtinguts de Charles River i eren del tipus *Athymic*.

#### 5.1.2. Genotipat

Per a extreure el material genètic a analitzar, es van tallar un petit fragment de la cua de cada animal (~ 5mm) i es van recollir en un eppendorf en 400ul de buffer de lisi de teixit (50mM Tris-Cl pH=8; 10mM NaCl; 10mM EDTA; 1% SDS; H<sub>2</sub>O) al que s'afegien 5ul de proteïnasa K (Sigma). Es deixaven incubant durant la nit a 55°C. Al dia següent es va

netejar la mostra amb una centrifugació 15min a màxima velocitat i 4°C. Posteriorment es recollia el sobrenedant en un tub nou i es precipitava l'hèlix d'ADN fent servir 400ul d'isopropanol. Aquest fil es va centrifugar 10min a 4°C i es va treure el sobrenedant deixant només l'ADN que era llavors rentat amb 500ul d'etanol al 70% i tornat a centrifugar 5min a 4°C. Finalment, s'extreia l'etanol, es deixava assecar i es re-suspensia amb 200ul d'aigua destil·lada durant 2h a 55°C. Aquestes mostres van ser llavors amplificades per PCR amb els primers adequats per als gens del Cre, CPEB4 o Lox i analitzats mitjançant llum UV en un gel d'agarosa al 2%. El kit utilitzat per a l'amplificació de la seqüència era GoTaq® G2 Green Master Mix (Promega). Els primers van ser demanats a Sigma. Condicions PCR: 94°C 4min/x35: 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 60s/72°C 7min/4°C infinit. Taula de primers:

CPEB4	Directe	GTGAGGAAAGCAGTATCTAGGGTC
	Revers	ACATAGTCACTAACAACTTGAGG
Cre-albúmina	Directe	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
	Revers	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
	Directe_control	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
	Revers_control	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
Cre-ERT2	Directe	CACCCGTTCTGTTGGCTTAT
	Revers	ATGTTTAGCTGGCCCAAATG
	Directe_control	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
	Revers_control	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
Cre-Lisina	Directe	CCCAGAAATGCCAGATTACG
	Directe	CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC
	Revers	TTACAGTCGGCCAGGCTGAC
Lox	Directe	CGCGTCGAGAAGTTCCTATT
	Directe	AGTGCTCTGCTGCTGTGCTA
	Revers	TGGCATCCATGCTTGTGTAT

### 5.1.3. Estudis animals

Els animals es van mantenir sota les condicions estàndards en cicles de llum i fosc de 12h a 21°C i amb accés a menjar i aigua en caixes de màxim 5 animals. El menjar va ser monitoritzat i canviat setmanalment mantenint 200g per caixa. A partir de setmana 6 d'edat, els animals mascles van ser assignats de manera aleatòria i es van dividir en dos grups, uns sotmesos a dieta greixosa (HFD: 60% greix, 20% proteïna i 20% carbohidrats; D12492, Research Diets) i els altres a dieta normal (LFD: 13% greix, 20% proteïna i 67% carbohidrats: 2014S, Envigo). A setmana 16 tots animals van ser injectats el mutagen dimetilnitrosamina (N0756, Sigma) a una concentració de 80mg/kg per via intraperitoneal. Alguns animals van ser sacrificats a les 48 hores després del tractament. Vam afegir Fenobarbital en l'aigua al 0,05% des de la setmana 20 fins al final del protocol. A setmana 26 vam extreure sang per a tots els animals per tal d'analitzar marcadors de dany hepàtic. Aquests animals van ser sacrificats a setmana 50 per sobredosi d'anestèsia i posats en condicions de dejú el dia previ a la necròpsia. Els animals immuno-deprimits van ser estabulats en condicions de total esterilitat al SPF de la Facultat de Medicina de la UB amb ventilació controlada i aigua i menjar *ad libitum*. Tots els protocols van ser aprovats per el Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal (CEEA) de la UB.

#### 5.1.4. Al·lografts

Ratolins nude i C57BL van ser injectats cèl·lules tumorals de fetge de ratolí obtingudes de ratolins KO induïbles amb tamoxifè per a CPEB4, les anomenades 2020B4. Concretament vam injectar 50.000 cèl·lules diluïdes en 200ul de PBS. Vam injectar cèl·lules WT al flanc dret i cèl·lules KO al flanc esquerre i van ser sacrificats a les 6 setmanes. Els tumors extrets van ser pesats i mesurats i guardats per a fer estudis amb proteïna congelada i amb teixit parafinat.

### 5.2. In vitro

Si no s'especifica el contrari, els productes químics van ser comprats a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Els medis de cultiu i els suplementos són de Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA) i els plàstics de TTP (Trasadingen, Suïssa). El medi de cultiu contenia DMEM 4,5g/l de glucosa, mix de nutrients F-12, sèrum fetal boví, 100U/ml de penicil·lina, 200mM de L-glutamina, aminoàcids no essencials i NaPyr 100mM. Les cèl·lules de ratolí 2020B4 i 2020B3 van ser obtingudes de tumors de fetge en els ratolins KO induïbles amb tamoxifè per a CPEB4. Les 2020B4 contenen el Cre i el Lox i per tant eren cèl·lules a les que es podia induir el KO.

#### 5.2.1. Proliferació

Per a quantificar la proliferació cel·lular es va fer servir l'assaig de cristall violeta (Sigma Aldrich) que marca el DNA. El cristall violeta va ser pesat i diluït en una solució d'etanol al 2% per aconseguir una dilució final de 0,2%. Les cèl·lules 2020B4 van ser plantades a una densitat de 5000 cèl·lules per pou en plaques de 12 pous (Corning). L'assaig de proliferació tenia una durada de 4 dies, i per cada dia hi havia una placa independent plantada a la vegada que va ser extreta de l'incubador 24h després que l'anterior. Així doncs, posteriorment a les primeres 24 hores, els medis van ser extrets dels pous i aquests van ser rentats amb PBS (Reactiva). Una vegada extret el PBS, 500ul de cristall violeta van ser introduïts a cada pou i incubats durant 15min al *shaker* a temperatura ambient. El cristall violeta va ser rentat amb aigua de l'aixeta i diluït en 500ul de SDS al 1% durant 15 minuts al *shaker*. Finalment, una vegada la densitat colorimètrica era homogènia, l'absorbància va ser llegida a 520nm i 570nm a la màquina EPOCH.

#### 5.2.2. Colònies en agar

El test de colònies en agar és una prova dependent de la capacitat d'ancoratge en agar tot de les cèl·lules tumorals i serveix per a detectar la conversió maligna de les cèl·lules. Les



cèl·lules romanen en cultiu amb agar durant 10-30 dies i les colònies formades eren posteriorment fotografiades amb una escàner i quantificades per imageJ. Es van fer servir plaques p60 amb 3ml de volum d'agar a la base (0,8%) i a la superfície (0,7%), un volum de 1,5ml de medi adequat per a les cèl·lules tumorals esmentat anteriorment i una quantitat de 7500 cèl·lules per placa. Les plaques van ser conservades a 37°C i les cèl·lules alimentades 2 vegades per setmana. Tot el procés requereix condicions d'esterilitat.

### **5.3. Monitorització de colònies d'animals**

Totes les línies d'animals transgènics i salvatges (WT) van ser mantinguts i encreuats a l'estabulari de medicina de la UB. Els encreuaments estaven formats per dues femelles i un mascle en edat reproductiva (a partir de setmana 8) en una mateixa caixa. Aquests encreuaments eren monitoritzats setmanalment. Els embarassos tenien la durada estàndard de 21 dies i els animals eren genotipats a els 14 dies i deslletats als 21 dies d'edat. Tots els animals que no complien els requisits per a entrar a estudi eren sacrificats amb sobredosi d'anestèsia.

### **5.4. Necròpsies i recollida de mostres**

Tots els animals van ser sacrificats per sobredosi d'anestèsia (isofluorane inhalat) i la mort va ser corroborada per tall de diafragma. De cada animal vam recollir sang per a hemograma i per obtenció de plasma a través de punció intra-cardíaca. La melsa, els pulmons i el fetge van ser extrets de cada animal i mantinguts en sèrum fisiològic fred fins al processament de la mostra. El fetge i la melsa van ser pesats i mesurats amb un regle. Els pulmons van ser injectats amb formol per la tràquea per a la correcta conservació de l'estructura i posteriorment, una vegada extrets, introduïts a un casset i conservats en formol. Les mostres van restar en formol durant la nit fins al dia següent que eren rentades amb PBS i incloses en parafina. Pel que fa al fetge, aquest tenia un processament més complet ja que també va ser ultra-congelat amb nitrogen líquid i guardat a -80°C per a extracció de proteïna i RNA i fixat en OCT congelat tal i com es descriu en l'apartat 5.6.

### **5.5. Estudi macroscòpic**

L'estudi macroscòpic consistia en el pesat dels òrgans i l'observació amb un regle, de manera que vam poder valorar la mida, el pes i l'aspecte. El teixit més estudiat va ser el fetge, ja que prèviament a la fixació del teixit, realitzàvem fotografies de tots els lòbuls per davant i per darrere i després talls en rodanxes de tots els lòbuls. L'objectiu era trobar petites lesions que es poguessin diferenciar a ull nu i en cas de la seva presència, realitzar fotografies més específiques amb un regle al costat. D'aquesta manera vam poder quantificar i mesurar la mida de les lesions. Aquest estudi es va realitzar en cec per dos persones del grup.

## 5.6. Estudi histològic

Els teixits van ser fixats de dues maneres diferents per a l'estudi histològic. Per una part, alguns talls de fetge van ser sotmesos a un tractament amb PFA 4% 2h + PBS 2h + Sucrosa 20% durant la nit i després fixats en OCT (compost per tallar a temperatura òptima), congelats fent servir isopentà refrigerat amb nitrogen líquid i finalment guardats a -80°C. Per altre banda, la resta de teixits, van ser fixats en formol durant 24h i posteriorment rentats amb PBS i fixats en parafina. Es van realitzar talls de teixit de 4µm. De tots els teixits es van realitzar hematoxilina-eosina (H&E) i de totes les immuno-histoquímiques es van realitzar escàners amb *Nanozoomer 2.0HT - Hamamatsu* i *Nanozoomer Digital Pathology Image Software*. Després van ser visualitzades amb el programa NDPviwer.2 i quantificades amb el programa QuPath; la quantificació es feia sempre amb els mateixos paràmetres fixats en el programa i es corregien per el grup control. Els números obtinguts podien estar en píxels per µm<sup>2</sup>, en nuclis per µm<sup>2</sup> o en percentatge. Els teixits estudiats en cec per el Servei de Patologia del IRB van ser fetge, pulmons i melsa de tots els animals. Es va fer servir un sistema de valoració semi-quantitatiu: 0 absència d'alteracions; 1 lleu; 2 moderat; 3 intens i 4 molt intens. També es van quantificar el nombre de lesions i van ser classificades segons si eren hepatòcits alterats, nòduls hiperplàtics, adenomes, hepatocarcinomes o hemangiosarcomes. Fent servir les imatges escanejades de les H&E i el programa del QuPath, vam poder quantificar les lesions microscòpiques així com la seva superfície. La tècnica de Sirius Red es va realitzar per a determinar l'acumulació de col·lagen; la solució de tinció conté (àcid pícric saturat amb 0,1% de Direct Red 80). L'esteatosi va ser valorada amb la tinció d'Oil Red (Sigma Aldrich) a talls de fetge congelats en OCT de 10 µm. Les gotes lipídiques eren indicatives d'acumulació de greix. Segons el model i degut a l'aspecte final de la tinció, hem pogut fer quantificació i obtenir resultat amb percentatge o hem hagut de fet valoració semi-quantitativa per tres membres del grup en cec (amb puntuacions de 0 a 4). La tinció TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferasa (TdT) dUTP nick end labeling) detecta trencaments a l'ADN i marca els extrems 3'OH lliures amb la reacció enzimàtica TdT. Aquesta tècnica es va realitzar al Servei de Patologia del IRB. Les tincions d'immunohistoquímica (IHQ) de ki67 (Abcam; ab16667), CD68 (Abcam; ab76308), CD31 (Abcam; ab28364), pSTAT3 (Cell signaling; #9145) es van realitzar fent servir les gradetes de Sequenza (Thermo Scientific) amb els protocols definits per a cada anticòs. Anticòs primari, anticòs secundari corresponent a l'isotip del primari, rentats amb PBS i exposició de l'antigen amb el kit de detecció Dako Real Peroxidase/DAB +. La contra-tinció es va fer amb Hematoxilina Gil.

## 5.7. Anàlisi de sèrum

La sang va ser centrifugada a 10000rpm durant 10minuts a 4°C i el sèrum recollit i guardat a -80°C. Els nivells d'ALT i AST així com de triglicèrids i colesterol van ser mesurats per la instal·lació específica de l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB). Els nivells de IL6, KC,

CXCR2 i CXCL9 van ser mesurats amb el kit Milliplex Map mouse cytokine panel (MCYTOMAG-70K; Merck Chemicals).

### 5.8. PCR quantitativa a temps real

El RNA total de teixit va ser extret amb TRIzol (Invitrogen). El RNA cel·lular va ser extret fent servir el kit de RNeasy mini (Quiagen). Un microgram de RNA va ser retro-transcrit fent servir el QuantiTech reverse transcription kit (Quiagen) sempre seguint les indicacions del fabricant. La PCR quantitativa a temps real va ser realitzada a l'aparell ABI Prism 7900 HT cycler (Applied Biosystems) i fent servir PowerUp SYBR Green Mater (ThermoFisher) o Taqman Universal Mastermix (Applied Biosystems). Totes les quantificacions van ser normalitzades per el seu control endogen corresponents i dutes a terme per duplicat; IL6 (Mm00446190\_m1), TNF (Mm00443258\_m1) CPEB1 (Mm01314928\_m1), CPEB2 (Mm00616239\_m1), CPEB3 (Mm01204299\_m1), HPRT (Mm03024075\_m1). Els paràmetres dels cicles de la PCR van ser 95°C per 10' seguit de 40 cicles a 95°C per 15" i 60°C per 1'. Els resultats es van obtenir amb el programa de Applied Biosystems Sequence Detection System 3.2 i analitzats amb el mètode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Els resultats es van mostrar a canvis es mostraven amb nombre de vegades mes que el control.

### 5.9. Hemogrames

La sang extreta era guardada en tubs anti-coagulants (Thermo Fisher; microvette 500 EDTA) i portada immediatament als laboratoris del Core de l'Hospital Clínic a on van realitzar hemogrames complets.

### 5.10. Western blot

Les proteïnes extretes van ser analitzades per Wester Blot (WB). Els anticossos utilitzats van ser: CPEB4 (CNIO 149C monoclonal 1/500), TGF $\beta$  (Abcam: ab61213), p16 (Abcam: ab211542), IL1 $\beta$  (Santa Cruz: sc-12842), MCP1 (Thermo Fisher: MA5-17040), pSTAT3 (Cell signaling: #9145), STAT3 (Abcam: ab76315), Caspasa3 (Cell signaling: #96645), p21 (Santa Cruz: sc-6246),  $\alpha$ SMA (Abcam: ab7817), CD31 (Abcam: ab28364), VEGF (Abcam: ab1316). Com a control de càrrega vam fer servir GAPDH (Santa Cruz, 1/1000),  $\alpha$ -tubulina (Sigma, 1/1000) o  $\beta$ -actina (xx). Les imatges van ser adquirides amb l'aparell LAS-4000 (Fujifilm, TDI, Alcobendas, Espanya) i les quantificacions amb el programa Multi gauge de Fujifilm seguint les instruccions del fabricant. Els resultats obtinguts es van normalitzar respecte al control de càrrega i després es calculava el canvi respecte al grup control.

### 5.11. Anàlisi estadístic

Les dades mostrades estan en mitja±error estàndard. Els resultats que seguien una distribució normal ( $P > 0,5$  del test de Kolmogorov-Smirnov) van ser comparats fent servir procediments estadístics paramètrics (Test T-student i ANOVA seguits per Test de comparacions múltiples de Bonferroni). Els resultats que no es distribuïen de manera normal van ser comparats amb tests no paramètrics (Kruskal-Wallis ANOVA d'un sol sentit i el test de Mann-Whitney-U). Les dades es van considerar significatives a  $p < 0,05$ .



## RESULTATS

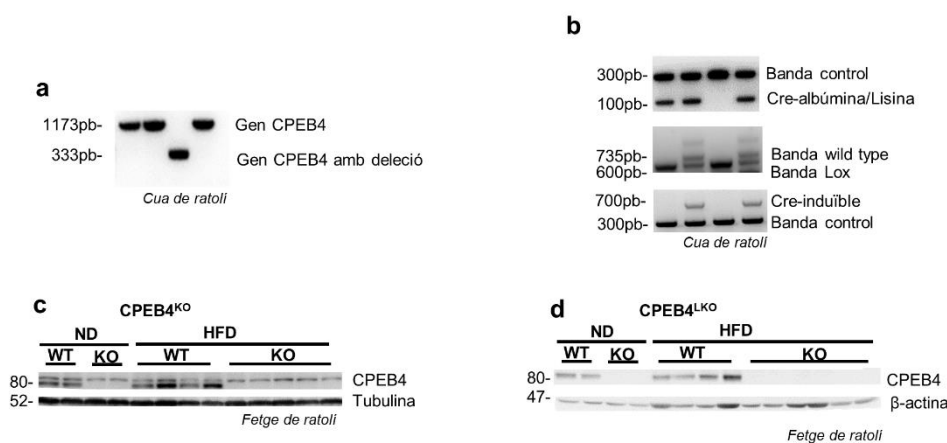
---



## 6. RESULTATS

### 6.1. Obtenció de ratolins KO per a CPEB4

Per a generar els grups d'animals per l'estudi, vam fer servir ratolins parentals transgènics C57BL cedits pel laboratori del Raül Méndez de l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB), i vam fer els encreuaments necessaris. Primerament vam seleccionar els animals amb el genotip adequat mitjançant PCR tant per al grup KO de cos sencer ( $CPEB4^{KO}$ ; expressió de CPEB4 controlada per un promotor constituït a totes les cèl·lules del cos, CMV) com per als hepatòcits ( $CPEB4^{LKO}$ ; expressió de CPEB4 controlada per el promotor albúmina d'hepatòcits) i la línia mieloide ( $CPEB4^{MKO}$ ; expressió de CPEB4 controlada per el promotor de Lisozima de cèl·lules mieloides) (*Figura 15a i b*). La inserció de les seqüències Lox a CPEB4 està dissenyada de manera que fa que la recombinasa Cre talli l'exó 2 del gen i això provoqui un desplaçament del marc de lectura i la generació d'una proteïna no funcional que serà degradada. Aquests animals parentals, van donar lloc a descendència que també vam genotipar mitjançant PCR. Posteriorment, vam corroborar que els animals obtinguts no expressessin la proteïna de CPEB4 al fetge mitjançant Western Blot de teixit hepàtic (*Figura 15c i d*). Per a cada grup d'estudi vam generar el seu propi grup control *wild type* (WT) de manera que el grup WT per als KO d'hepatòcits també contenen el Cre-albúmina i els de la línia mieloide Cre-Lisozima, mentre que els WT per al grup KO de cos sencer no estan manipulats genèticament. Vam fer servir també animals amb un Cre induïble per tamoxifè que ens van permetre obtenir línies tumorals de fetge KO induïbles (*Figura 15b*).



**Figura 15. Knoqueig de CPEB4.** a) Resultat de la PCR d'animals  $CPEB4^{KO}$ , la banda de 1173parells de bases (pb) mostra un fragment del gen WT i la banda de 333pb mostra el fragment amb la deleció. b) Resultat de la PCR per als animals  $CPEB4^{LKO}$ , per una part seleccionàvem per Cre, amb la PCR que conté la banda de 300pb de control de l'experiment amplificant un gen no afectat per la manipulació genètica i a 100pb hi trobem el Cre-albúmina o lisina indicador de que l'animal té el Cre sotmès al promotor específic i per una altra banda seleccionàvem el Lox, requerit per a poder tallar CPEB4 amb la recombinasa Cre. En aquest sentit la banda de 735pb és la WT mentre que la banda de 600pb és la que confirma la presència de la seqüència Lox. Per últim, trobem el Cre induïble per tamoxifè (700pb) i la seva banda control (300pb). c) Expressió de la proteïna CPEB4 al model  $CPEB4^{KO}$ . d) Expressió de la proteïna CPEB4 al model  $CPEB4^{LKO}$ . ND: dieta normal; HFD: dieta greixosa.



## 6.2. CPEB4 limita el guany de pes corporal i l'acumulació de greix al fetge

El protocol utilitzat consistia en l'administració de dieta normal (ND) o dieta greixosa (HFD) a partir de setmana 6 d'edat als ratolins. Posteriorment, aquests animals van ser injectats de manera intra-peritoneal amb el mutagen dietilnitrosamina (DEN) a setmana 16, sotmesos a 0,05% de fenobarbital en aigua des de setmana 20 i sacrificats a setmana 50 (*Figura 16a*). Per al grup CPEB4<sup>KO</sup>, una part dels animals van ser sacrificats a setmana 16 48h després de la injecció del DEN per a analitzar la resposta immediata al mutagen. El DEN és utilitzat generalment per models de carcinogènesi en fetge i el FB és un agent fibrogènic també utilitzat en models de fibrosi hepàtica, i va ser afegit amb l'objectiu d'estimular l'ambient inflamatori per tal de tenir un ambient promotor de tumors exacerbats. Aquest protocol es va dur a terme per igual als diferents grups de ratolins KO.

Hem de tenir sempre en compte quan intentem entendre el paper de CPEB4 en malaltia que s'ha demostrat que juga un paper molt important en la resposta a estrès per proteïnes mal plegades (UPR), de manera que té sentit que com més dany tingui un teixit i més necessari sigui CPEB4, més conseqüències fenotípiques veiem davant de la seva manca. És també per aquest precís motiu que veiem sempre un fenotip més marcat en els animals CPEB4<sup>KO</sup> HFD en el que trobem la suma de l'efecte de la manca de CPEB4 a tots els tipus cel·lulars. Amés, CPEB4 s'ha vist involucrat en el creixement tumoral i la neovascularització d'altres tipus de tumors com pàncreas, adenocarcinoma, glioblastoma, melanoma i càncer de mama.

Pel que fa al guany de pes corporal al llarg del protocol (*Figura 16b*), observem una clara tendència a increment de pes en els animals CPEB4<sup>KO</sup> tant en ND com en HFD, de manera que els sotmesos a HFD engreixen més ràpidament al principi del protocol en comparació amb els WT HFD i els ND ho fan cap al final de protocol a partir de setmana 40. La baixada de pes a setmana 16 és a conseqüència de la injecció del mutagen DEN, i es pot apreciar com els animals més grassos pateixen una pèrdua de pes més significativa que no pas els animals ND. El grup CPEB4<sup>KO</sup> HFD es manté amb un pes lleugerament superior durant tot el protocol, tot i que això no arriba a ser significatiu, però al final de protocol, a partir de la setmana 45, aquests comencen a perdre pes de manera abrupta. Això és degut, probablement, al pobre estat de salut d'aquests animals. El pes final dels animals (*Figura 16c*) mostra com els CPEB4<sup>KO</sup> ND tenen un increment significatiu de pes a setmana 50 i com tots els grups sotmesos a HFD també incrementen el seu pes de manera significativa. Pel que fa al fetge, però, els animals HFD tenen un increment de pes o hepatomegàlia i tot i que els CPEB4<sup>KO</sup> HFD presenten una tendència a l'alça, les diferències no són significatives (*Figura 16d*). En el cas dels animals CPEB<sup>LKO</sup>, aquests segueixen un patró similar als KO de tot el cos però el fenotip és més suau i veiem menys diferències significatives (*Figura 16e-g*).

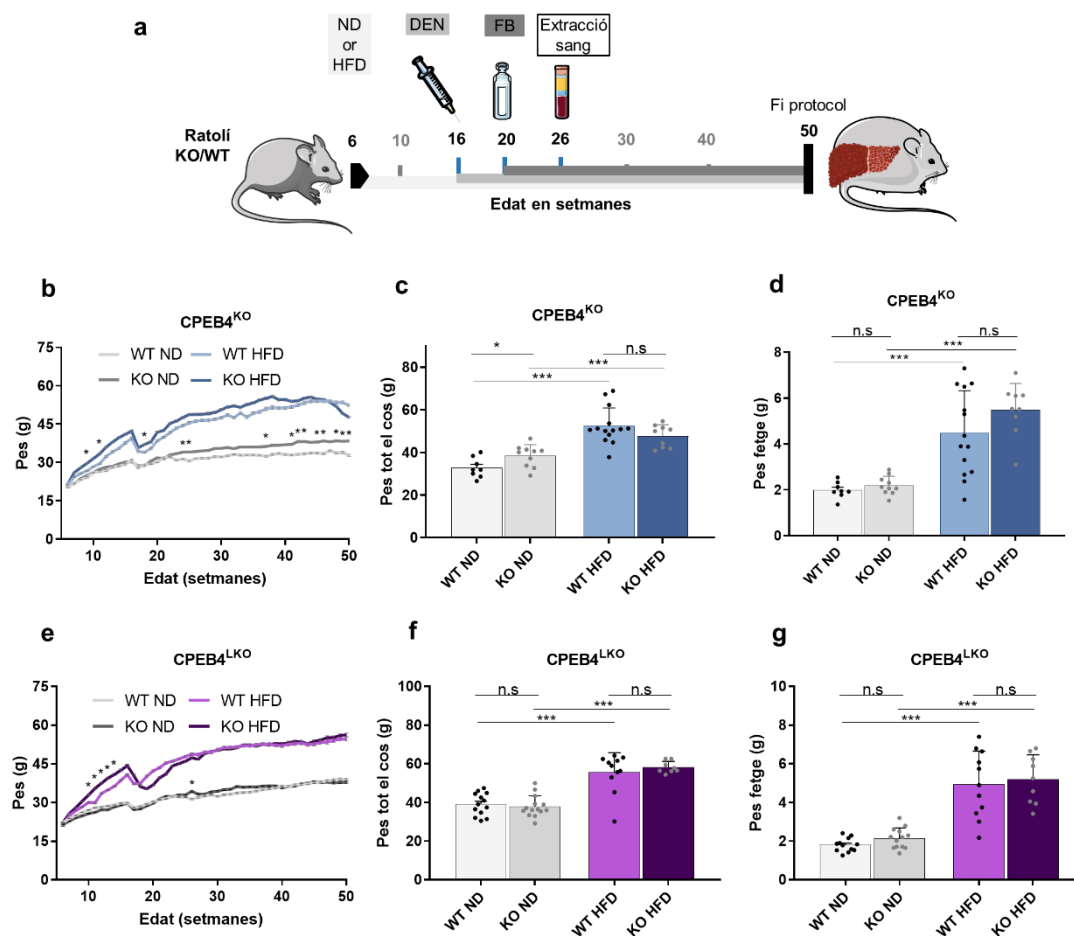


Figura 16. Els animals  $CPEB4^{KO}$  engreixen més ràpidament i tenen un pitjor estat de salut. a) Protocol seguit per la generació dels models animals d'estudi: HFD a mode d'estimulació crònica d'inflamació, DEN a mode d'iniciador de lesions cel·lulars i FB per a incrementar específicament el dany hepàtic. b) Increment de pes corporal al llarg de tot el protocol dels  $CPEB4^{KO}$ . c) Pes final dels animals  $CPEB4^{KO}$ . d) Pes del fetge al final del protocol  $CPEB4^{KO}$ . e) Increment de pes corporal al llarg de tot el protocol dels  $CPEB4^{LKO}$ . f) Pes final dels animals  $CPEB4^{LKO}$ . g) Pes del fetge al final del protocol  $CPEB4^{LKO}$ . DEN: dietil-nitrosamina; FB: fenobarbital.

La importància de CPEB4 en el nostre model animal va ser demostrada a través de la quantificació de l'expressió de la proteïna, vam observar un clar increment sota l'estímul de dieta greixosa (*Figura 17a-c*). També la vam mesurar a setmana 16 abans i després del DEN, i no s'observen variacions (*Figura 17d i e*). En referència als nivells de la resta de CPEBs, vam mesurar l'expressió genètica a través dels mRNA en fetge i no vam observar cap increment significatiu en els KO que pugui estar justificant una compensació de la manca de CPEB4 (*Figura 17f*). L'únic que vam apreciar és, en tot cas, una disminució de CPEB1 i CPEB2 en els  $CPEB4^{KO}$  ND i un increment significatiu de CPEB1 en resposta a dieta greixosa sense diferències significatives degudes al genotip. Ja que CPEB1 i CPEB4 són les CPEBs que tenen papers més semblants, i sabent que CPEB4 incrementa en resposta a HFD, té sentit que noquejar CPEB4 pugui promoure una pujada de CPEB1 que té una funció similar. Tot i així, no sembla que estigui compensant la funció de CPEB4 ja que les diferències no són significatives entre els grups sotmesos a HFD.

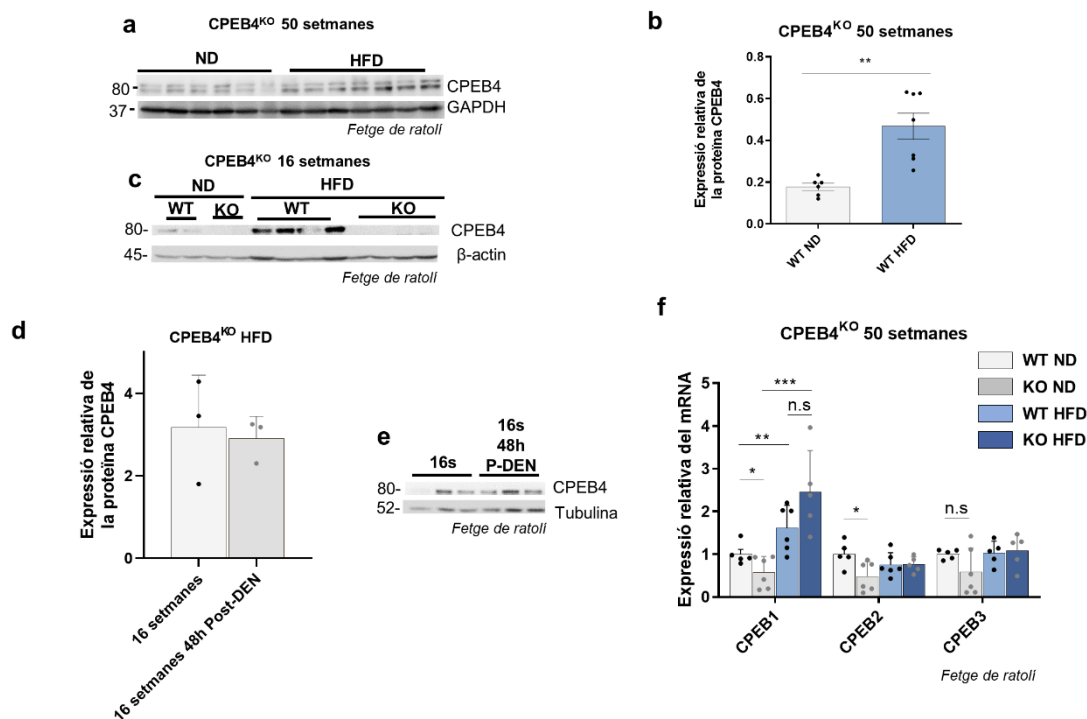
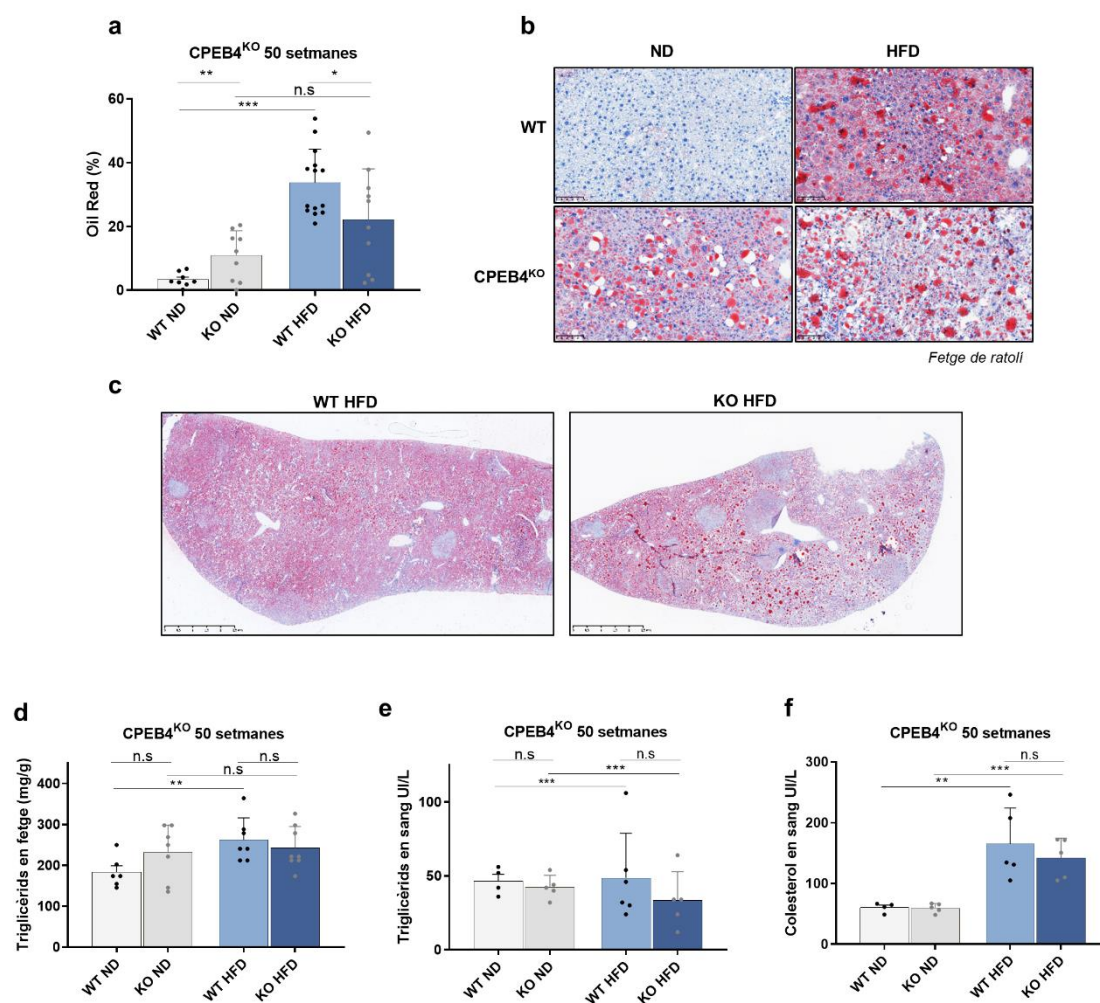


Figura 17. CPEB4 se sobre-expressa davant de l'estímul de la dieta greixosa. a-b) Expressió de la proteïna CPEB4 en els fetges dels animals CPEB4<sup>KO</sup> a les 50 setmanes, les diferències són significatives entre ND i HFD. Es va fer servir GAPDH com a control endogen d'expressió. c) Expressió de CPEB4 en els animals CPEB4<sup>KO</sup> en fetge a setmana 16 just després d'haver injectat el DEN. Es va fer servir β-actina de control endogen d'expressió de proteïna. d-e) Evolució del nivell d'expressió de CPEB4 als fetges d'animals CPEB4<sup>KO</sup> de tot el cos a setmana 16 després de 6 setmanes de dieta greixosa i a setmana 16 48h després de la injecció de DEN. f) Nivell d'expressió del mRNA de les altres CPEBs en teixit hepàtic dels animals CPEB4<sup>KO</sup>.

Estudis previs han demostrat que el paper de CPEB4 en la resposta UPR té també un efecte sobre el metabolisme dels lípids promovent l'acumulació d'aquests. En el nostre estudi hem vist com els animals CPEB4<sup>KO</sup> sotmesos a ND a 50 setmanes tenen una acumulació de greix en teixit hepàtic significativament superior al seu WT ND però curiosament, això no ho hem vist igualment representat en el grup CPEB4<sup>KO</sup> HFD (*Figura 18a i b*). De nou, tal i com hem descrit anteriorment, relacionem aquest efecte en els CPEB4<sup>KO</sup> HFD amb el fet de que aquests tenen un pitjor estat de salut i sobretot una major acumulació de lesions al fetge. Això ho podem veure clarament quan observem el teixit hepàtic del grup CPEB4<sup>KO</sup> HFD i el comparem amb els WT HFD; hi ha acumulacions de cèl·lules lesionades de manera generalitzada que comprimeixen el teixit i no permeten l'acumulació de greix (*Figura 18c*). També ens trobem amb que aquests animals CPEB4<sup>KO</sup> HFD estaven probablement iniciant un procés de caquèxia derivat dels processos tumorals i per tant tot el metabolisme està alterat i el greix corporal és consumit per a servir d'energia a les cèl·lules malignes. Així doncs, no podem garantir que el fenotip observat estigui relacionat amb l'efecte de CPEB4 sobre l'acumulació de greix al fetge i podem hipotetitzar que està més aviat relacionat amb l'avançat estat de la malaltia hepàtica. En referència a aquesta acumulació de lípids en teixit hepàtic, els animals KO d'hepatòcits mostren una tendència a incrementar el greix acumulat quan els animals estan sotmesos a HFD (dades no mostrades).

Per altre banda tenim les dades de triglicèrids en teixit de fetge i circulants en sang (*Figura 18d i e*). Aquests resultats indiquen que, una altra vegada, el contingut en triglicèrids en el grup CPEB4<sup>KO</sup> HFD és inferior a la resta. Tot i així, si que veiem una tendència no significativa dels CPEB4<sup>KO</sup> ND a tenir més triglicèrids en fetge, cosa que va en concordança amb el resultat de l'Oil Red. Per últim, el colesterol en sang al final de protocol incrementa amb la dieta però no es veu alterat per el genotip (*Figura 18f*).



**Figura 18.** L'absència de CPEB4 incrementa l'acumulació de greix al fetge sense la necessitat de consumir HFD. a-b) Quantificació tècnica Oil Red per a la detecció de les acumulacions de lípid en teixit congelat i imatges del teixit amb la mencionada tinció capturades mitjançant el programa ndpi.view que permet fotografiar tincions prèviament escanejades amb l'aparell nanozoomer. c) Imatges a mateixa amplificació (2x) de teixit hepàtic amb la tinció Oil Red en els grups sotmesos a dieta greixosa. d) Triglicèrids en fetge obtinguts de pols de teixit. e) Triglicèrids circulants en sang perifèrica. f) Colesterol circulant en sang perifèrica.

### 6.3. CPEB4 protegeix el fetge de l'aparició de lesions malignes sota l'efecte de HFD

La proteïna CPEB4 s'ha relacionat de manera generalitzada amb la promoció de tumors ja que s'ha vist sobre-expressada en diferents tipus tumorals. Curiosament, els nostres resultats indicarien que al fetge pot tenir l'efecte contrari ja que quan traiem CPEB4 de tots els tipus cel·lulars, l'aparició lesions amb característiques malignes incrementa en aquest teixit. Hem observat però que, tot i que la incidència general de lesions incrementa de manera significativa en els animals obesos, aquesta incidència no canvia a causa del genotip (*Figura 19a*). El que resulta més interessant, és que si comparem els animals WT HFD i els CPEB4<sup>KO</sup> HFD i ens fixem en els tipus específics de lesions, llavors si que trobem diferències (*Figura 19b*). En aquest sentit, el més significatiu és la incidència superior d'adenomes (AD) en els CPEB4<sup>KO</sup> HFD respecte al seu WT, però també hi ha una major incidència de carcinomes (C). Així doncs, mentre al grup WT HFD hi ha presència d'animals amb només hiperplàsia nodular (HN), el grup sense expressió de CPEB4 tots els animals que tenien HN presentaven lesions més greus com AD o C suggerint que les lesions adquireixen característiques malignes amb més facilitat quan manca CPEB4.

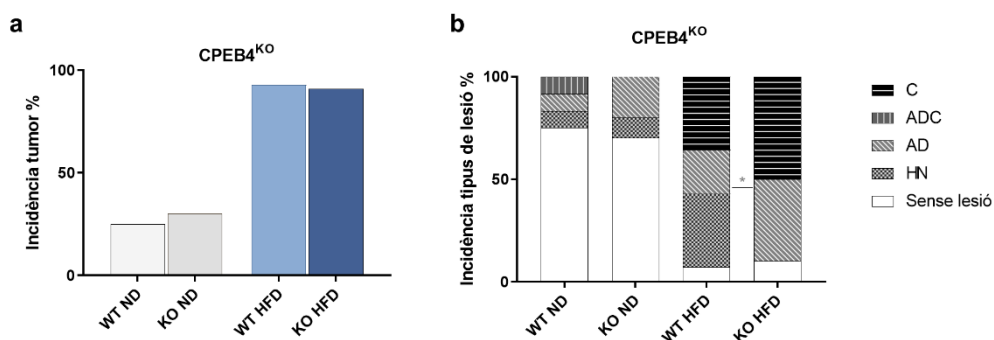


Figura 19. Les lesions al fetge KO incrementen a conseqüència de la dieta greixosa però la quantitat d'adenomes és significativament superior quan manca CPEB4. a) Incidència de lesions al fetge amb dades obtingudes de l'anàlisi d'una patòloga experta. b) Incidència de tipus de lesions específiques. Cada ratolí ha estat comptabilitzat dins de la categoria de lesió més greu (HN la menys greu i C la més greu), de manera que dins del grup KO HFD, tots els animals amb C i AD tenien també HN però això no es veu representat en aquest gràfic. HN: hiperplàsia nodular, AD: Adenoma, ADC: adenocarcinoma, C: carcinoma.

Si aprofundim encara més en les dades obtingudes dels tumors, llavors trobem dades més enlluernadores. La informació més significativa deriva del comptatge de les lesions (*Figura 20a-c*), i és que els animals obesos als que els hi manca CPEB4 a totes les cèl·lules del cos, desenvolupen un major nombre de lesions hepàtiques i aquests fetges presenten una aparença clarament menys saludable que la resta a nivell macroscòpic (*Figura 20b*). Veiem com la quantitat de lesions té una tendència a incrementar amb la dieta greixosa quan ho mirem macroscòpicament i també quan fem el comptatge microscòpic (*Figura 20c* i *d*), per tant no podem obviar que la dieta està jugant un paper essencial en la promoció de les lesions hepàtiques, però una altra vegada, ara a nivell microscòpic, el nombre de lesions en els KO HFD és significativament superior que en els WT HFD. Per altre banda, la informació obtinguda de la mida d'aquestes lesions, indicaria que aquestes són més grans

únicament a causa de l'efecte derivat de la dieta greixosa i no hi ha diferències significatives degudes a la manca de CPEB4 ni a nivell macroscòpic (*Figura 20e*) ni microscòpic (*Figura 20f*).

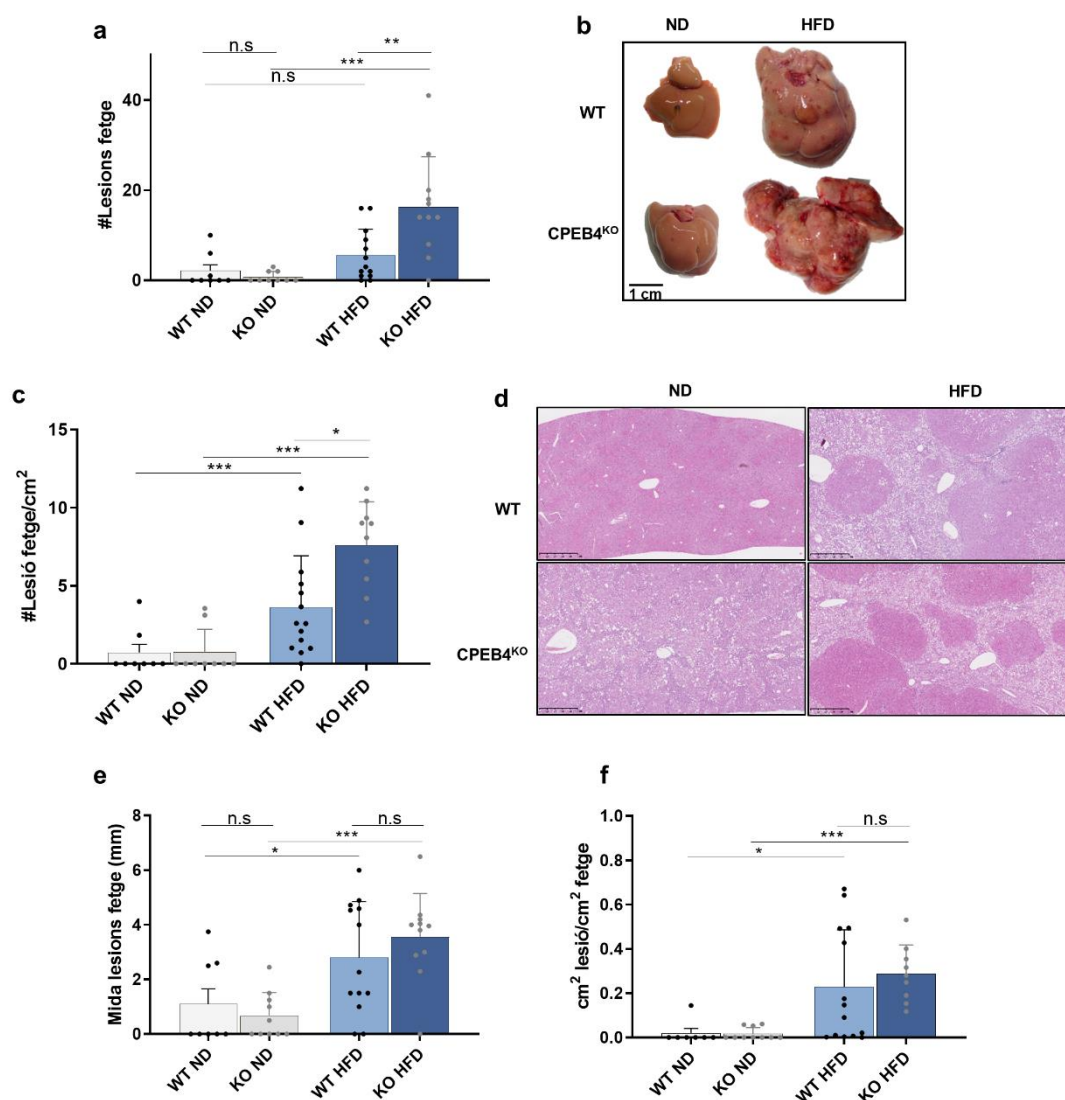


Figura 20. La quantitat de lesions al fetge dels animals CPEB4<sup>KO</sup> és significativament superior a nivell microscòpic i macroscòpic. a-b) Comptatge de lesions a nivell macroscòpic i imatges representatives dels fetges extrets durant la necròpsia. c-d) Comptatge de lesions a nivell microscòpic en tinció de H&E corregit per la superfície de teixit. Imatges representatives i a la mateixa escala d'H&E dels fetges dels ratolins, les estructures visiblement diferenciades als grups HFD són les considerades lesions. e) Mida de les lesions a nivell macroscòpic. f) Mida de les lesions a nivell microscòpic corregit per la superfície de teixit.

Quan vam estudiar les lesions al model CPEB4<sup>LKO</sup>, vam veure un fenotip més suau però tot i així, es mantenen les mateixes tendències. Podem observar com una altra vegada la incidència de lesions al fetge incrementa de manera significativa en tots els animals sotmesos a HFD, però en aquest cas hi ha un increment de més del 25% en el cas dels KO HFD respecte als WT HFD (*Figura 21*). Pel que fa al tipus de lesions específiques, tot i que no hi ha grans variacions, sí que es veu un increment en lesions més malignes (AD) en els

grups KO i especialment en el KO HFD (*Figura 21*). També veiem com en aquest cas, cap lesió va ser classificada com adenocarcinoma o carcinoma.

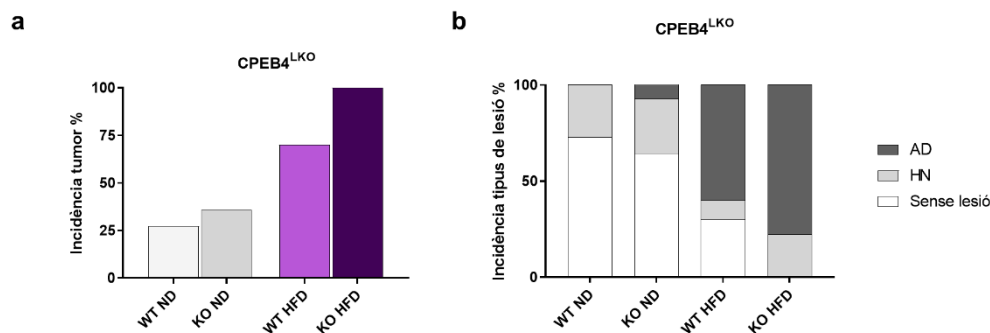


Figura 21. Les lesions al fetge KO d'hepatòcits incrementen principalment a conseqüència de la dieta greixosa però amb tendència a més en els KO i amb increment de malignitat. a) Incidència de lesions al fetge amb dades obtingudes de l'anàlisi d'una patòloga experta. b) Incidència de tipus de lesions específiques. Cada ratolí ha estat comptabilitzat dins de la categoria de lesió més greu (HN la menys greu i AD la més greu), de manera que dins del grup KO HFD, tots els animals amb AD tenien també HN però això no es veu representat en aquest gràfic. HN: hiperplàsia nodular, AD: Adenoma.

En l'estudi del nombre i mida d'aquestes lesions, quan manca CPEB4 només als hepatòcits, sembla que aquests també tenen capacitat de formar més lesions; primerament, el nombre incrementa només amb la dieta, però observem que ho fa significativament de manera més pronunciada en els KO HFD (*Figura 22a*). També s'observa com els fetges es troben en pitjors condicions de salut tot i que tots els fetges dels animals sotmesos HFD tenen aspecte de fetge gras tal i com és d'esperar (*Figura 22b*). En el comptatge de lesions a nivell microscòpic només es veu una tendència a l'alça a causa de la dieta; això està relacionat amb que probablement en un únic tall de teixit hem perdut informació que si que veiem a la superfície macroscòpicament (*Figura 22c*). Això es podria explicar si les lesions tenen mida suficient com per a ser detectades a ull nu de manera que mentre que les podem comptar durant la necròpsia observant tota la superfície del teixit i laterals dels talls, a la H&E on només veiem una petita fracció del fetge, no podem quantificar bé la magnitud de la presència de lesions. De fet, com veiem a les dades de la mida de les lesions, aquestes tenen una tendència a ser més grans a causa del genotip i en el cas de la mida en mil·límetres, les lesions són inclús més grans al KO ND destacant el paper de la manca de CPEB4 en el model (*Figura 22e i f*).

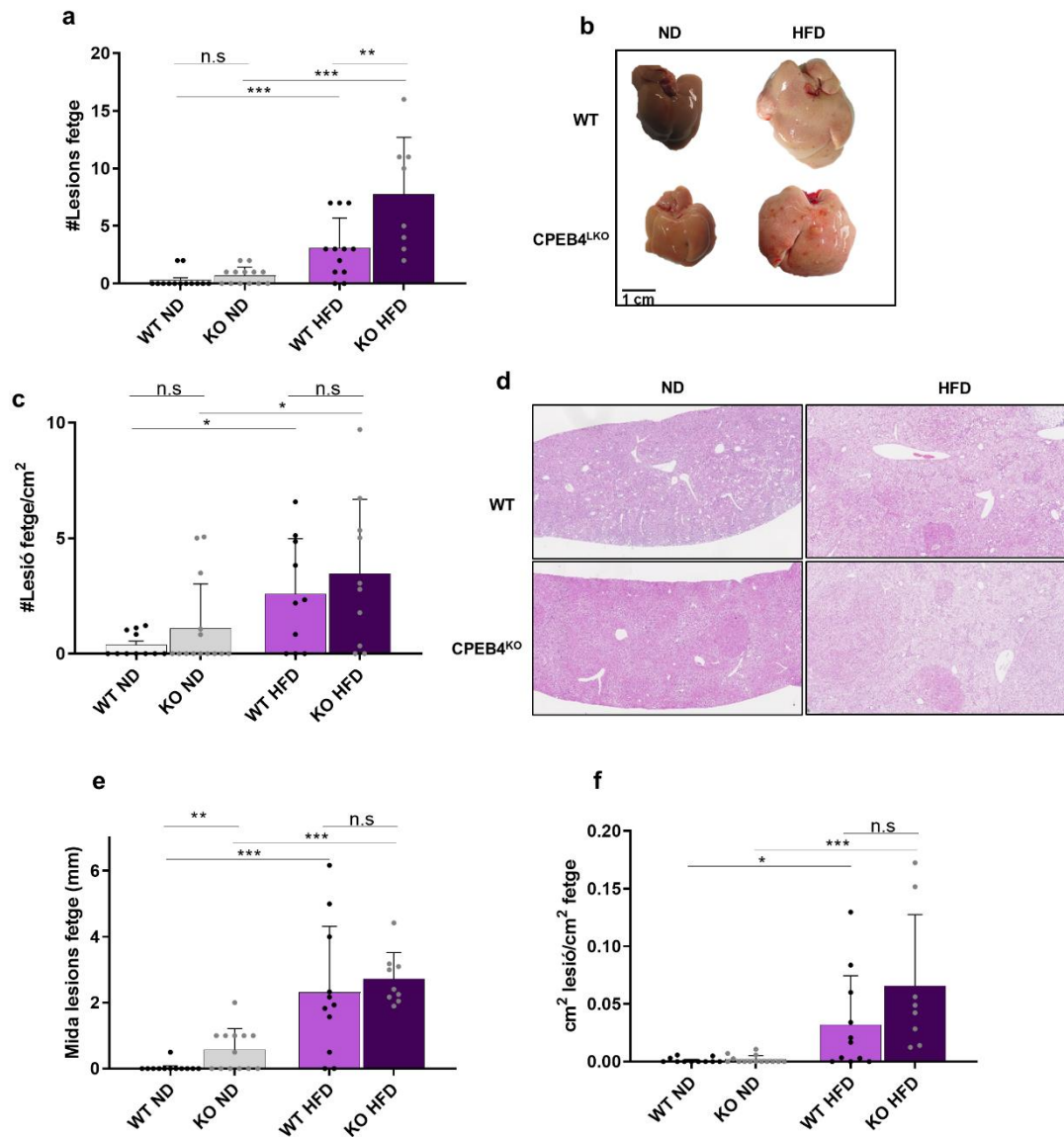


Figura 22. La quantitat de lesions al fetge dels animals CPEB4<sup>LKO</sup> és significativament superior a nivell macroscòpic. a-b) Comptatge de lesions a nivell macroscòpic i imatges representatives dels fetges extrets durant la necròpsia. c-d) Comptatge de lesions a nivell microscòpic corregit per la superfície de teixit. Imatges representatives i a la mateixa escala d'H&E dels fetges dels ratlons, les estructures visiblement diferenciades als grups HFD són les considerades lesions. e) Mida de les lesions a nivell macroscòpic. f) Mida de les lesions a nivell microscòpic corregit per la superfície de teixit.



#### 6.4. La manca de CPEB4 podria estimular l'entrada dels hepatòcits en senescència

S'ha demostrat anteriorment en models animals com el que hem fet servir nosaltres, que la carcinogènesi del teixit hepàtic està associada a l'apoptosi induïda pel DEN i la conseqüent activació de la proliferació per a regenerar el teixit danyat. D'aquesta manera, com més apoptosi causi el tractament, major serà la conseqüent proliferació i més efectiu serà el DEN. Així doncs, per a entendre si les diferències observades en el desenvolupament de tumors a setmana 50 podia tenir relació amb la reacció del teixit hepàtic al mutagen just després de la injecció, vam sacrificar animals dels quatre grups (WT i KO amb i sense dieta) de l'estudi CPEB4<sup>KO</sup> a setmana 16 i 48h després de la injecció del mutagen DEN. Vam analitzar els marcadors p16 i TGF $\beta$  que a la literatura s'han relacionat amb la parada del cicle cel·lular i l'entrada en senescència i vam veure un increment en els KO+HFD (*Figura 23a-c*). TGF $\beta$  és una citoquina inflamatòria que té capacitats pleiotròpiques i la seva influència avarca una gran varietat de tipus cel·lulars i processos biològics entre els que hi trobem la inflamació, la regeneració i senescència que poden tenir lloc en el nostre model. p16 és considerat un dels marcadors de senescència per excel·lència i presenta una tendència marcada a incrementar en els animals KO de cos sencer a setmana 16 (*Figura 23a*). Aquestes dues dades con conjunt, mostren que la manca de CPEB4 al teixit hepàtic podria estar provocant l'entrada en senescència de les cèl·lules que el componen. Aquesta senescència, que pot ser primerament una barrera protectora envers a la progressió de cèl·lules danyades amb potencial tumoral, pot resultar posteriorment una eina excel·lent per a que cèl·lules mutades adquireixin més característiques malignes i proliferin sense control causant càncer.

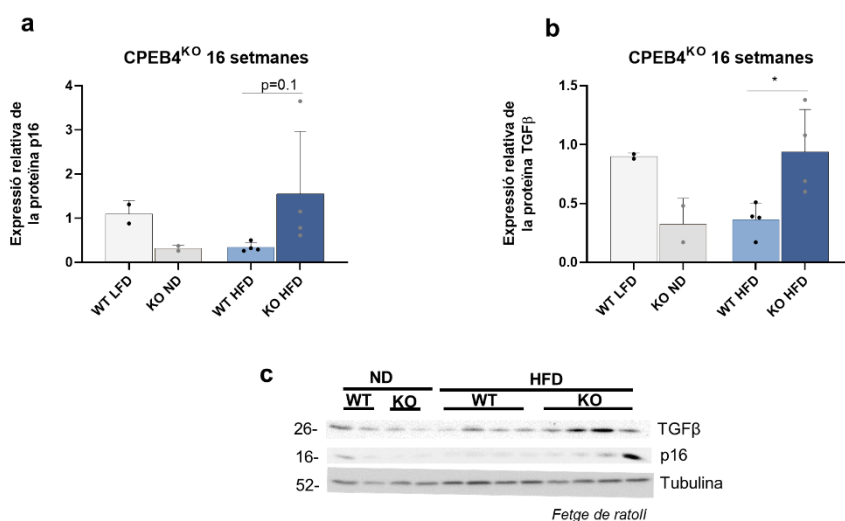


Figura 23. La manca de CPEB4 a tot el cos permet l'entrada en senescència de les cèl·lules danyades a setmana 16 48h després de la injecció del DEN. Dades de teixit hepàtic total. a) expressió de la proteïna p16, increment ( $p=0.1$ ) en el grup KO HFD. b) expressió de la proteïna TGF $\beta$ . c) Resultat experiment Western Blot per a p16 i TGF $\beta$ .

En concordància amb això, els animals CPEB4<sup>KO</sup> a setmana 16 i 48h després del mutagen tenien també nivells reduïts d'apoptosi (*Figura 24a-b*) i de proliferació (*Figura 24c-d*). Aquestes dades recolzarien la possibilitat de que el teixit KO hagi entrat en senescència ja que no està regenerant o morint com esperariem just després d'un dany cel·lular i tal i com veiem a final de protocol d'aquest grup.

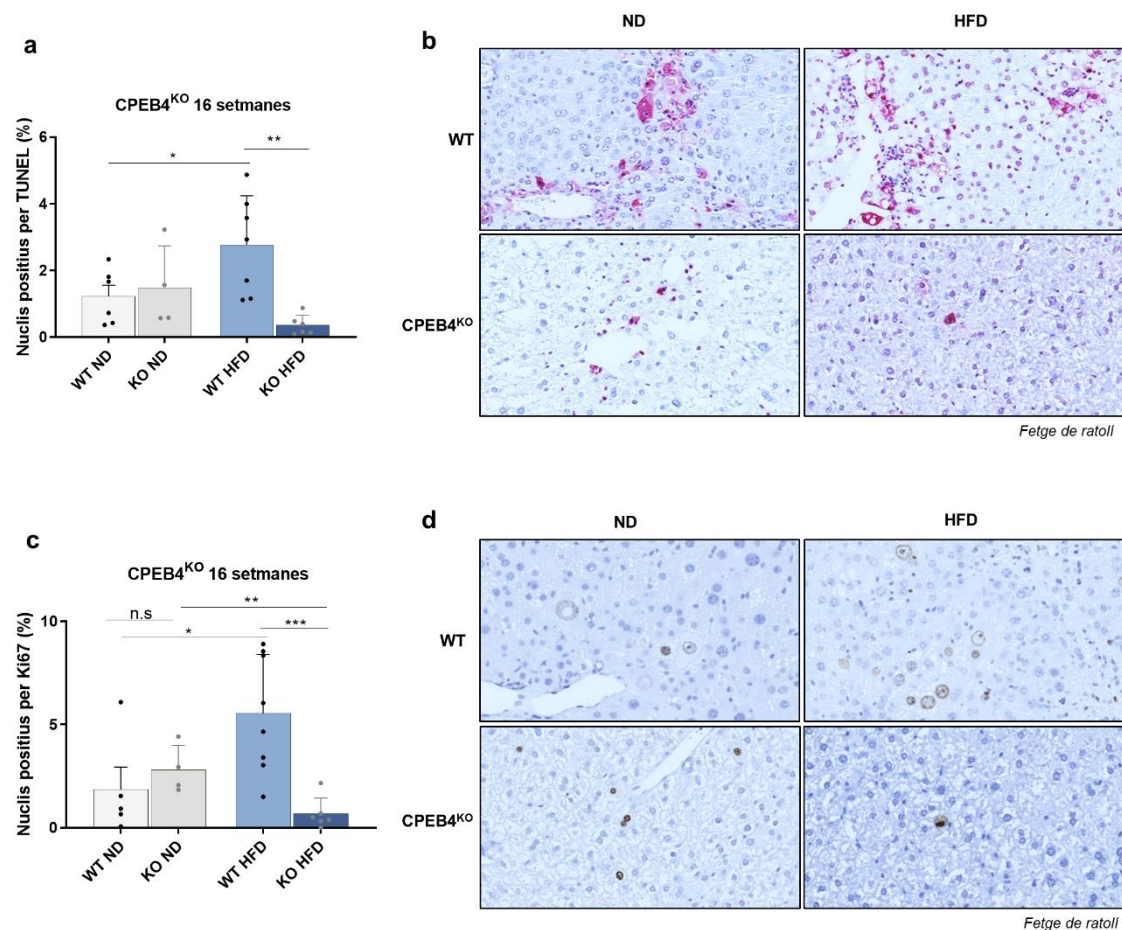


Figura 24. La manca de CPEB4 a tot el cos després de la injecció del DEN provoca que els animals sotmesos a HFD aturin la proliferació i apoptosi del teixit hepàtic. a-b) mort cel·lular per tinció de TUNEL. c-d) proliferació cel·lular amb tinció ki67.

És interessant que els CPEB4<sup>LKO</sup> a setmana 50 tenen també l'apoptosi i la proliferació del teixit reduïdes (*Figura 25a-e*). Tot i que parlem del model CPEB4<sup>LKO</sup> que és només d'hepatòcits, i que aquests no semblen tenir activades vies de senescència (p16 no incrementa) (*Figura 25f i g*), tenen lloc els mateixos processos biològics. Per tant podríem deduir que tot i que els mecanismes pel quals s'estan donant aquests processos difereixen entre models, la manca de CPEB4 manté els hepatòcits i potser altres tipus cel·lulars del teixit en un estat de quiescència que fa que no morin ni proliferin però que a la llarga això es tradueixi en la supervivència d'un major nombre de cèl·lules mutades que poden acabar donant lloc a lesions o alteracions del teixit. Aquest aspecte rellevant i complex revelat en aquesta tesi ha obert una nova línia d'investigació al nostre grup sobre la qual estem aprofundint.

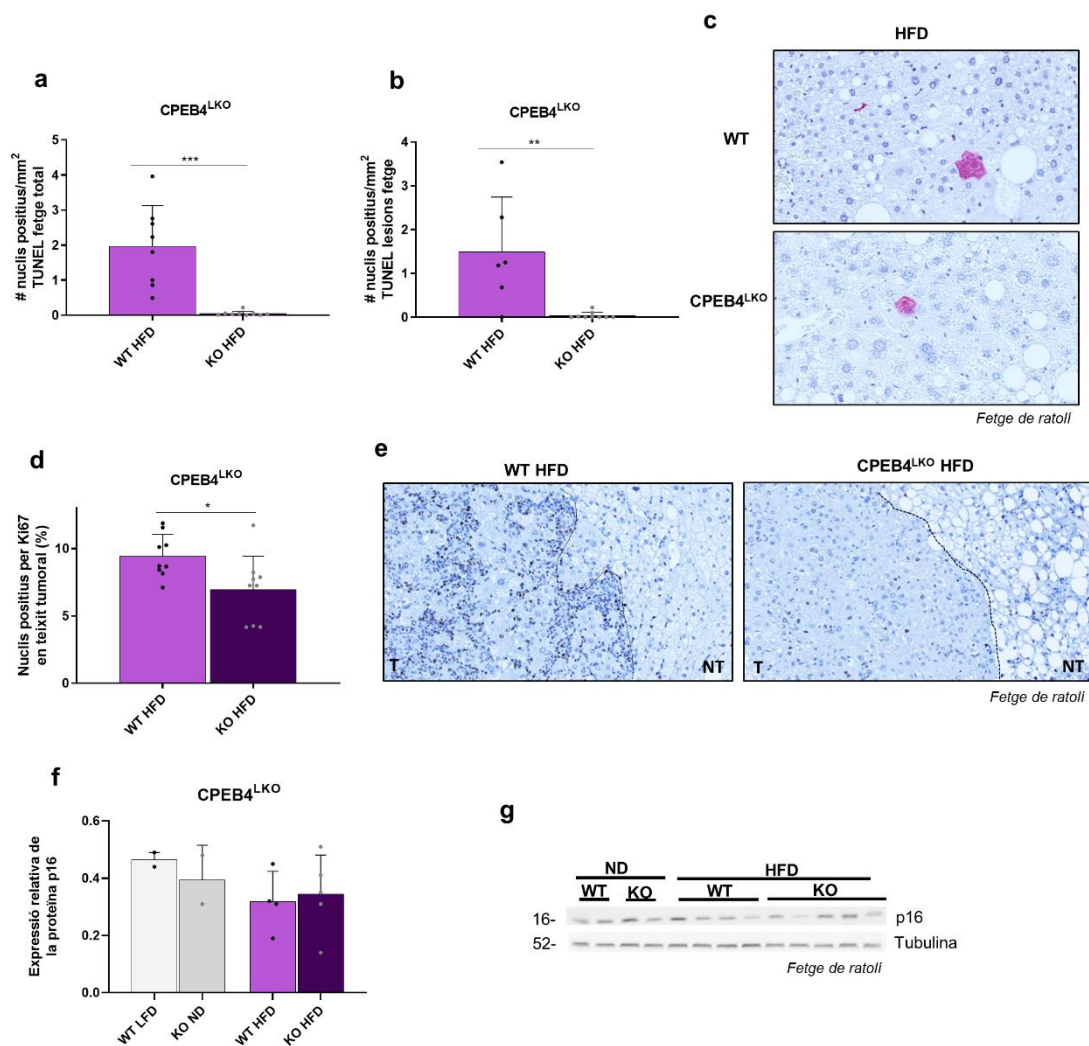


Figura 25. El model KO d'hepatòcits a setmana 50 presenta proliferació i apoptosi reduïdes al fetge. a-c) quantificació de l'apoptosi per tinció TUNEL. En (a) és la mort cel·lular en teixit total mentre que en (b) vam quantificar l'apoptosi a l'interior de les lesions. d-e) quantificació de la proliferació cel·lular mesurada per Ki67 en teixit tumoral. f-g) quantificació de la senyal de proteïna p16 en pols de fetge total.

Un altre procés que podria estar explicant l'increment de lesions al model KO d'hepatòcits, és la reducció d'infiltrat inflamatori. Com veiem amb el marcatge de CD68 (*Figura 26*) que marca macròfags en teixit, tant infiltrats com residents, hi ha una reducció generalitzada. Té sentit que si hi ha menys infiltrat inflamatori, hi hagi menys mort cel·lular i més evasió del sistema immunitari per part de les cèl·lules tumorals. La manca de CPEB4 als hepatòcits altera d'alguna manera la inflamació al teixit hepàtic.

Hem de destacar també, que la senescència que podria tenir lloc, no sembla una senescència tradicional ja que el màxim objectiu d'aquesta és reclutar les cèl·lules immunitàries necessàries a través del SASP i acabar desencadenant la mort cel·lular. En aquest cas, però, no veiem ni el reclutament immunitari ni la conseqüent mort cel·lular almenys a 48h.

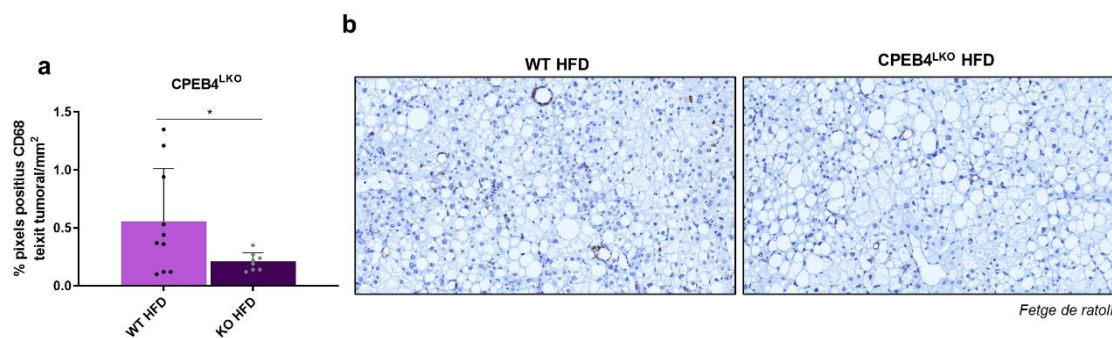


Figura 26. Els animals KO d'hepatòcits tenen menys macròfags al fetge. a-b) quantificació de CD68 en talls de teixit de fetge total.

### 6.5. Els hepatòcits KO per a CPEB4 són més tumorigènics

Per caracteritzar millor els hepatòcits tumorals, vam sotmetre a dieta greixosa a uns ratolins C57BL KO induïbles amb tamoxifè i vam injectar el DEN per promoure el desenvolupament de lesions al fetge. Vam monitoritzar la seva salut i quan hi havia alteracions en l'aspecte dels animals, els portàvem a punt final i n'extrèiem el fetge. D'aquests fetges vam aconseguir aïllar una línia cel·lular de tumor de ratolí a la que vam anomenar 2020B4 i a la que podíem induir el KO amb tamoxifè (*Figura 27c*). L'eliminació de CPEB4 de manera induïble, semblava tenir efectes diferents si era recent o la fèiem perdurar en el temps. Els hepatòcits silenciats durant 24h, mostraven una disminució en la corba de proliferació (*Figura 27a*) i en la pendent d'aquesta (*Figura 27b*), mentre que un silenciament d'una setmana incrementava aquests dos factors ( $p=0.06$  i  $p=0.07$ ). Pel que fa a la capacitat de formar colònies en agar, els dos tipus de silenciament provocaven un increment en el nombre i cap canvi en la mida d'aquestes (*Figura 27d-f*). Aquests resultats indicarien que els hepatòcits que no expressen CPEB4, i sobretot aquells que no l'expressen durant un temps suficient per a eliminar totes les restes de proteïna o per haver-se adaptat a aquesta manca, adquireixen unes capacitats tumorigèniques superiors a les que adquireix la mateixa línia cel·lular tumoral amb nivells endògens de CPEB4.

Ja que el nostre model representa una desaparició en CPEB4 prolongada en el temps, vam decidir fer servir aquestes cèl·lules induïdes durant temps prolongat per a injectar-les en animals. Vam generar llavors models d'estudi al·lografts que consistien en la injecció d'aquest tipus de tumors (2020B4) en ratolins idèntics a als que van donar origen a la línia tumoral (sense inducció del KO) i ratolins *nude*/immunodeprimits.

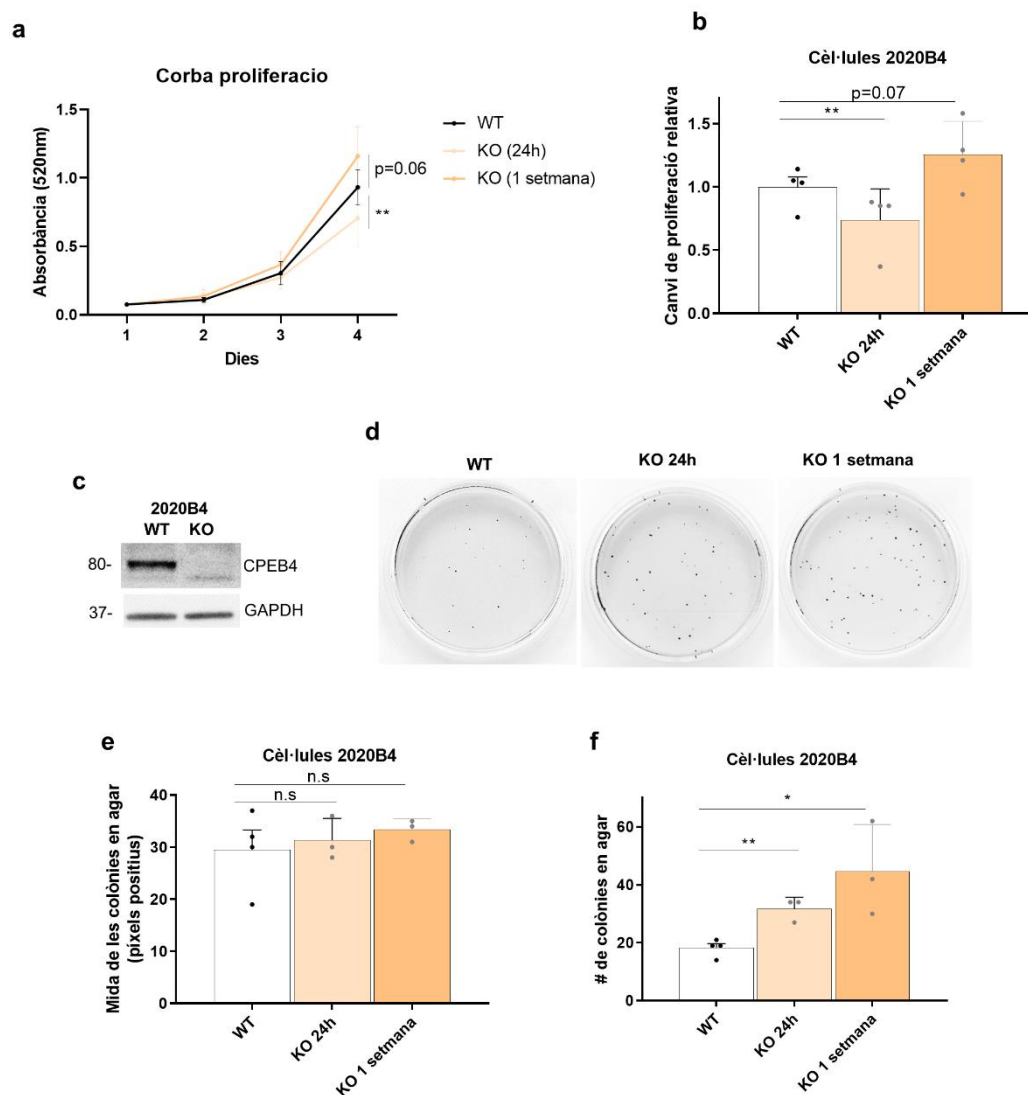


Figura 27. CPEB4 limita la tumorigenicitat dels hepatòcits *in vitro*. Tot realitzat en cèl·lules 2020B4 WT, silenciades per CPEB4 durant 24h i silenciades durant 1 setmana. a) Corba de proliferació (n=4). b) pendent del diferencial de proliferació. c) expressió proteica de CPEB4. d) plaques d'agar amb colònies quantificades en e i f. e) mesura de la mida de les colònies. f) mesura de la quantitat de colònies.

Així doncs, vam injectar aquestes cèl·lules (50.000 en 200ul) als flancs de les cuixes dels animals *nude* de manera que a la dreta hi trobàvem sempre el KO i a l'esquerra el WT (*Figura 28a-c*). El mateix es va realitzar en animals C57BL de la mateixa línia de ratolins de la que vam obtenir les cèl·lules tumorals (*Figura 28d-f*). Els resultats indiquen que les cèl·lules KO tenen capacitat de generar tumors més grans i també una tendència a que aquests donin lloc a tumors amb més probabilitat. Això corroboraria els resultats *in vitro* i posa en evidència la rellevància de CPEB4 en els processos tumorals dels hepatòcits.

Pel que fa als resultats dels ratolins *nude*, veiem que el pes dels tumors KO és significativament molt superior que en els WT (*Figura 28b*). Les diferències en incidència són molt reduïdes (*Figura 28c*), però això podria estar relacionat amb el fet de que són animals immunodeprimits i per tant les cèl·lules tumorals tenen menys barreres per a assentar-se al teixit i créixer sense dificultats. En els ratolins C57BL, el pes dels tumors torna a ser significativament superior (*Figura 28e*) i la incidència incrementa una altra vegada

indicant que la probabilitat de que es formin tumors és més del doble quan injectem cèl·lules KO (*Figura 28f*). Aquests dos resultats indicarien que un hepatòcit KO per a CPEB4 té més potencial de formar tumors que un de WT.

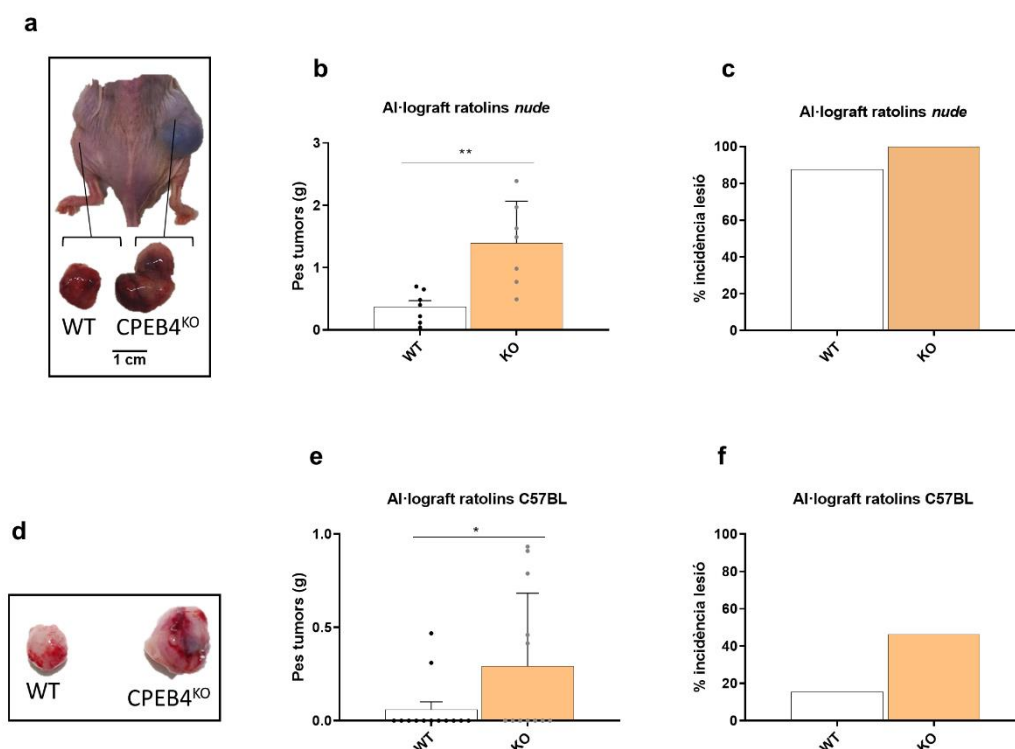


Figura 28. La manca de CPEB4 permet a les cèl·lules tumorals derivades d'hepatòcits desenvolupar tumors més grans en models al·lografts de ratolí. a-c) resultats obtinguts als ratolins nude/immunodeprimits, pes de tumors i incidència d'aparició. d-f) pes dels tumors i incidència d'aparició en ratolins C57BL.

## 6.6. La manca de CPEB4 a tot l'organisme podria estimular un micro-ambient tumoral

Una vegada ja sabem que els hepatòcits tumorals tenien més potencial tumorigènic, vam voler entendre què estava passant al model KO de tot el cos a 50 setmanes, ja que aquest tenia un fenotip més marcat que el model KO per a hepatòcits. Quan vam analitzar el sistema immunitari al model del CPEB4<sup>KO</sup>, vam observar que aquest estava sobre-expressat però els resultats suggerien que aquest podia tenir unes característiques fenotípiques de caire pro-tumoral (o tolerogènic).

En relació a CD68, aquest ens ha permès estudiar les estructures en forma de corona al fetge (hCLS). Les hCLS són macròfags que en algunes publicacions es descriuen com a CD11c<sup>+</sup>, que envolten els hepatòcits que han acumulat lípids al seu interior i estan moribunds i s'encarreguen de digerir-los i eliminar-los del teixit. Aquestes estructures són un marcador de NASH i sovint de fibrosi. Hem observat que els macròfags incrementen al fetge de manera significativa degut a la dieta greixosa però ho fan encara més quan manca CPEB4 i això succeeix tant amb dieta com amb sense (*Figura 29a*); té sentit ja que sabem que els fetges KO ND tenien una acumulació de greix superior als WT ND i per tant és

d'esperar que l'ambient inflamatori estigui incrementat. Fixant-nos en el teixit tumoral, no observem canvis (*Figura 29b*). Pel que fa però a les hCLS en teixit total, veiem que el nombre en el cas dels animals CPEB4<sup>KO</sup> HFD incrementa de manera significativa. Això estaria corroborant el NASH en els animals i l'estat general de malaltia exacerbat (*Figura 29c* i d). En la quantificació de proteïna de teixit en pols, es corrobora tot i que de manera no significativa, aquest increment de macròfags als fetges KO HFD (*Figura 29e* i f).

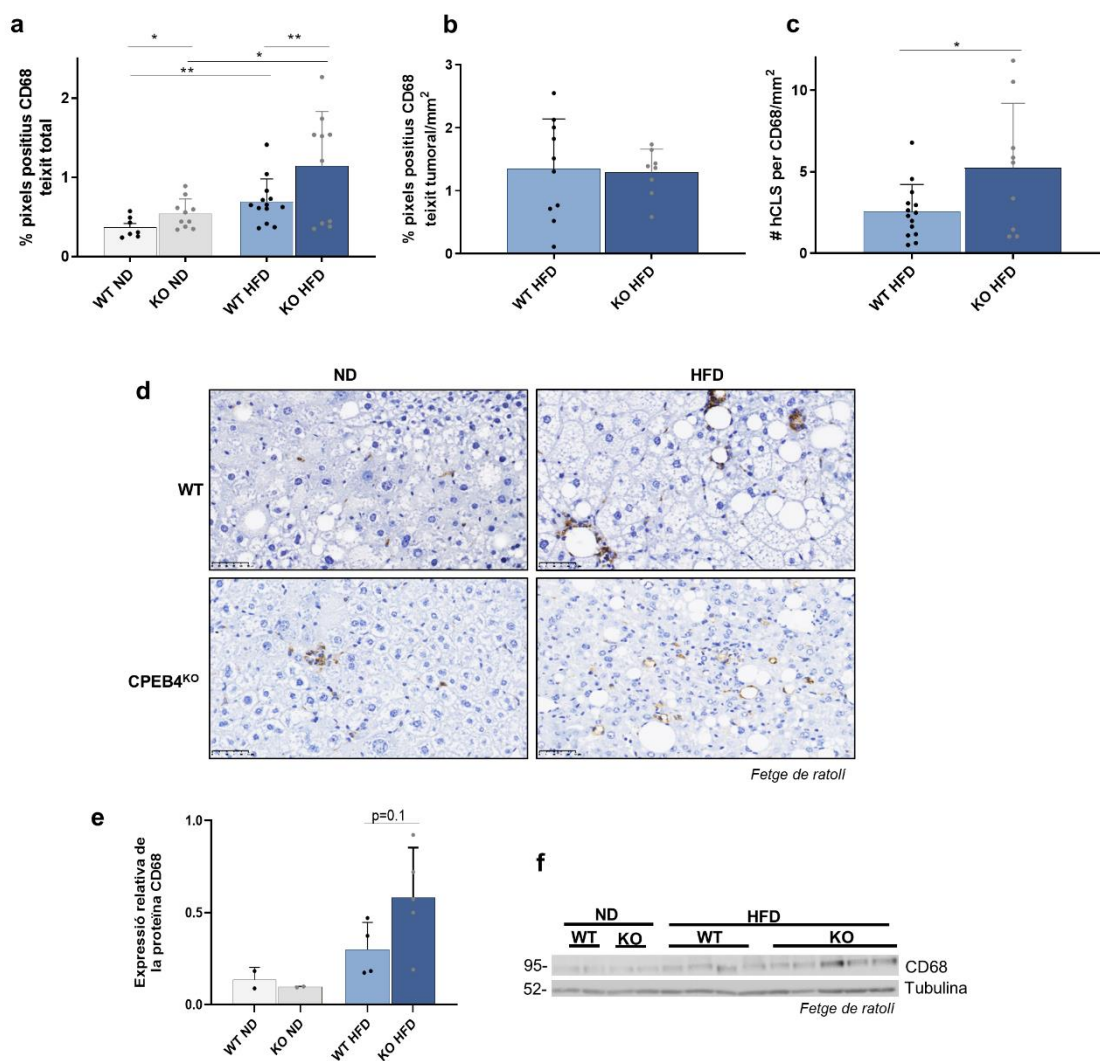


Figura 29. La manca de CPEB4 a tot el cos promou l'exacerbació de la inflamació al fetge a setmana 50. a) Quantificació del percentatge de píxels positius per CD68 en teixit total de talls de fetge. b) Percentatge de píxels positius per mm<sup>2</sup> de de teixit tumoral per CD68 en talls de fetge. c) Nombre de hCLS per mm<sup>2</sup> en talls de teixit total de fetge. d) Imatges de la tinció de CD68 a 40x. e-f) Expressió de la proteïna CD68 en pols de teixit hepàtic total.

Dels teixits extrets, vam poder analitzar alguns marcadors que ens orientaven en el tipus de perfil de la resposta immunitària. Els marcadors IL6 i TNF $\alpha$  es trobaven incrementats en els KO HFD (*Figura 30g*) i aquests, en concordança amb CD68, suggereixen un increment en inflamació. Podríem deduir, però, que aquesta inflamació té un perfil tolerogènic ja que CXCL9 està reduït (*Figura 30a*), TGF $\beta$  està incrementat (*Figura 30b*) cosa que podria estar indicant una tendència dels macròfags a conversió cap a TAMs i amés la baixada del MCP-

1 indicaria que no hi ha infiltració de macròfags, almenys a setmana 50 (*Figura 30d*). CXCL9 és una quimioquina induïda per interferó alfa que regula la migració de les cèl·lules immunitàries especialment aquelles citotòxiques per a les cèl·lules tumorals com els CTLs i les NK, i per tant una baixada de la seva expressió podria ser molt positiu per a l'evasió immunitària de les cèl·lules tumorals. L'increment de KC i IL1 $\beta$  també anirien amb concordància amb el perfil pro-tumoral (*Figura 30a* i c). IL1 $\beta$  és una citoquina pro-inflamatòria relacionada amb la infiltració de neutròfils entre d'altres funcions i CXCL1 o KC és una citoquina molt expressada pel fetge quan hi ha mort cel·lular que juntament amb CXCR2 (*Figura 30a*) que n'és receptor, són responsables de reclutar neutròfils al teixit per a solucionar dany. Aquests marcadors estarien mostrant un increment degut a la dieta però també una tendència a incrementar a causa del genotip. Els neutròfils són considerats un factor de mal pronòstic en càncer, i els trobem incrementats en la circulació d'aquests animals (*Figura 30e*). Tot plegat suggereix que hi ha una resposta immunitària exacerbada al teixit però aquesta no té la capacitat de detectar o eliminar les cèl·lules tumorals i per tant té un perfil pro-tumoral.

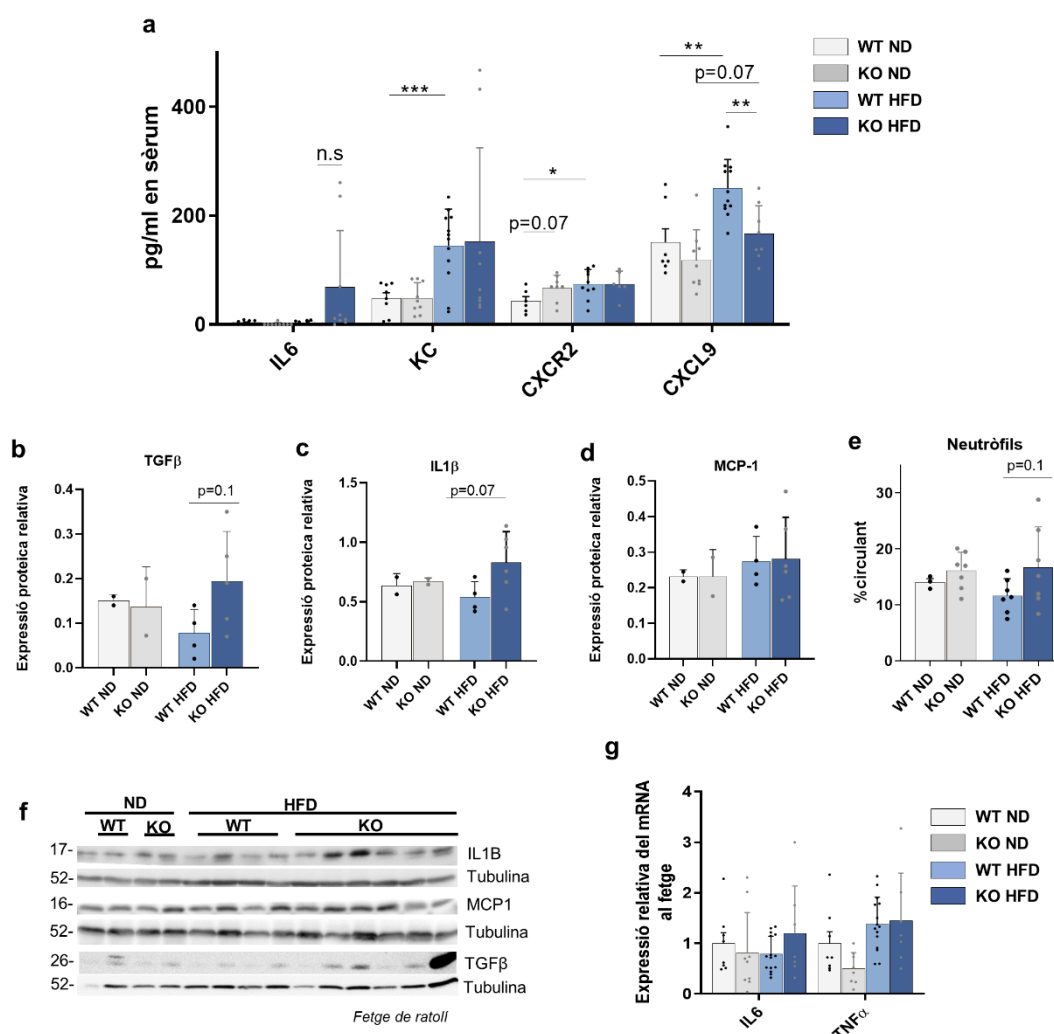


Figura 30. La inflamació del fetge dels animals CPEB4<sup>KO</sup> a 50 setmanes té un perfil pro-tumorigènic. a) quantitat (pg/ml) de citoquines circulants en sèrum IL6, KC, CXCR2 i CXCL9. b-d) expressió relativa respecte a Tubulina de les proteïnes TGFβ, IL1β i MCP1. e) percentatge de neutròfils circulants en la sang perifèrica f) resultat expressió proteica. g) expressió relativa del mRNA de IL6 i TNFα en teixit de fetge.



Podem afirmar que aquesta resposta immunitària exacerbada no està eliminant els tumors ja que, a part de veure un fenotip amb increment de lesions tal i com hem descrit anteriorment, els CPEB4<sup>KO</sup> HFD tenen la senyal proliferativa de ki67 incrementada als tumors o lesions (**Figura 31a-b**). Afegit a això, hi ha també activació de la via de fosfo-STAT3 (phSTAT3), via relacionada amb NASH, la resposta inflamatòria i la supervivència tumoral. Aquesta pujada de phSTAT3 la veiem a nivell de tot el teixit hepàtic (**Figura 31d, f i g**), però també a l'interior de les lesions (**Figura 31e**), tot i que en aquest cas sembla que les senyals provenen més aviat d'altres tipus cel·lulars diferents als hepatòcits com podria ser aparentment cèl·lules inflamatòries.

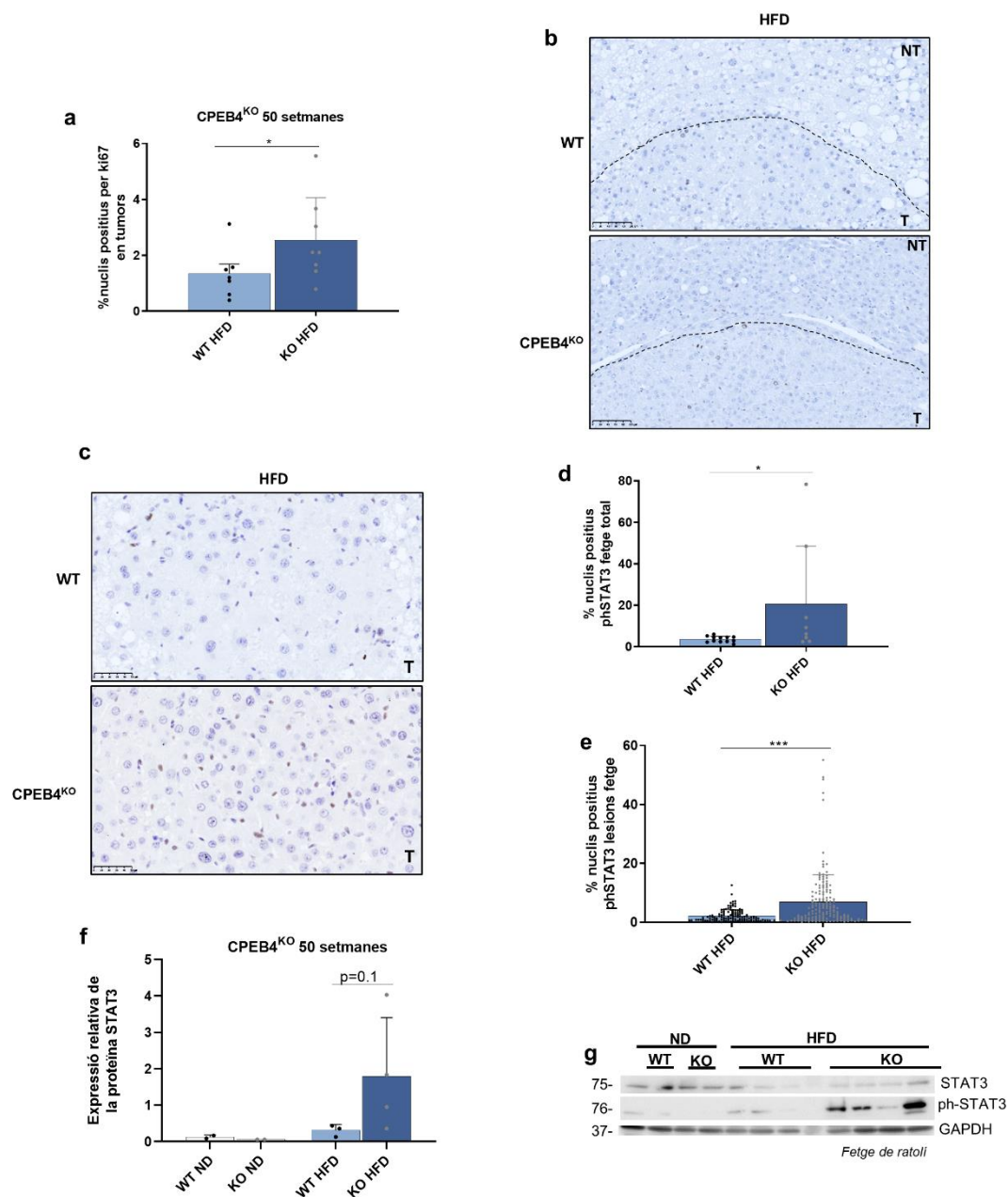


Figura 31. Els tumors KO de tot el cos sotmesos a HFD tenen més proliferació tumoral i sobre activació de senyals de supervivència a tot el teixit. a-b) Percentatge de nuclis positius per ki67 i imatges de la tinció, cada imatge està dividida en dues regions, una de teixit normal i l'altre de teixit tumoral. c-e) Percentatge de nuclis positius per ph-STAT3 en teixit global (d) i en teixit tumoral (e). Per a fer l'estadística de teixit tumoral s'han considerat les lesions de manera independent dins de tot el grup KO HFD. f-g) Expressió proteica de ph-STAT3 i STAT3. T: tumor; NT: no tumor; ph: fosforil·lada.

Curiosament però, aquests animals tenen activades també les vies d'apoptosi com mostren la tinció TUNEL (*Figura 32a-c*) i l'expressió de Caspasa-3 (*Figura 32d*). Aquesta mort cel·lular exacerbada pot estar relacionada amb els elevats nivells d'inflamació i mal funcionament del teixit derivat del NASH i el càncer. El que sembla clar és que aquesta mort no és suficientment generalitzada com per acabar amb les cèl·lules tumorals.

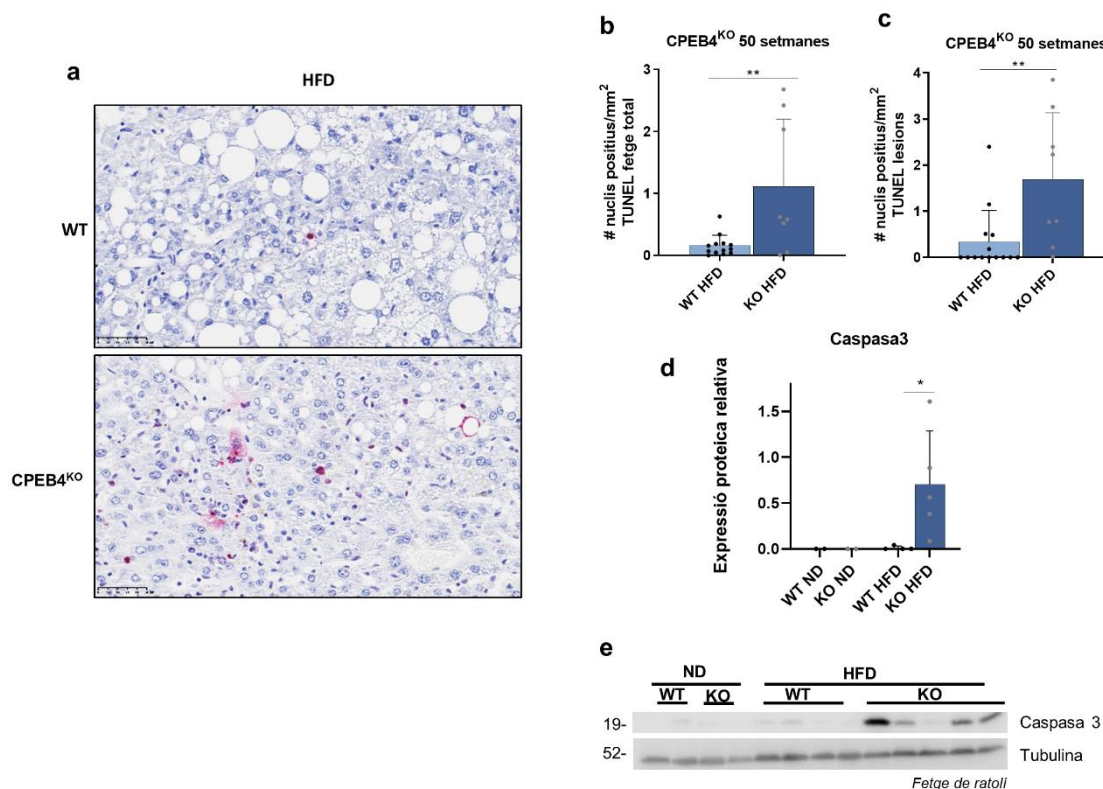


Figura 32. El teixit i les lesions hepàtiques dels animals CPEB4<sup>KO</sup> tenen l'apoptosi incrementada. a-c) Quantificació del nombre de nuclis positius corregit per mm de teixit en fetge total (b) i fetge tumoral (c). d) expressió de la proteïna Caspasa3 en teixit total del fetge. S'observa un increment molt clar.

En relació a l'estat de salut d'aquests animals, vam poder observar una evolució de les transaminases circulants en concordança al que veiem a nivell molecular. Increments a les transaminases ALT i AST (ALT: alanina transaminasa, AST: aspartat transaminasa) són marcadors de dany hepàtic que es fan servir de manera rutinària a la clínica. Vam mesurar-ne els nivells a setmana 16 48h després d'injectar el DEN, a setmana 26 i a setmana 50. Aquests enzims es troben als hepatòcits i permeten que aquests portin a terme algunes de les seves funcions biològiques com la detoxificació del teixit i la síntesi d'aminoàcids. Quan el teixit hepàtic està danyat i els hepatòcits tenen les membranes més poroses del normal, les transaminases escapen a la circulació, i els seus nivells incrementen a la sang. Sorprenentment, podem observar com els animals WT tant en ND com en HFD pateixen un increment de ALT a setmana 16 48h després del tractament amb el mutagen DEN, però aquest increment no es veu reflectit en els animals KO tot i que aquesta dada és només una tendència (*Figura 33a*). Dades del nostre grup (no mostrades) sobre aquests animals a 16 setmanes abans de ser exposats al DEN indiquen que les transaminases només incrementen

a causa de la dieta i sense diferències degudes al genotip. Això podria estar indicant que els fetges KO, tot i que tenen més lesions a final de protocol, en un primer moment el teixit resulta menys danyats a causa de la injecció del tòxic DEN. Pel que fa a aquests marcadors a setmana 26 (*Figura 33b* i *c*) i setmana 50 (*Figura 33d* i *e*), podem dir que el dany hepàtic incrementa a causa de la dieta, que presenta una tendència a l'alça en els KO HFD a setmana 26 i que no varia a setmana KO a causa del genotip.

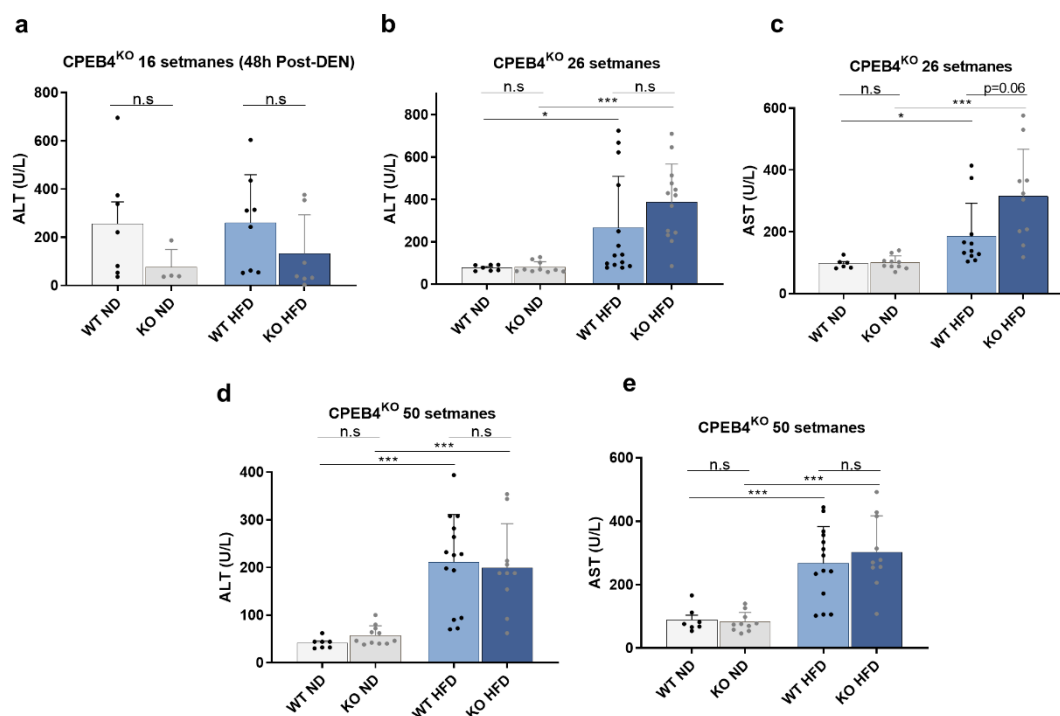


Figura 33. El dany hepàtic incrementa principalment a causa de la dieta. a) Nivell circulant d'ALT a setmana 16, 48h després d'injectar el DEN. b) Nivell circulant d'ALT a setmana 26. c) Nivell circulant d'AST a setmana 26. d) Nivell circulant d'ALT a setmana 50, just al final de protocol. e) Nivell circulant d'AST a setmana 50, just al final de protocol. ALT: Alanina transaminasa, AST: Aspartat transaminasa.

## 6.7. CPEB4 afavoreix la resposta immunitària anti-tumoral

Per intentar entendre la relació de CPEB4 i la resposta immunitària anti-tumoral, vam generar un altre model de ratolins en els quals el Cre estava controlat per el promotor de la lisozima M i per tant, eliminava CPEB4 de la línia mieloide (CPEB4<sup>MKO</sup>). Aquesta línia cel·lular engloba granulòcits, monòcits, eritròcits i plaquetes i entre les seves funcions principals hi trobem la fagocitosi i la secreció de citokines inflamatòries. En aquest model, observem una tendència cap a increment de lesions i empitjorament de la salut dels animals, així com increment del pes corporal, però dels tres models animals, aquest seria el que té un fenotip més lleu.

En l'evolució del pes corporal (*Figura 34a*), veiem que els animals KO es mantenen per damunt i en el cas dels animals KO ND de manera significativa a les últimes setmanes de protocol. Tot i així, el pes final del cos i del fetge no mostren diferències entre WT i KO i

només incrementa amb la dieta (*Figura 34b* i c). En la informació obtinguda de la incidència de tumors, també veiem que els canvis es deuen principalment a la dieta (*Figura 34d*), però si ens fixem, com en els models anteriors, en el tipus de lesions desenvolupades, s'observa un increment significatiu en la presència d'adenomes en els CPEB4<sup>MKO</sup> HFD (*Figura 34e*). Aquests resultats corroborarien que les cèl·lules mutades pel DEN, tenen més probabilitat d'escapar a la resposta immune quan la línia mieloide no expressa CPEB4. Pel que fa al comptatge i mida de les lesions (*Figura 34f-i*), no vam obtenir dades significatives però tant el comptatge microscòpic com la mida de les lesions presenten una lleugera tendència a l'alça.

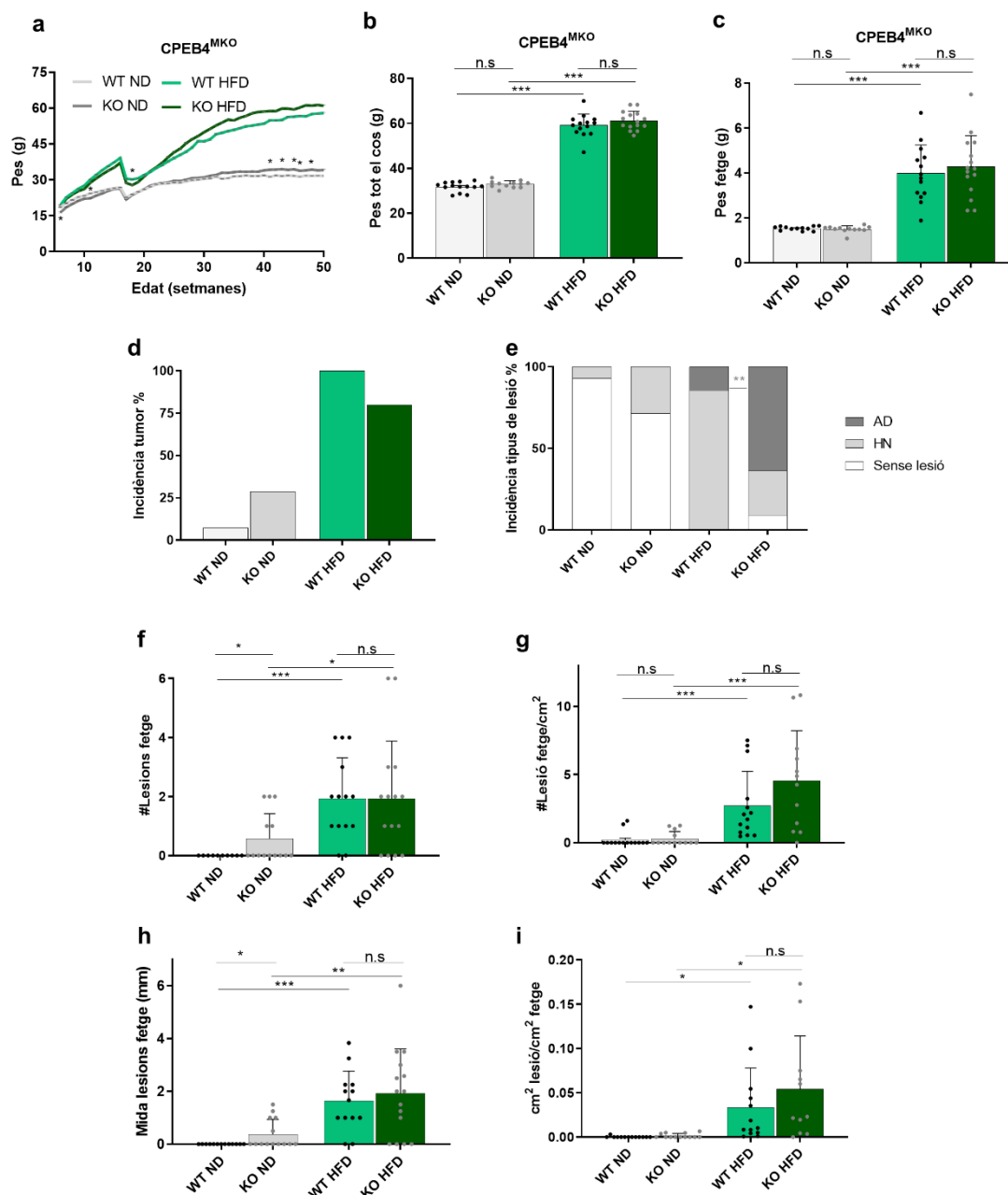


Figura 34. Els animals CPEB4<sup>MKO</sup> tenen un fenotip més lleu però els adenomes incrementen de manera significativa. a) evolució del pes corporal al llarg del protocol. b) Pes final de tot el cos. c) pes final del fetge. d) percentatge d'incidència de lesions. e) percentatge d'incidència de tipus de lesions específiques. e) nombre de lesions al fetge a nivell macroscòpic. f) nombre de lesions microscòpiques al fetge corregit per la superfície de teixit. h) mida de les lesions macroscòpiques. i) mida de les lesions microscòpiques. AD: Adenoma; HN: hiperplàsia nodular.

En l'estudi de la proliferació i l'apoptosi en les lesions d'aquests animals, vam observar que tenien una reducció en l'apoptosi (*Figura 35a-c*) tant en teixit total com en teixit tumoral, però no hi havia variacions en la proliferació (*Figura 35d*). Això ens va fer pensar que estaven donant-se successos biològics quelcom diferents respecte als CPEB4<sup>LKO</sup> tot i que la conseqüència final era també l'increment en l'agressivitat de les lesions. En aquest model, amés, vam observar les vies de senescència p16 i p21 reduïdes (*Figura 35f i h*). Ja que p16 és un supressor tumoral, podem hipotetitzar que s'estan activant altres mecanismes de supervivència i malignitat a les cèl·lules tumorals.

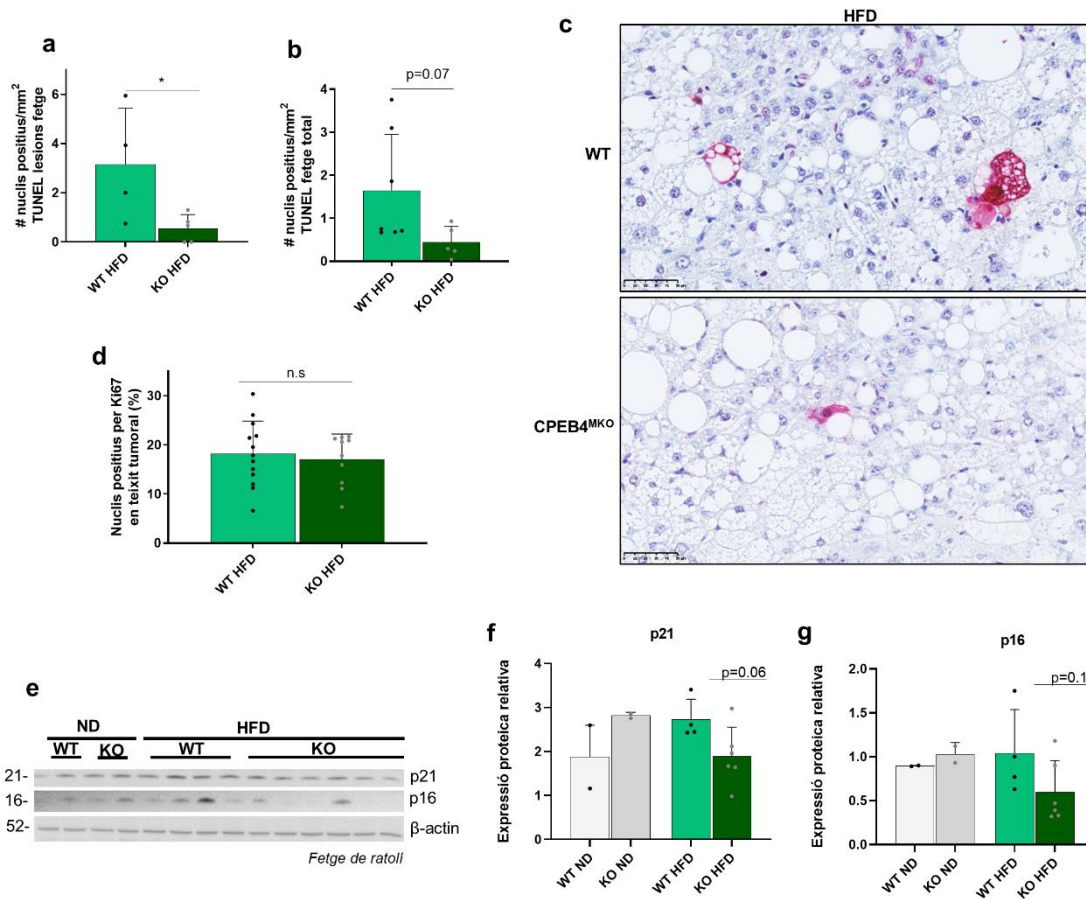


Figura 35. La manca de CPEB4 a la línia mieloide redueix la mort cel·lular a les lesions. a-c) Nombre de nuclis positius per a la tinció TUNEL o apoptosi. d) quantificació de nuclis positius per a proliferació amb ki67. e-g) expressió proteica en teixit hepàtic total de les proteïnes p21 i p16.

Per buscar la possible implicació de CPEB4 en la resposta immunitària davant de tumors, vam agafar dades extreteres d'animals CPEB4<sup>LKO</sup> a 36 setmanes sotmesos a HFD des de setmana 6 i a PB des de setmana 20. Aquestes dades van ser cedides per el grup col·laborador del Raúl Méndez del IRB i consistien en el estudis de quantificació de mRNA total i de mRNA unit a ribosomes de teixit total del fetge. Es van estudiar els RNAs dels que pujava la seva quantitat total o unida a ribosoma en resposta a dieta greixosa tant en animals WT com en animals CPEB4<sup>LKO</sup>. Hi havia un total de 3089 RNAs incrementats significativament a causa de la dieta en WT o KO però 159 RNAs variaven significativament només en KO (p<0,05). Per a ser més restrictius, d'aquests 159 RNAa, vam buscar aquells que en el WT tinguessin un patró de canvi diferent al KO (ja fos absència de canvi o el tipus de canvi oposat al KO). Així doncs, ens vam quedar només amb aquells RNAs que canviaven significativament en els KO ja fos en RNA total o en RNA protegit per ribosomes i que succeís un tipus d'esdeveniment molt diferent que al WT. D'aquesta selecció van quedar 37 RNAs (Taula 1).

GEN	WT		KO	
	RNA total	RNA protegit per ribosoma	RNA total	RNA protegit per ribosoma
Adgb	0,677885322	0,023381183	2,89321639	1,065391715
Atp10d	0,510674928	-0,212349213	3,56051303	3,323912866
Atp6v0d2	-0,442429377	-0,256550468	3,121652089	3,158160415
Camp	0,655646009	0,707131129	1,110136661	3,023761618
Cenpm	0,880134719	0,47900119	3,518947395	1,795739331
Cmpk2	0,917540431	0,093218417	3,264687807	2,046109484
Csf1r	0,924841087	-0,206166081	2,922008523	1,908447827
Cyp2c37	-0,383425563	0,869491058	2,804336682	1,23312362
Cyp2c54	-2,391182553	0,085842401	3,15788466	2,187224923
Dhx58	-0,448917395	0,537183596	1,749183927	3,595092016
Gbp10	-0,343231101	-0,004851501	3,308570535	1,996962339
Id1	-0,132637739	-0,440304341	-3,282632367	-2,970014247
Ifi27	-2,025997719	-1,602272355	2,024984825	2,932717223
Ifih1	0,089844975	0,231393969	1,893842674	3,007497205
Ifit1	-1,120808729	0,525839677	2,953177136	4,167714699
Igfbp6	0,958861364	0,485591676	2,991266371	1,725974653
Ikbke	-0,182726765	-0,465366706	3,697513027	4,24059446
Isg15	0,480716623	-0,053397456	2,969027034	3,707612332
Kcnk10	-0,746531803	1,568937321	-3,195384784	-1,206450986
Map3k21	0,21920183	-0,915382859	-2,896560335	-2,028759774
Mefv	0,873014326	-0,662276723	3,118936356	2,83037163
Nrep	-0,007860044	-0,662568804	-2,961255788	-1,193760017
P2rx4	-0,534102531	0,183011219	1,407567946	2,842407718
Parp11	0,340474542	0,157642141	3,145383517	1,027094532
Ppbp	-1,293346817	0,829055247	2,975027812	2,841733743
Rsad2	-0,539452859	0,605328636	1,961199761	3,484513457
Saa2	0,322428712	0,779695778	1,438151212	2,969931839
Sall2	-0,561324474	-0,382908792	-2,801445331	-2,927190339
Serp1b1a	-2,376028314	-0,694861746	1,776472633	2,776604687
Serp1b8	-0,790588769	0,531131441	2,99025723	3,104221791
Sh2d4a	0,567932559	0,409329918	2,154298022	3,2931198
Slc22a26	0,002018377	0,926280596	4,230607535	4,285131393
Slc2a6	0,628240828	0,335672082	1,325660756	3,1970691
Slc37a1	0,298785054	0,787952694	3,941294376	2,556473913
Syt1	-1,525618372	-0,461205876	1,171414305	3,236413262
Wdfy2	-0,962772408	-0,725971798	-1,194666962	-3,32374785
Wfdc17	-0,668931052	-1,25271161	1,679003867	3,853058809

Taula 1. Quantificació total de RNA o de RNAs protegits per ribosomes en escala logarítmica<sub>2</sub> en animals CPEB4<sup>LKO</sup> a 36 setmanes d'edat. La columna de l'esquerre hi ha el nom del gen que codifica per a aquell RNA. El blau indica disminució i el vermell increment, les tonalitats mostren la intensitat del canvi.

Vam estudiar les funcions d'aquests gens a través de bases de dades i eines bioinformàtiques d'internet, concretament vam fer tres tipus d'estudis: GO (*gene ontology*) per a processos biològics, a GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) que compara el set de dades amb sets de dades resultants d'altres estudis i ho relaciona amb una signatura molecular enriquida, i finalment l'eina *Reactome* que també dóna informació sobre vies de senyalització i processos biològics.

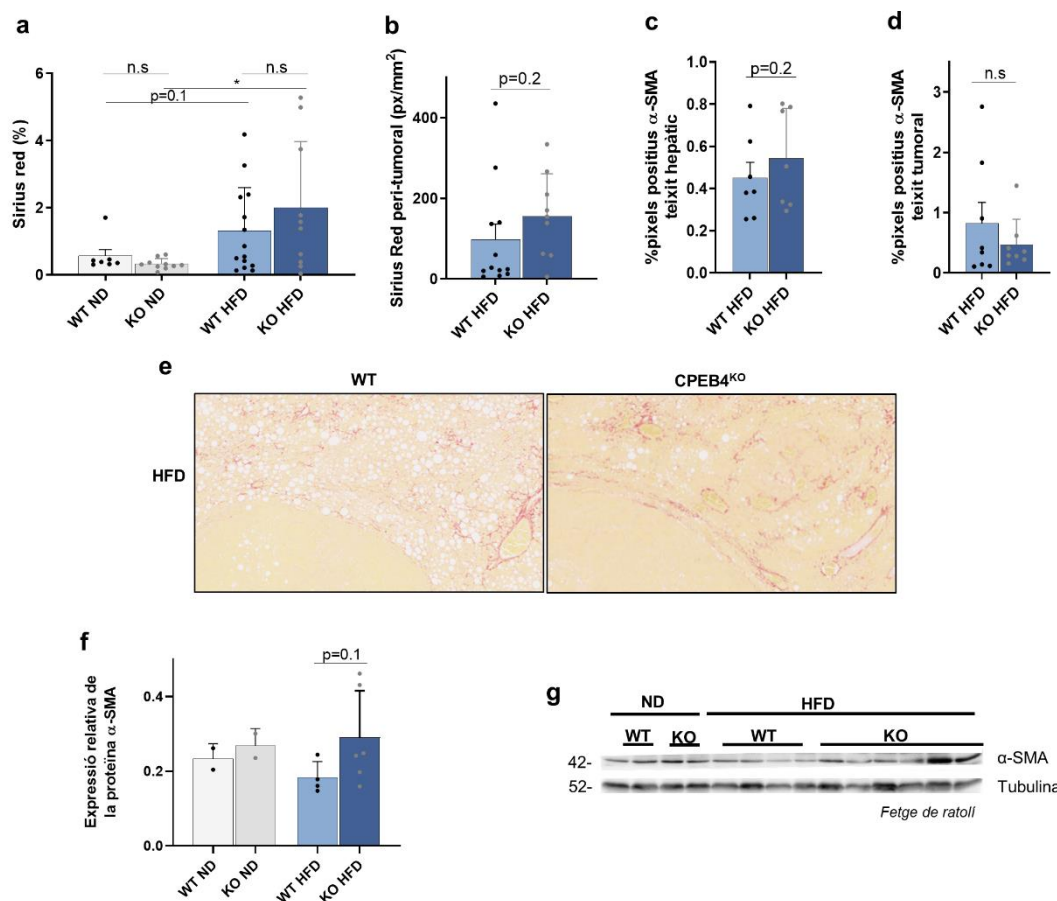
Els resultats del GO mostraven de manera significativa ( $p < 10^{-5}$ ) que la llista de gens estava relacionada amb la resposta immunitària i la regulació de la producció de citoquines. El resultat del GSEA va trobar coincidència en 6 gens amb el patró que seguia un estudi en el que hi havia sobre-expressió de gens relacionats amb la resposta mediada per interferó  $\alpha$  ( $p < 10^{-9}$ ). Quan vam buscar més en profunditat l'origen d'aquest estudi, vam observar que aquest es va realitzar mirant l'expressió d'hepatòcits primaris control i tractats amb  $\text{INF}\alpha$ , això li donava robustesa a la coincidència ja que parlen del mateix tipus cel·lular que el nostre. Per la seva part, l'anàlisi amb *Reactome* mostrava en primer lloc i de manera significativa també ( $p < 10^{-5}$ ), que aquests 37 gens estaven enriquits amb gens que participaven de la via d' $\text{INF}\alpha$ .

Els interferons són citoquines clau per a molt processos biològics relacionats amb la resposta immunitària que tenen la capacitat de jugar papers pleiotròpics i poden afectar al cicle cel·lular, la diferenciació, la secreció d'altres molècules immunitàries i intervenen en la immunitat anti-cancerígena. El més interessant és que s'han relacionat en múltiples ocasions amb la diferenciació de macròfags de teixit en macròfags TAM i poden estimular la quiescència o dormància de les cèl·lules tumorals de manera que no són reconegudes per les cèl·lules immunitàries i poden posteriorment proliferar en el teixit. Podríem hipotetitzar que quan noquegem CPEB4 als hepatòcits, aquests activen unes vies de senyalització tals que fan que incrementi l'expressió dels interferons en algun moment del protocol i estimulen d'aquesta manera l'evasió immunitària per part de les cèl·lules malignes.

#### **6.8. La fibrosi i l'angiogènesi juguen papers secundaris en el procés carcinogènic relacionat amb CPEB4 i l'obesitat**

La fibrosi, és un dels processos inicials més comuns a la malaltia hepàtica i té com a objectiu principal la regeneració del teixit. El procés d'acumulació de fibra prové de l'activació continuada de senyals inflamatòries que porten a una activació de la fibrogènesi per part de les cèl·lules estrellades hepàtiques per a intentar resoldre el dany. Aquest dany pot arribar a ser crònic i l'acumulació excessiva de fibra derivar a un mal funcionament del teixit. En el nostre estudi, tot i que hem observat regions d'acumulació de fibra que evidencien el dany crònic, el percentatge de fibra sempre era baix i no vam trobar diferències significatives degudes a la manca de CPEB4. L'única dada significativa és l'increment en el percentatge de fibra derivat de la dieta (*Figura 36a*). Per a estudiar més en profunditat aquest factor i l'efecte que podia tenir en l'aparició i progressió de les lesions hepàtiques, vam mesurar l'acumulació de fibra al voltant d'aquestes i vam observar que hi havia una lleugera tendència a l'alça però no significativa (*Figura 36b*) i això ho podem

observar a les imatges de la tinció, on avall a l'esquerre hi ha una regió de teixit diferenciada que seria la lesió hepàtica i en el cas del KO, aquesta té un grau d'encapsulament per fibra lleugerament més elevat que el WT (*Figura 36e*).

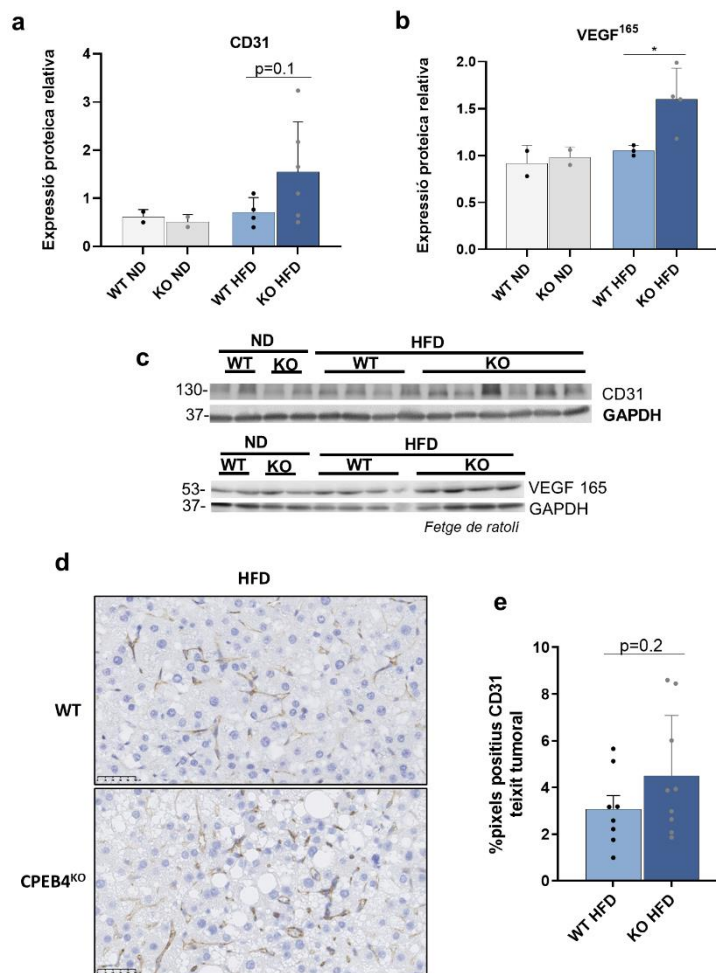


**Figura 36.** La manca de CPEB4 incrementa lleugerament l'activació d'estrellades sota dieta greixosa. a) Percentatge d'acumulació de fibra en forma de senyal de la tinció Sirius Red. b) Quantitat de fibra acumulada a la perifèria de les lesions mesurada en píxels per mm<sup>2</sup>. c) Percentatge de píxels del marcador  $\alpha$ -SMA en tall de teixit total. b) Percentatge de píxels de  $\alpha$ -SMA a les lesions de talls de teixit. e) Imatges de la tinció Sirius Red. Avall a l'esquerre hi ha localitzada una lesió tant en el cas WT com en el KO i es diferencia ja que el teixit és més compacte. f-g) Expressió de la proteïna  $\alpha$ -SMA en pols de teixit hepàtic total. Control endogen Tubulina.

Per seguir estudiant el paper de la cèl·lula estrellada en el microambient del teixit KO i específicament en els tumors, vam mesurar l'expressió d' $\alpha$ -SMA, un marcador de cèl·lules estrellades actives. En aquest sentit tampoc vam observar diferències significatives en teixit total (*Figura 36c*) ni en teixit tumoral (*Figura 36d*), tot i que en teixit total s'observa una lleugera tendència a l'alça que es corrobora també amb una tendència en l'expressió de la proteïna en pols de teixit total (*Figura 36f ig*).



En relació a la fibrosi i a l'estat general de salut del fetge, vam mesurar l'angiogènesi a través del marcador CD31 en teixit total i en teixit tumoral. Aquest procés juga un paper important en el desenvolupament de malaltia ja que l'angiogènesi patològica altera la funcionalitat del teixit, i amés promou la nutrició de possibles cèl·lules tumorals. L'acumulació de fibra i l'increment d'inflamació al teixit són estímuls per a que els processos d'angiogènesi tinguin lloc. En el nostre estudi hem observat una tendència no significativa a l'alça en l'expressió de CD31 i per tant en la vasculatura del teixit (**Figura 37a** i **Figura 37d-e**). És d'esperar, però, que si el grup CPEB4<sup>KO</sup> HFD té més lesions i les lesions, en general presenten més vasculatura, llavors el teixit global tingui també més senyal de CD31. També vam mesurar els nivells de VEGF, i vam trobar que la isoforma VEGF<sup>165</sup> estava significativament incrementada en els KO+HFD (**Figura 37b**). Aquest VEGF podria tenir no només un paper proangiogènic sinó també proinflamatori.



**Figura 37.** La manca de CPEB4 i la dieta greixosa estimulen l'increment CD31. a) Quantificació de l'expressió de la proteïna CD31 en pols de teixit total de fetge i corregit per el control endogen GAPDH. b) Quantificació de l'expressió de proteïna VEGF165 en pols de fetge total i corregit per GAPDH. c) imatge del resultat de l'experiment amb CD31 i VEGF. d-e) Quantificació de l'expressió de CD31 en percentatge de píxels positius a les lesions de talls de teixit en parafina.

---

## DISCUSSIÓ

---



---

## 7. DISCUSSIÓ

Les proteïnes CPEBs són cada vegada més reconegudes per les seves funcions múltiples depenent del context del microambient i l'estadi de la malaltia, això fa complex entendre les implicacions específiques en les diferents patologies. Aquest és el repte que encara està per assolir i que ens disposem a encarar en aquest projecte pel que fa a CPEB4 i al càncer de fetge i l'obesitat.

### **CPEB4 limita el guany de pes corporal i l'acumulació de greix al fetge**

Se sap que CPEB4 és requerida al fetge per l'adaptació a HFD i a l'estrès del reticle endoplasmàtic derivat de l'envelliment i la subseqüent hepato-esteatosi <sup>216</sup>. La seva manca dona lloc a NAFLD. CPEB4 intervé al metabolisme lipídic i quan no hi és, hi ha problemes en l'oxidació mitocondrial dels àcids grassos promovent una secreció alterada de lipoproteïnes. Això succeeix de manera que la traducció de CPEB4 està regulada per la resposta d'estrès UPR a través de segments de lectura al seu 5'UTR i a la vegada, CPEB4 regula la traducció d'altres proteïnes involucrades en la UPR. Hi ha una relació estreta entre l'estrès metabòlic causat per l'obesitat i la UPR <sup>236</sup>. En el nostre model això es corrobora amb l'increment d'expressió de CPEB4 en els animals sotmesos a dieta greixosa tant a setmana 50 com a setmana 16. No hem trobat marcadors significatius d'alteracions en la resposta UPR, però això no vol dir que aquesta via no hagi jugat un paper en el desenvolupament de malaltia dels nostres animals al llarg del protocol o hagi, si més no, col·laborat de manera crònica lleugera però constantment en l'agreujament del fenotip dels animals KO per a CPEB4, tant en relació a l'acumulació de greix com en les lesions.

En el cas del pes corporal, cal tenir en compte que CPEB4 s'ha relacionat prèviament amb la hipertrofia dels adipòcits <sup>237,238</sup>, i per tant podríem esperar que els animals KO de cos sencer tinguessin una disminució de pes corporal. De fet, això ho veiem en els animals CPEB4<sup>KO</sup> HFD, però aquesta observació pot estar esbiaixada per l'empitjorament de l'estat de salut dels animals. Per contra, els animals CPEB4<sup>KO</sup> ND presenten un increment de pes i d'acumulació de greix als hepatòcits tot indicant que en els nostres animals, la presència de CPEB4 més aviat limita el guany de pes corporal. Ja que els animals KO ND no presenten diferències de pes hepàtic significatives amb el seu WT ND, no podríem justificar la pujada de pes corporal per l'increment de pes del fetge. Així doncs, la manca de CPEB4 a llarg termini estimula l'aparició d'obesitat quan es consumeix una dieta rica en greixos i el guany de pes sense necessitat de consum de HFD.

Una possibilitat per l'acumulació de lípids al fetge podria ser l'increment de lipòlisi visceral i del teixit adipós visceral que promou el transport dels FFA al fetge. Tot i que els nostres resultats no mostren increment de triglicèrids en la circulació, aquest esdeveniment pot haver tingut lloc abans durant el protocol.

Els resultats obtinguts en el model CPEB4<sup>MKO</sup>, en els que s'observa una tendència a increment de pes corporal en els animals KO tant sotmesos a HFD com a ND, indicarien que la línia mieloide noquejada per a CPEB4 juga un paper també en el metabolisme dels lípids a partir de la setmana 30 de protocol, quan probablement ja hi ha una malaltia

crònica. També podria ser que les cèl·lules mieloides pateixin problemes a la seva resposta UPR i això es derivi en alteracions en la seva funcionalitat i l'excés d'acumulació de greix a altres regions corporals com els fat depots <sup>239</sup>.

### **CPEB4 protegeix el fetge de l'aparició de lesions malignes en context de HFD**

L'expressió de CPEB4 s'ha associat àmpliament amb el desenvolupament de tumors i generalment jugant un paper oncogènic; alguns dels millors exemples són l'adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDA) <sup>222</sup> i el glioblastoma <sup>225</sup>. En el cas del càncer de fetge i particularment del HCC, s'ha vist que pot jugar papers diferents durant l'avenç de la malaltia i estar sobre-expressat en estadis primerencs d'aquesta però poc expressat en estadis avançats <sup>234</sup>. El que podem dir clarament és que la manca d'expressió de CPEB4 en un context d'obesitat incrementa el nombre de lesions al fetge i el caire maligne d'aquestes. Els Adenomes, tot i no ser considerats lesions malignes, són un tipus de lesions que tenen una elevada probabilitat d'avançar cap a lesions més malignes i per tant s'aconsella la resecció quirúrgica en pacients <sup>240</sup>. Les hem considerat llavors com a lesions greus per el seu potencial tumorigènic. A l'estudi de Tsai, van observar en concordança amb els nostres resultats, com cèl·lules noquejades per a CPEB4 (en aquest cas cèl·lules humanes HepG2) tenien més potencial de formar colònies en cultiu i tenien creixement accelerat en models xenografts en concordança també amb el nostre model al·lograft. Alguns estudis han demostrat també com la manca de CPEB4 propicia la migració i la invasió de cèl·lules canceroses de fetge <sup>233</sup>.

Tot plegat va en la direcció dels nostres resultats, demostrant que CPEB4 juga un paper supressor de tumors en el desenvolupament de càncer de fetge associat a consum de dieta greixosa. Aquest efecte supressor es veu en hepatòcits KO tumorals aïllats i també en els models animals d'hepatòcits però quan es fa més evident o patològic és quan CPEB4 manca a tot l'organisme, evidenciant el paper important de la CPEB4 en les alteracions del microambient tumoral durant l'obesitat.

Els nostres resultats aporten més evidències a les funcions paradoxals de CPEB4 en el desenvolupament de càncer i per tant ressalten la necessitat de definir un marc d'utilització d'aquesta molècula en cas de desenvolupar una teràpia inhibidora per a altres tipus de tumors en els que CPEB4 sí juga un paper clarament oncogènic. No podríem generalitzar i afirmar que CPEB4 és sempre un marcador de metàstasi i tumorigenicitat tal i com s'ha fet en alguna publicació <sup>235</sup>. Les bases que marquen els rols oposats de CPEB4 no són clares, però podria tenir relació amb la seva capacitat d'adenilar i deadenilar l'extrem 3' dels mRNAs <sup>223</sup> i també la d'actuar com a activador o inhibidor de la traducció en funció de la seva concentració i localització <sup>241</sup>.

### **La manca de CPEB4 estimula l'entrada dels hepatòcits en senescència i la tumorigenicitat d'aquests**

El mutagen DEN ha estat àmpliament reportat com a un agent que causa dany al DNA i propicia el desenvolupament de càncer. Se sap també que a les 24h ja s'observa un efecte de mort cel·lular i el dany se segueix acumulant fins a tres dies després <sup>242,243</sup>. Les dades obtingudes través de l'increment de p16 i TGFβ als animals CPEB4<sup>KO</sup> HFD a setmana 16,

---

semblen indicar que el dany causat pel DEN, en comptes d'induir apoptosi com succeeix en els animals WT, podria estar induint senescència dels animals KO d'hepatòcits. Això ho corrobora la baixada de proliferació i apoptosi. Estaríem llavors en un escenari de senescència per dany cel·lular. p16 és un supressor tumoral i un marcador estrella de senescència, procés que se sap que intervé en el desenvolupament de NASH promovent la producció de ROS i desestabilitzant la resposta immune <sup>244</sup>. Encaixaria que, un increment de senescència, desestabilització immunitària i ROS a setmana 16 puguin assentar les bases requerides per a que les cèl·lules tumorals prosperin i adquireixin un fenotip més maligne que resulti en el fenotip observat en aquests animals a setmana 50. TGF $\beta$  per la seva part, participa en el desenvolupament de moltes malalties, i s'ha relacionat en moltes ocasions amb l'envelliment, l'obesitat i la inhibició de la proliferació cel·lular <sup>245</sup>. Un estudi en fibrosi pulmonar va demostrar que TGF $\beta$  podia estimular l'entrada cel·lular en senescència com a resposta a l'estrès <sup>246</sup>. Podria ser llavors que estigui incrementant la resposta citostàtica de les cèl·lules al nostre model i així la supervivència de les cèl·lules tumorals.

Al model CPEB4<sup>LKO</sup> a 50 setmanes, animals en els que veiem increment significatiu del nombre de lesions i tendència a increment de la mida d'aquestes, succeeix una cosa similar. En aquest cas, tot i que p16 ja no varia a punt final, veiem que la proliferació tumoral i l'apoptosi es redueixen en els KO d'hepatòcits sotmesos a HFD. Podríem hipotetitzar que, tot i que hi hagi una proliferació menor en els hepatòcits tumorals KO, l'apoptosi està tan reduïda que la probabilitat de que cèl·lules tumorals sobrevisquin és major i això permet que hi hagi un major nombre de lesions. Relacionem el fenotip cancerós d'aquests animals amb les característiques tumorigèniques *stem* o capacitat d'iniciar tumors adquirides a conseqüència del silenciament del CPEB4 als hepatòcits, i no tant amb el potencial proliferatiu, tot i que amb els resultats *in vitro* no podem descartar al 100% que hi hagi un efecte d'increment de proliferació sumat a altres factors.

Aquest potencial *stem* dels hepatòcits noquejats per a CPEB4 es corrobora amb els resultats obtinguts d'hepatòcits tumorals de ratolí *in vitro*, en els que veiem que en *soft agar*, les KO donen lloc a més colònies de manera significativa sense que aquestes siguin significativament més grans. És a dir, CPEB4 juga un paper de manera que els hepatòcits tumorals tenen més propietats de cèl·lula iniciadora o mare tumoral. Sirtuin1 és una diana de les CPEBs i podria ser una bon candidat per a explicar l'increment de propietats *stem* tumorals; s'ha demostrat aquesta relació entre CPEB1 i Sirtuin <sup>247</sup>. També podríem hipotetitzar que aquests hepatòcits tenen més capacitat d'escapar o inhibir la resposta immunitària que té una tendència a estar reduïda en el model d'hepatòcits i d'aquesta manera aconsegueixen sobreviure més.

És interessant, però, que si posem aquests hepatòcits tumorals KO en un context en el que depenen principalment del seu potencial proliferatiu *in vivo*, com són els models subcutanis d'al·lografts (mateixa espècie de donant) en ratolins nude o ratolins C57BL de cèl·lules tumorals extretes de ratolins C57BL, veiem que les cèl·lules KO permeten una major incidència en l'aparició de tumors i aquests són significativament més grans. Per tant, d'alguna manera un hepatòcit KO per si sol és capaç de proliferar més que un WT tot i que aquesta característica no estigui exacerbada de manera significativa en un context amb parènquima hepàtic tal i com veiem amb la mesura de la mida dels tumors en els models

animals CPEB4<sup>LKO</sup> o en soft agar. Podríem relacionar també aquest increment significatiu de la mida de les lesions amb factors no autònoms de la cèl·lula tumoral com podria ser una secreció exacerbada de factors que incrementen l'angiogènesi <sup>217</sup> o que promouen una immunitat pro-tumoral.

### **CPEB4 estimula la immuno-vigilància tumoral**

Els animals CPEB4<sup>KO</sup> de 50 setmanes són els que tenen un fenotip cancerigen més marcat; veiem un increment significatiu del nombre de lesions tot i que la mida només presenta una tendència a l'alça. En aquests animals, però, si que veiem més tendència a inflamació amb IL6, TNF $\alpha$  i sobretot presència de macròfags en teixit total en comparació amb els WT HFD. La presència d'obesitat automàticament genera un estat d'inflamació crònica que entre d'altres coses es caracteritza per tenir nivells elevats de TNF $\alpha$  i IL-6. Ja fa temps que se sap que aquesta inflamació crònica derivada de l'obesitat afecta a tots els òrgans relacionats amb el metabolisme entre els que es troba el fetge. Aquests elevats nivells de citoquines es creu que deriven dels macròfags M1 pro-inflamatoris, però les dues citoquines tenen papers duals temporals dependents del tipus cel·lular i el context <sup>248</sup>.

Tal i com hem descrit als resultats, aquesta resposta immunitària podria tenir un perfil de tipus tolerogènic per la reducció de CXCL9, TGF $\beta$  i la manca d'infiltració de macròfags (MCP1). El més interessant és la baixada significativa de CXCL9 que pot estar reduint la migració de les cèl·lules immunitàries especialment aquelles citotòxiques per a les cèl·lules tumorals com els CTLs i les NK <sup>249</sup>, la seva disminució podria indicar un estat d'immunotolerància en front de tumors. TGF $\beta$  promou la conversió tolerogènica dels macròfags (TAM) i pot atorgar propietats de cèl·lules mare a les cèl·lules tumorals. Amés, s'ha demostrat que una sobre-expressió TGF $\beta$  promou progressió tumoral exacerbada una vegada aquestes cèl·lules han fugit de la influència citostàtica d'aquest factor; pot tenir efectes diferents a l'inici i al final de la malaltia <sup>250-252</sup>. També contribueix a l'activació inflamatòria que promou l'exacerbació de la malaltia hepàtica <sup>245,253</sup> i pot estimular la presència de cèl·lules Tregs que són limfòcits que estimulen l'ambient pro-tumoral (Polanczyk et al., 2019). Aquest increment de TGF $\beta$  també el podríem relacionar amb l'activació de les HSC que veiem amb  $\alpha$ SMA (Dewidar et al., 2015). En aquest sentit, estudis d'un grup col·laborador mostren evidències de que TGF $\beta$  pot estar influenciat per les proteïnes CPEB. De fet, concretament es creu que el receptor 2 (TGFBR2) n'és una diana i es veu reprimat. Per tant, tindria sentit que aquesta via estigui sobre-estimulada quan manca CPEB4. MCP1 o també anomenada CCL2 és una citoquina inflamatòria relacionada amb l'obesitat encarregada de reclutar monòcits, cèl·lules T, NK i cèl·lules dendrítiques, no sembla tenir variacions d'expressió en el nostre model animal i això pot fer pensar que l'increment de macròfags que observem ha tingut lloc en processos de reclutament en estadis anteriors de la malaltia.

És d'esperar que en un estat de malaltia crònica com el que veiem en els animals WT i KO de tot el cos sotmesos a HFD, la resposta immunitària estigui estesa i exacerbada promovent dany tissular. Aquest dany pot facilitar l'aparició de més mutacions que puguin donar lloc a càncer, però el fet de que els KO tinguin més lesions, suggereix que les cèl·lules transformades KO podrien ser capaces de sobreviure i escapar al sistema immunitari més

---

eficaçment. Aquests CPEB4<sup>KO</sup> tenen increment de IL1 $\beta$  que s'ha relacionat amb la captació de neutròfils (s'observa increment de neutròfils a la circulació) que s'han associat a la promoció de la malaltia hepàtica i participen en processos carcinogènics promovent la transformació cel·lular i la tolerància als tumors<sup>256</sup>. IL1 $\beta$  és una citoquina pro-inflamatòria relacionada amb la infiltració de neutròfils, activació de limfòcits T i B i promou la diferenciació dels limfòcits T en Th17 que poden activar la supervivència cel·lular a través de la via de STAT3 també incrementada al nostre model<sup>257</sup>. També s'ha relacionat amb la inducció de senyalització de VEGF, TNF i IL6. Podríem relacionar l'increment de macròfags i de IL1 $\beta$  amb la pujada de IL6 que se sap que pot potenciar la progressió de cèl·lules tumorals i també explicar perquè els tumors són més proliferatius als CPEB4<sup>KO</sup> de 50 setmanes. La pujada de IL1 $\beta$  també podria tenir relació amb l'increment d'apoptosi. CXCR2 és un receptor que es troba a la superfície dels neutròfils, i observem una tendència a increment d'aquest en animals HFD i un increment significatiu en KO ND. CXCL1 o KC és una citoquina molt expressada per el fetge quan hi ha mort cel·lular. Juntament amb CXCR2 que n'és receptor, són responsables de reclutar neutròfils al teixit per a solucionar dany. Sembla ser llavors que tot i que el percentatge de neutròfils circulants en aquests animals no increment amb la dieta, si que ho podrien estar fent els neutròfils infiltrats al fetge. Ara bé, els neutròfils circulants si que tenen una tendència a incrementar en els animals CPEB4<sup>KO</sup>.

El fenotip més marcat que veiem en el CPEB4<sup>KO</sup> de 50 setmanes podria estar relacionat com hem comentat anteriorment amb la pujada de la via de p-STAT3, un factor de transcripció que afavoreix la supervivència de les cèl·lules tumorals. Aquesta via de senyalització ha estat destacada recentment com a la potencial causant del desenvolupament de HCC en un ambient d'obesitat destacant el seu possible paper tumorigènic en el nostre model<sup>258</sup>. De fet, aquests animals tenen sorprenentment un increment significatiu de ki67 i p-STAT3 que són senyals de supervivència i proliferació, i de caspasa-3 i TUNEL, vies de senyalització de mort cel·lular. Estem parlant d'un fenotip extrem en el que els animals ja començaven a perdre pes degut a l'avançat estat de la malaltia del fetge i els tumors creixen molt a la vegada que hi ha mort cel·lular per tot el teixit hepàtic. P

Així doncs, podríem deduir que totes aquelles lesions que a setmana 16 són capaces d'entrar en senescència i d'escapar el sistema immunitari, que mantenen el fetge en un estat primerament i aparentment més saludable com veiem amb la reducció de ALT a setmana 16, romanen quiescents, però es reactiven en algun moment posterior i abans de setmana 26, moment en el qual ja veiem una tendència del KO HFD a tenir més dany hepàtic (ALT i AST). Aquesta reactivació podria promoure que s'estimuli el sistema immunitari i probablement hi hagi reclutament de monòcits en teixit que després serien convertits en KC i que per tant no veuríem com a infiltrat a setmana 50 amb el MCP-1 però si com a increment de monòcits generals en teixit amb CD68. Aquesta exacerbació de la inflamació, però, ja no és capaç d'eradicar els processos tumorals que es troben en estat avançat i per tant contribueixen només aportant inflamació crònica que danya el teixit hepàtic i porta als nostres animals a un estat de malaltia extrem a setmana 50.



Els resultats del model animal noquejat a la línia mieloide (CPEB<sup>MKO</sup>) no mostren un increment en la incidència de tumors però sí un fenotip semblant, tot i que amb menys penetrància, als models anteriors. Hi ha un increment significatiu d'incidència de lesions amb més potencial maligne (adenomes) al fetge i hi ha una tendència a presentar més lesions i que aquestes siguin més grans. A més a més, aquests animals tenen l'apoptosi reduïda al fetge i una tendència a reducció en inflamació i senescència. Presenta llavors un fenotip bastant semblant a l'observat en els CPEB<sup>LKO</sup>, suggerint que el noqueix de CPEB4 tant als hepatòcits com a la línia mieloide pot estar promovent l'evasió immunitària per part de les cèl·lules tumorals i amb això una major supervivència. Tindria sentit llavors que en model KO de cos sencer, on aquests dos factors (i d'altres) se sumen, el fenotip presenta una penetrància molt superior.

Aquests resultats posen de manifest com la manca de CPEB4 provoca un efecte significativament negatiu en la malaltia crònica del fetge i l'aparició de lesions malignes en aquest i com aquesta proteïna juga un paper important tant en el principal tipus cel·lular del fetge, els hepatòcits, com en l'infiltrat mieloide que permet la resposta immunitària.

Pel que fa al model d'hepatòcits però, sí que podem hipotetitzar a partir de les evidències obtingudes als anàlisis de transcriptòmica per RNA total i RNA unit a ribosomes, que la manca de CPEB4 als hepatòcits afecta no només a la resposta UPR com ja sabíem, sinó també a la resposta immunitària a través de vies on intervien els interferons. Aquests, resolen la infiltració inflamatòria i inhibeixen la conversió dels macròfags a pro-inflamatoris i l'activació de l'inflamasoma. Un exemple és la reparació del teixit pulmonar danyat i la restitució de l'homeòstasi al teixit, on cal supressió immunitària i reducció de la resposta dels macròfags, d'això se n'encarreguen els INF de tipus I<sup>259</sup>. Els INFs generen tota una sèrie de modificacions epigenètiques gràcies a la transcripció de gens estimulats per INF (ISF) i aquests a part de participar en la resposta immunitària, poden arribar a alterar el metabolisme dels lípids<sup>260</sup>.

Tot i que INF s'ha considerat principalment una citoquina anti-tumoral ja que la produeixen cèl·lules citotòxiques com NK i NKT, s'ha vist que pot tenir un important rol tolerogènic a través de les DC i les Tregs<sup>261</sup>. En càncer s'ha demostrat que els interferons poden tenir una funció dual depenent del microambient<sup>262</sup>. Jugarien un paper essencial en l'anomenat immuno-edició cancerígena, mitjançant la qual l'ambient inflamatori que envolta les cèl·lules tumorals canvia de manera que pot ser anti o pro-tumoral en un procés que té lloc en tres fases: eliminació, equilibri i fugida<sup>263</sup>. Els interferons intervien en aquest procés de manera que poden promoure l'estat de dormància a les cèl·lules tumorals que els permet arribar a la fase de fugida i créixer de manera progressiva i maligna. Aquest efecte pro-tumoral s'ha demostrat també en càncer d'ovari<sup>264</sup> i càncer pulmonar a través de la via JAK/STAT3 i la inducció de conversió dels macròfags a TAM<sup>154,265</sup>.

Els lleugers increments en marcadors de fibrosi i angiogènesi poden estar relacionats amb la manca de CPEB4 però també amb l'empitjorament general del fetge d'aquests animals a setmana 50. D'aquestes dades, el més interessant és la pujada de VEGF, un factor que estimula la formació de vasculatura i de fet participa tant de la vasculogènesi fisiològica com

---

de l'angiogènesi tant patològica com fisiològica. En el nostre estudi veiem un increment en els animals KO HFD i això té sentit ja que indicaria que els teixits estan més danyats i expressen senyals per a incrementar la vasculatura i d'aquesta manera poder reparar més ràpidament el teixit. És curiós ja que estudis del nostre grup han demostrat que CPEB4 regula l'expressió de VEGF<sup>217</sup> i per tant en un KO podríem esperar una reducció d'aquest marcador, però com que parlem d'una malaltia crònica i de càncer, han pogut tenir lloc molts esdeveniments que han permès el *bypass* i l'increment de VEGF. També pot estar relacionat amb la quantitat de tumors. La sobre expressió de VEGF<sup>165</sup> en HCC s'ha descrit com a una estratègia tumoral per a induir la proliferació de les cèl·lules endotelials i així permetre també la seva migració i formació de túbuls que promouen la carcinogènesi i la metàstasi<sup>266</sup>. A més s'ha de tenir en compte que el VEGF és un factor no només pro-angiogènic sinó també pro-inflamatori i podria contribuir a les alteracions observades al microambient pro-tumoral durant l'obesitat.

Tot plegat destacaria el potencial de CPEB4 com a proteïna supressora o limitant de les propietats tumorigèniques i inclús proliferatives de les cèl·lules tumorals en el cas del càncer de fetge, però donat l'increment en la penetrància del fenotip en els animals KO de tot el cos, podem dir que CPEB4 també té un efecte en altres factors com pot ser l'evasió del sistema immunitari i la polarització tolerogènica d'aquest, que permet que les lesions sobrevisquin més i prosperin causant HCC.



## CONCLUSIONS

---



## 8. CONCLUSIONS

Aquest estudi proporciona evidències del paper protector de CPEB4 enfront al desenvolupament de càncer de fetge i suggereix noves implicacions d'aquesta proteïna en relació a les vies de senescència i evasió immunitària així com les capacitats *stem* o tumorigèniques de les cèl·lules tumorals derivades d'hepatòcits. Les funcions pleiotròpiques i dependents del micro-ambient de CPEB4 en malaltia segueixen sent un repte i una peça clau pendent de definir amb exactitud per tal poder dissenyar opcions terapèutiques eficients. Cal definir un marc molt específic d'utilització d'aquesta molècula per a cada tipus de malaltia i estadi de la mateixa. Podem dir però, que en el cas de la malaltia crònica del fetge, CPEB4 té un paper protector o beneficiós.

Les principals conclusions són les següents:

1. CPEB4 limita el guany de pes corporal i l'acumulació de greix al teixit hepàtic quan hi ha malaltia crònica del fetge.
2. CPEB4 protegeix el fetge de l'aparició de lesions malignes davant d'un estímul de dieta greixosa. La seva manca incrementa el nombre de lesions i el seu potencial maligne però no afecta a la mida d'aquestes lesions.
3. La manca de CPEB4 podria estimular l'entrada dels hepatòcits en senescència o un tipus de quiescència cel·lular que sembla propiciar l'establiment i progressió de la cèl·lula mutada al teixit.
4. Els hepatòcits KO per a CPEB4 són més tumorigènics ja que tenen més capacitat de formar colònies de cèl·lules tumorals en cultiu i de desenvolupar tumors de gran mida en models de ratolí al·lografts.
5. La manca de CPEB4 a tot l'organisme podria estimular l'evasió del sistema immunitari per part de les cèl·lules tumorals a causa de l'adquisició d'un fenotip tolerogènic per part de la resposta immunitària.
6. CPEB4 participa en la resposta immunitària anti-tumoral ja que la seva manca a la línia mieloide estimula un increment en l'aparició d'adenomes al fetge i un lleuger increment en la quantitat de lesions i la mida d'aquestes.
7. La fibrosi i l'angiogènesi incrementen amb la manca de CPEB4 però semblen jugar papers secundaris en el procés carcinogènic relacionat amb CPEB4 i l'obesitat.

Tot plegat destacaria el potencial de CPEB4 com a proteïna supressora o limitant de les propietats tumorigèniques i inclús proliferatives de les cèl·lules tumorals en el cas del càncer de fetge, però donat l'increment en la penetrància del fenotip en els animals KO de tot el cos, podem dir que CPEB4 també té un efecte en altres factors com pot ser la polarització o evasió del sistema immunitari que permet que les lesions sobrevisquin més i prosperin causant HCC.



## BIBLIOGRAFIA

---



## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Fernández M. Molecular pathophysiology of Portal Hypertension. *Hepatology*. 2015;61:1406-1415. doi:10.1007/978-3-642-37078-6\_141
2. Tajiri K, Shimizu Y. Liver Diseases in the Elderly. In: *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. ; 2017:331-339. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00026-6
3. Abdel-Misih, Z. SR, Bloomston M. Liver Anatomy. *Surg Clin North Am*. 2010;90(4):643-653. doi:10.1016/j.suc.2010.04.017.Liver
4. Bleser D, Braet F, Lovisetti, et al. Leading article -Hepatology series Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut*. 1994;35:1509-1516.
5. Deleve LD. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2015;61(5):1740-1746. doi:10.1002/hep.27376
6. Iwakiri Y, Shah V, Rockey DC. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis - Current status and future directions. *J Hepatol*. 2014;61(4):912-924. doi:10.1016/j.jhep.2014.05.047
7. Friedman SL. Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008;88(1):125-172. doi:10.1152/physrev.00013.2007
8. Maxson & Mitchell. Energy Metabolism in the Liver. *Physiol Behav*. 2016;176(1):139-148. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
9. Casotti V, Antiga LD. Basic Principles of Liver Physiology. In: *Springer Nature*. ; 2019:21-39. doi:10.1007/978-3-319-96400-3
10. Ke PY. Diverse functions of autophagy in liver physiology and liver diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2). doi:10.3390/ijms20020300
11. Schulze R, Schott M, Casey C, Tuma P, McNiven M. The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. *J Cell Biol*. 2019;218(7):2096-2112. doi:10.1083/jcb.201903090
12. Guidotti JE, Brégerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdouets C. Liver cell polyploidization: A pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem*. 2003;278(21):19095-19101. doi:10.1074/jbc.M300982200
13. Margall-Ducos G, Celton-Morizur S, Couton D, Brégerie O, Desdouets C. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. *J Cell Sci*. 2007;120(20):3633-3639. doi:10.1242/jcs.016907
14. Wakabayashi Y, Dutt P, Lippincott-Schwartz J, Arias IM. Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(42):15087-15092. doi:10.1073/pnas.0503702102
15. Levitt DG, Levitt MD. Human serum albumin homeostasis: A new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *Int J Gen Med*. 2016;9:229-255. doi:10.2147/IJGM.S102819
16. Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(5):313-326. doi:10.1038/nrm.2017.132
17. Treyer A, Müsch A. Hepatocyte Polarity Aleksandr. *Compr Physiol*. 2013;3(1):243-287.

- doi:10.1038/jid.2014.371
18. In JG, Tuma PL. MAL2 selectively regulates polymeric IgA receptor delivery from the golgi to the plasma membrane in WIF-B cells. *Traffic*. 2010;11(8):1056-1066. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01074.x
  19. Ramnarayanan SP, Tuma PL. MAL, but not MAL2, expression promotes the formation of cholesterol-dependent membrane domains that recruit apical proteins. *Biochem J*. 2011;439(3):497-504. doi:10.1042/BJ20110803
  20. Shen W-J, Azhar S, Kraemer FB. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu Rev Physiol*. 2018;80(1):95-116. doi:10.1146/annurev-physiol-021317-121550
  21. Santos AJM, Nogueira C, Ortega-Bellido M, Malhotra V. TANGO1 and Mia2/cTAGE5 (TALI) cooperate to export bulky pre-chylomicrons/VLDLs from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2016;213(3):343-354. doi:10.1083/jcb.201603072
  22. Raote I, Malhotra V. Protein transport by vesicles and tunnels. *J Cell Biol*. 2019;218(3):737-739. doi:10.1083/jcb.201811073
  23. Zanoni P, Velagapudi S, Yalcinkaya M, Rohrer L, von Eckardstein A. Endocytosis of lipoproteins. *Atherosclerosis*. 2018;275:273-295. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.881
  24. Fedoseienko A, Wijers M, Wolters JC, et al. The COMMD family regulates plasma LDL levels and attenuates atherosclerosis through stabilizing the CCC complex in endosomal LDLR trafficking. *Circ Res*. 2018;122(12):1648-1660. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312004
  25. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(3):137-155. doi:10.1038/s41580-018-0085-z
  26. Yang L, Yang C, Thomes PG, et al. Lipophagy and alcohol-induced fatty liver. *Front Pharmacol*. 2019;10(MAY):1-13. doi:10.3389/fphar.2019.00495
  27. Morita K, Hama Y, Izume T, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies TMEM41B as a gene required for autophagosome formation. *J Cell Biol*. 2018;217(11):3817-3828. doi:10.1083/jcb.201804132
  28. Zhou Z, Xu MJ, Gao B. Hepatocytes: A key cell type for innate immunity. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(3):301-315. doi:10.1038/cmi.2015.97
  29. Xu MJ, Feng D, Wu H, et al. Liver is the major source of elevated serum lipocalin-2 levels after bacterial infection or partial hepatectomy: A critical role for IL-6/STAT3. *Hepatology*. 2015;61(2):692-702. doi:10.1002/hep.27447
  30. Schrem H, Klempnauer R, Borlak R. Liver-Enriched Transcription Factors in Liver Function and Development. Part II: the C/EBPs and D Site-Binding Protein in Cell Cycle Control, Carcinogenesis, Circadian Gene Regulation, Liver Regeneration, Apoptosis, and Liver-Specific Gene Regulation. *Cell Cycle*. 2004;56(2):291-330. doi:10.1124/pr.56.2.5.291
  31. Holers VM. Complement and Its Receptors: New Insights into Human Disease. *Annu Rev Immunol*. 2014;32(1):433-459. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120154
  32. Endo Y, Nakazawa N, Iwaki D, Takahashi M, Matsushita M, Fujita T. Interactions of ficolin and mannose-binding lectin with fibrinogen/fibrin augment the lectin complement pathway. *J Innate Immun*. 2009;2(1):33-42. doi:10.1159/000227805

33. Armstrong PB. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology*. 2006;211(4):263-281. doi:10.1016/j.imbio.2006.01.002
34. Chang B, Xu MJ, Zhou Z, et al. Short- or long-term high-fat diet feeding plus acute ethanol binge synergistically induce acute liver injury in mice: An important role for CXCL1. *Hepatology*. 2015;62(4):1070-1085. doi:10.1002/hep.27921
35. Haniffa M and RG. Human and mouse mononuclear phagocyte networks : a tale of two species ? *Front Immunol*. 2015;6(June):1-15. doi:10.3389/fimmu.2015.00330
36. Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(5):306-321. doi:10.1038/nri.2017.11
37. Bordon Y. Kupffer cells: finding their niche. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(11):660-661. doi:10.1038/s41577-019-0231-7
38. De Kleer I, Willems F, Lambrecht B, Goriely S. Ontogeny of myeloid cells. *Front Immunol*. 2014;5(AUG):1-11. doi:10.3389/fimmu.2014.00423
39. Perdiguero EG, Klapproth K, Schulz C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk sac-derived erythro-myeloid progenitors. 2015;518(7540):547-551. doi:10.1038/nature13989.Tissue-resident
40. Guillot A, Tacke F. Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights. *Hepatol Commun*. 2019;3(6). doi:10.1002/hep4.1356
41. Donnelly DJ, Longbrake EE, Shawler TM, et al. Deficient CX3CR1 signaling promotes recovery after mouse spinal cord injury by limiting the recruitment and activation of Ly6Clo/iNOS+ macrophages. *J Neurosci*. 2011;31(27):9910-9922. doi:10.1523/JNEUROSCI.2114-11.2011
42. Ma C, Kesarwala AH, Eggert T, et al. NAFLD causes selective CD4+ T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature*. 2016;531(7593):253-257. doi:10.1038/nature16969
43. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008
44. Yang L, Kwon J, Popov Y, et al. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology*. 2014;146(5):1339-1350. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.061
45. Patsenker E, Popov Y, Stickel F, et al. Pharmacological Inhibition of Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 Aggravates Experimental Liver Fibrosis and Suppresses Hepatic Angiogenesis. *Hepatology*. 2009;50(5):1501-1511. doi:10.1002/hep.23144
46. Harty MW, Muratore CS, Papa EF, et al. Neutrophil depletion blocks early collagen degradation in repairing cholestatic rat livers. *Am J Pathol*. 2010;176(3):1271-1281. doi:10.2353/ajpath.2010.090527
47. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: Immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):181-194. doi:10.1038/nri3623
48. Wree A, McGeough MD, Inzaugarat ME, et al. NLRP3 inflammasome driven liver injury and fibrosis: Roles of IL-17 and TNF in mice. *Hepatology*. 2018;67(2):736-749. doi:10.1002/hep.29523

49. Langhans B, Alwan AW, Krämer B, et al. Regulatory CD4<sup>+</sup> T cells modulate the interaction between NK cells and hepatic stellate cells by acting on either cell type. *J Hepatol*. 2015;62(2):398-404. doi:10.1016/j.jhep.2014.08.038
50. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:425-456. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130246
51. Bandyopadhyay K, Marrero I, Kumar V. NKT cell subsets as key participants in liver physiology and pathology. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(3):337-346. doi:10.1038/cmi.2015.115
52. Bertoletti A. T cell fitness in the liver: How can T cells keep it up? *J Hepatol*. 2016;64(6):1208-1210. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.035
53. Melton AC, Yee HF. Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis. *Hepatology*. 2007;45(6):1446-1453. doi:10.1002/hep.21606
54. Khomich O, Ivanov A V., Bartosch B. Metabolic Hallmarks of Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis. *Cells*. 2019;9(1):24. doi:10.3390/cells9010024
55. Marrone G, Shah VH, Gracia-Sancho J. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *J Hepatol*. 2016;65(3):608-617. doi:10.1016/j.jhep.2016.04.018
56. Xiang DM, Sun W, Ning BF, et al. The HLF/IL-6/STAT3 feedforward circuit drives hepatic stellate cell activation to promote liver fibrosis. *Gut*. 2018;67(9):1704-1715. doi:10.1136/gutjnl-2016-313392
57. Lopez ON, Bohanon FJ, Wang X, et al. STAT3 Inhibition Suppresses Hepatic Stellate Cell Fibrogenesis: HJC0123, a Potential Therapeutic Agent for Liver Fibrosis. *RSC*. 2016;6(102):100652-100663. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
58. Perepelyuk M, Terajima M, Wang AY, et al. Hepatic stellate cells and portal fibroblasts are the major cellular sources of collagens and lysyl oxidases in normal liver and early after injury. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304(6):605-614. doi:10.1152/ajpgi.00222.2012
59. Philp CJ, Siebecke I, Clements D, et al. Extracellular matrix cross-linking enhances fibroblast growth and protects against matrix proteolysis in lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;58(5):594-603. doi:10.1165/rcmb.2016-0379OC
60. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):786-801. doi:10.1038/nrm3904
61. Carmona R, Barrena S, Muñoz-Chápuli R. Retinoids in stellate cells: Development, repair, and regeneration. *J Dev Biol*. 2019;7(2):1-12. doi:10.3390/JDB7020010
62. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(7):397-411. doi:10.1038/nrgastro.2017.38
63. Shirakami Y, Lee S, Clugston RD, Blaner WS. Biochimica et Biophysica Acta Hepatic metabolism of retinoids and disease associations ☆. *BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2012;1821(1):124-136. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.023
64. Radaeva S, Wang L, Radaev S, et al. Retinoic acid signaling sensitizes hepatic stellate cells to NK cell killing via upregulation of NK cell activating ligand RAE1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293:809-816. doi:10.1152/ajpgi.00212.2007.
65. Ghyselinck NB, Båvik C, Sapin V, et al. Cellular retinol-binding protein I is essential for

- vitamin A homeostasis. *EMBO J.* 1999;18(18):4903-4914.
66. Kluwe J, Wongsiriroj N, Troeger JS, et al. Absence of hepatic stellate cell retinoid lipid droplets does not enhance hepatic fibrosis but decreases hepatic carcinogenesis. *Gut.* 2011;60(9):1260-1268. doi:10.1136/gut.2010.209551
67. Deberardinis RJ, Thompson CB. Cellular metabolism and disease: What do metabolic outliers teach us? *Cell.* 2012;148(6):1132-1144. doi:10.1016/j.cell.2012.02.032
68. Liberti M V, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? (vol 41, pg 211, 2016). *Trends Biochem Sci.* 2016;41(3, SI):287. doi:10.1016/j.tibs.2016.01.004
69. Hou W, Syn WK. Role of metabolism in hepatic stellate cell activation and fibrogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6(NOV):1-10. doi:10.3389/fcell.2018.00150
70. Mejias M, Gallego J, Naranjo-Suarez S, et al. CPEB4 Increases Expression of PFKFB3 to Induce Glycolysis and Activate Mouse and Human Hepatic Stellate Cells, Promoting Liver Fibrosis. *Gastroenterology.* 2020. doi:10.1053/j.gastro.2020.03.008
71. Sørensen KK, McCourt P, Berg T, et al. The scavenger endothelial cell: A new player in homeostasis and immunity. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2012;303(12). doi:10.1152/ajpregu.00686.2011
72. Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol.* 2017;66(1):212-227. doi:10.1016/j.jhep.2016.07.009
73. Davies PF. Flow-Mediated Mechanotransduction. *Physiol Rev.* 1995;75(3).
74. Deleve LD. Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration Find the latest version : Review series Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. *J Clin Invest.* 2013;123(5):1861-1866. doi:10.1172/JCI66025.that
75. Gracia-Sancho J, Russo L, García-Calderó H, García-Pagán JC, García-Cardena G, Bosch J. Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver. *Gut.* 2011;60(4):517-524. doi:10.1136/gut.2010.220913
76. Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, et al. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest.* 1997;100(11):2923-2930. doi:10.1172/JCI119842
77. DeLeve LD, Wang X, Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology.* 2008;48(3):920-930. doi:10.1002/hep.22351
78. Shetty S, Lalor PF, Adams DH. Liver sinusoidal endothelial cells – gatekeepers of hepatic immunity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(9):555-567. doi:10.1038/s41575-018-0020-y
79. Limmer A, Ohl J, Kurts C, et al. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med.* 2000;6(12):1348-1354. doi:10.1038/82161
80. Carambia A, Freund B, Schwinge D, et al. Nanoparticle-based autoantigen delivery to Treg-inducing liver sinusoidal endothelial cells enables control of autoimmunity in mice. *J Hepatol.* 2015;62(6):1349-1356. doi:10.1016/j.jhep.2015.01.006
81. Böttcher JP, Schanz O, Garbers C, et al. IL-6 trans-Signaling-Dependent Rapid

- Development of Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T Cell Function. *Cell Rep.* 2014;8(5):1318-1327. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.008
82. Lohse AW, Knolle PA, Bilo K, et al. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology.* 1996;110(4):1175-1181. doi:10.1053/gast.1996.v110.pm8613007
83. Carambia A, Freund B, Schwinge D, et al. TGF- $\beta$ -dependent induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol.* 2014;61(3):594-599. doi:10.1016/j.jhep.2014.04.027
84. Marcellin P, Kutala BK. Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver Int.* 2018;38(December 2017):2-6. doi:10.1111/liv.13682
85. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2004;1(2):98-105. doi:10.1038/ncpgasthep0055
86. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol.* 2012;56(3):704-713. doi:10.1016/j.jhep.2011.09.020
87. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol.* 2017;9(16):715-732. doi:10.4254/wjh.v9.i16.715
88. Michelotti GA, Machado M V., Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(11):656-665. doi:10.1038/nrgastro.2013.183
89. Kanwar P, Kowdley K V. The Metabolic Syndrome and Its Influence on Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2016;20(2):225-243. doi:10.1016/j.cld.2015.10.002
90. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(18):3313-3327. doi:10.1007/s00018-018-2860-6
91. Simoes ICM, Janikiewicz J, Bauer J, et al. Fat and sugar—a dangerous duet. A comparative review on metabolic remodeling in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients.* 2019;11(12):1-35. doi:10.3390/nu11122871
92. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64(6):1388-1402. doi:10.1016/j.jhep.2015.11.004
93. Marchisello S, Di Pino A, Scicali R, et al. Pathophysiological, molecular and therapeutic issues of nonalcoholic fatty liver disease: An overview. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8). doi:10.3390/ijms20081948
94. Wobser H, Dorn C, Weiss TS, et al. Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Cell Res.* 2009;19(8):996-1005. doi:10.1038/cr.2009.73
95. Malehmir M, Pfister D, Gallage S, et al. Platelet GPIIb $\alpha$  is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. *Nat Med.* 2019;25(4):641-655. doi:10.1038/s41591-019-0379-5
96. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1343-1351. doi:10.1172/JCI23621

97. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*. 2013;499(7456):97-101. doi:10.1038/nature12347
98. Park EJ, Lee JH, Yu GY, et al. Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. *Cell*. 2010;140(2):197-208. doi:10.1016/j.cell.2009.12.052
99. Yang CH, Perumpail BJ, Jr JAK. Nutritional Needs and Support for Children with Chronic Liver Disease. *Nutrients*. 2017;9(10):1-16. doi:10.3390/nu9101127
100. Luangmonkong T, Su Suriguga, Mutsaers HAM, Groothuis GMM, Olinga P, Boersema M. Targeting Oxidative Stress for the Treatment of Liver Fibrosis Theerut. In: *Review in Physiological Biochemistry Pharmacology*. Vol 175. ; 2018:71-102. doi:10.1007/112
101. Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2014;548:20-37. doi:10.1016/j.abb.2014.02.015
102. Ding B-S, Cao Z, Lis R, et al. Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. *Nature*. 2014;505(7481):97-102. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
103. Rosselli M, MacNaughtan J, Jalan R, Pinzani M. Beyond scoring: A modern interpretation of disease progression in chronic liver disease. *Gut*. 2013;62(9):1234-1241. doi:10.1136/gutjnl-2012-302826
104. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7312-7324. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7312
105. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, et al. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS One*. 2011;6(1):2-9. doi:10.1371/journal.pone.0016081
106. Wang B, Li W, Guo K, Xiao Y, Wang Y, Fan J. MiR-181b Promotes hepatic stellate cells proliferation by targeting p27 and is elevated in the serum of cirrhosis patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;421(1):4-8. doi:10.1016/j.bbrc.2012.03.025
107. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, et al. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut*. 2012;61(11):1600-1609. doi:10.1136/gutjnl-2011-300717
108. Iizuka M, Ogawa T, Enomoto M, et al. Induction of microRNA-214-5p in human and rodent liver fibrosis. *Fibrogenes Tissue Repair*. 2012;5(1):1-9. doi:10.1186/1755-1536-5-12
109. Ringelhan M, Pfister D, O'Connor T, Pikarsky E, Heikenwalder M. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol*. 2018;19(3):222-232. doi:10.1038/s41590-018-0044-z
110. El Jabbour T, Lagana SM, Lee H. Update on hepatocellular carcinoma: Pathologists' review. *World J Gastroenterol*. 2019;25(14):1653-1665. doi:10.3748/wjg.v25.i14.1653
111. Hiyama E. Pediatric hepatoblastoma: diagnosis and treatment. *Transl Pediatr*. 2014;3(4):293-299. doi:10.3978/j.issn.2224-4336.2014.09.01
112. Sugawara Y, Tamura S, Kokudo N. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *J Japanese Soc Gastroenterol*. 2015;112(1):32-36. doi:10.11405/nisshoshi.112.32

113. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-1273.e1. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.061
114. Koh WP, Robien K, Wang R, Govindarajan S, Yuan JM, Yu MC. Smoking as an independent risk factor for hepatocellular carcinoma: The Singapore Chinese Health Study. *Br J Cancer*. 2011;105(9):1430-1435. doi:10.1038/bjc.2011.360
115. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84. doi:10.1002/hep.28431
116. Mancebo A, González-Diéguez ML, Cadahía V, et al. Annual Incidence of Hepatocellular Carcinoma Among Patients With Alcoholic Cirrhosis and Identification of Risk Groups. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(1):95-101. doi:10.1016/j.cgh.2012.09.007
117. Gouas D, Shi H, Hainaut P. The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): Biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Lett*. 2009;286(1):29-37. doi:10.1016/j.canlet.2009.02.057
118. Sun VCY, Sarna L. Symptom management in hepatocellular carcinoma. *Clin J Oncol Nurs*. 2008;12(5):759-766. doi:10.1188/08.CJON.759-766
119. Zhou J, Sun HC, Wang Z, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of primary liver cancer in China (2017 Edition). *Liver Cancer*. 2018;7(3):235-260. doi:10.1159/000488035
120. Waller LP, Deshpande V, Pylsopoulos N. Hepatocellular carcinoma: A comprehensive review. *World J Hepatol*. 2015;7(26):2648-2663. doi:10.4254/wjh.v7.i26.2648
121. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(10):589-604. doi:10.1038/s41575-019-0186-y
122. Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J Hepatol*. 2017;67(4):727-738. doi:10.1016/j.jhep.2017.05.014
123. Bruix J, Qin S, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2017;389(10064):56-66. doi:10.1016/S0140-6736(16)32453-9
124. Shigeta K, Datta M, Hato T, et al. Dual Programmed Death Receptor-1 and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Blockade Promotes Vascular Normalization and Enhances Antitumor Immune Responses in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2019;0(0):1-15. doi:10.1002/hep.30889
125. Zhang Q, He Y, Luo N, et al. Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cell*. 2019;179(4):829-845.e20. doi:10.1016/j.cell.2019.10.003
126. Eggert T, Wolter K, Ji J, et al. Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell*. 2016;30(4):533-547. doi:10.1016/j.ccell.2016.09.003
127. Alexander Y, Rudensky. Regulatory T Cells and Foxp3. *Immunol Rev*. 2011;241(1):260-268. doi:10.2217/FON.09.6.Dendritic
128. Meenakshi Sachdeva, Yogesh K Chawla SKA. Immunology of hepatocellular carcinoma.



- World J Gastroenterol.* 2015;7(17):2080-2090. doi:10.4254/wjh.v7.i17.2080
129. Lanaya H, Natarajan A, Komposch K, et al. EGFR has a tumour-promoting role in liver macrophages during hepatocellular carcinoma formation. *Nat Cell Biol.* 2014;16(10):972-981. doi:10.1038/ncb3031
  130. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2010;29(36):4989-5005. doi:10.1038/onc.2010.236
  131. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 2002;109 Suppl:S81-96.
  132. Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKK $\beta$  couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell.* 2005;121(7):977-990. doi:10.1016/j.cell.2005.04.014
  133. He G, Karin M. NF- $\kappa$ B and STAT3- key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res.* 2011;21(1):159-168. doi:10.1038/cr.2010.183
  134. Gough DJ. Mitochondrial STAT3 Supports Ras-Dependent Oncogenic Transformation. *Science (80- ).* 2011;1713(2009):1713-1716. doi:10.1126/science.1171721
  135. Zhao W, Su W, Kuang P, et al. The role of hepatic stellate cells in the regulation of T-cell function and the promotion of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 2012;41(2):457-464. doi:10.3892/ijo.2012.1497
  136. Baglieri J, Brenner DA, Kisseleva T. The role of fibrosis and liver-associated fibroblasts in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1723. doi:10.3390/ijms20071723
  137. Wu K, Ding J, Chen C, et al. Hepatic transforming growth factor beta gives rise to tumor-initiating cells and promotes liver cancer development. *Hepatology.* 2012;56(6):2255-2267.
  138. Haybaeck J, Nicolas Zeller, Wolf MJ, et al. A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell.* 2009;16(4):295-308. doi:10.1097/CCM.0b013e31823da96d.Hydrogen
  139. Finkin S, Yuan D, Stein I, et al. Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol.* 2015;16(12):1235-1244. doi:10.1038/ni.3290
  140. Gomes AL, Teijeiro A, Burén S, et al. Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell.* 2016;30(1):161-175. doi:10.1016/j.ccell.2016.05.020
  141. Lee HL, Jang JW, Lee SW, et al. Inflammatory cytokines and change of Th1/Th2 balance as prognostic indicators for hepatocellular carcinoma in patients treated with transarterial chemoembolization. *Sci Rep.* 2019;9(1):4-11. doi:10.1038/s41598-019-40078-8
  142. Schneider C, Teufel A, Yevsa T, et al. Adaptive immunity suppresses formation and progression of diethylnitrosamine-induced liver cancer. *Gut.* 2012;61(12):1733-1743. doi:10.1136/gutjnl-2011-301116
  143. Sui Q, Zhang J, Sun X, Zhang C, Han Q, Tian Z. NK Cells Are the Crucial Antitumor Mediators When STAT3-Mediated Immunosuppression Is Blocked in Hepatocellular Carcinoma. *J Immunol.* 2014;193(4):2016-2023. doi:10.4049/jimmunol.1302389
  144. Tang D, Lotze MT, Kang R, Zeh HJ. Apoptosis promotes early tumorigenesis. *Oncogene.*

- 2011;30(16):1851-1854. doi:10.1038/onc.2010.573
145. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
  146. García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial Oxidative Stress and Antioxidants Balance in Fatty Liver Disease. *Hepatology Commun.* 2018;2(12):1425-1439. doi:10.1002/hep4.1271
  147. Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, et al. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. *J Cell Biol.* 1998;143(1):217-224. doi:10.1083/jcb.143.1.217
  148. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell Death. *N Engl J Med.* 2009;361:1570-1583.
  149. Ichim G, Lopez J, Ahmed SU, et al. Limited Mitochondrial Permeabilization Causes DNA Damage and Genomic Instability in the Absence of Cell Death. *Mol Cell.* 2015;57(5):860-872. doi:10.1016/j.molcel.2015.01.018
  150. Moreno-Cáceres J, Fabregat I. Apoptosis in liver carcinogenesis and chemotherapy. *Hepatic Oncol.* 2015;2(4):381-397. doi:10.2217/hep.15.27
  151. Marquardt JU, Edlich F. Predisposition to Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma: From Mechanistic Insights to Therapeutic Strategies. *Front Oncol.* 2019;9(December):1-9. doi:10.3389/fonc.2019.01421
  152. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999;18(49):6853-6866.
  153. Sun B, Karin M. NF-κB signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene.* 2008;27(48):6228-6244. doi:10.1038/onc.2008.300
  154. Zhang X, Zeng Y, Qu Q, et al. PD-L1 induced by IFN-γ from tumor-associated macrophages via the JAK/STAT3 and PI3K/AKT signaling pathways promoted progression of lung cancer. *Int J Clin Oncol.* 2017;22(6):1026-1033. doi:10.1007/s10147-017-1161-7
  155. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012;149(5):1060-1072. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042
  156. Louandre C, Marcq I, Bouhhal H, et al. The retinoblastoma (Rb) protein regulates ferroptosis induced by sorafenib in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2015;356(2):971-977. doi:10.1016/j.canlet.2014.11.014
  157. Persad R, Liu C, Wu TT, et al. Overexpression of caspase-3 hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol.* 2004;17(7):861-867. doi:10.1038/modpathol.3800146
  158. Shang N, Bank T, Ding X, et al. Caspase-3 suppresses diethylnitrosamine-induced hepatocyte death, compensatory proliferation and hepatocarcinogenesis through inhibiting p38 activation. *Cell Death Dis.* 2018;9(5). doi:10.1038/s41419-018-0617-7
  159. Faget D V., Ren Q, Stewart SA. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(8):439-453. doi:10.1038/s41568-019-0156-2
  160. Hernandez-Segura A, de Jong T V., Melov S, Guryev V, Campisi J, Demaria M. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol.* 2017;27(17):2652-2660.e4. doi:10.1016/j.cub.2017.07.033

161. Wang ST, Huang SW, Liu KT, Lee TY, Shieh JJ, Wu CY. Atorvastatin-induced senescence of hepatocellular carcinoma is mediated by downregulation of hTERT through the suppression of the IL-6/STAT3 pathway. *Cell Death Discov.* 2020;6(1). doi:10.1038/s41420-020-0252-9
162. Loo TM, Kamachi F, Watanabe Y, et al. Gut microbiota promotes obesity-associated liver cancer through pge2-mediated suppression of antitumor immunity. *Cancer Discov.* 2017;7(5):522-538. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0932
163. Soriani A, Zingoni A, Cerboni C, et al. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood.* 2009;113(15):3503-3511. doi:10.1182/blood-2008-08-173914
164. Greenbaum LE. Cell cycle regulation and hepatocarcinogenesis. *Cancer Biol Ther.* 2004;3(12):1200-1207. doi:10.4161/cbt.3.12.1392
165. Ho DWH, Lo RCL, Chan LK, Ng IOL. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer.* 2016;5(4):290-302. doi:10.1159/000449340
166. Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2008;48(4):1312-1327. doi:10.1002/hep.22506
167. Chai EZP, Shanmugam MK, Arfuso F, et al. Targeting transcription factor STAT3 for cancer prevention and therapy. *Pharmacol Ther.* 2016;162:86-97. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.10.004
168. OShea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: New surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell.* 2002;109(2 SUPPL. 1):121-131. doi:10.1016/S0092-8674(02)00701-8
169. Xie TX, Wei D, Liu M, et al. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene.* 2004;23(20):3550-3560. doi:10.1038/sj.onc.1207383
170. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell.* 2011;146(6):873-887. doi:10.1016/j.cell.2011.08.039
171. Ramirez M, Fernandez M. Pathological Angiogenesis: The New Culprit behind Chronic Liver Disease. *OBM Hepatol Gastroenterol.* 2019;3(3):1-1. doi:10.21926/obm.hg.1903030
172. Semela D, Dufour JF. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2004;41(5):864-880. doi:10.1016/j.jhep.2004.09.006
173. Zhuang PY, Wang JD, Tang ZH, et al. Higher proliferation of peritumoral endothelial cells to IL-6/sIL-6R than tumoral endothelial cells in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2015;15(1):1-9. doi:10.1186/s12885-015-1763-2
174. Ramirez-Pedraza M, Fernández M. Interplay Between Macrophages and Angiogenesis: A Double-Edged Sword in Liver Disease. *Front Immunol.* 2019;10(December):1-12. doi:10.3389/fimmu.2019.02882
175. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med.* 2011;17(11):1359-1370. doi:10.1038/nm.2537
176. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008;359(4):378-390. doi:10.1056/NEJMoa0708857

177. Teufel M, Seidel H, Köchert K, et al. Biomarkers Associated With Response to Regorafenib in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2019;156(6):1731-1741. doi:10.1053/j.gastro.2019.01.261
178. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298-307. doi:10.1038/nature10144
179. Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol*. 2009;50(3):604-620. doi:10.1016/j.jhep.2008.12.011
180. Palma M De, Biziato D, Petrova T V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Publ Gr*. 2017;17(8):457-474. doi:10.1038/nrc.2017.51
181. Mejias M, Garci-Pras E, Tiani C, Miquel R, Bosch J, Fernandez M. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology*. 2009;49(4):1245-1256. doi:10.1002/hep.22758
182. Géraud C, Mogler C, Runge A, et al. Endothelial transdifferentiation in hepatocellular carcinoma: Loss of Stabilin-2 expression in peri-tumourous liver correlates with increased survival. *Liver Int*. 2013;33(9):1428-1440. doi:10.1111/liv.12262
183. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(2):85-95. doi:10.1038/nrc2981
184. Denko NC. Hypoxia, HIF and metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(September):705-713.
185. Amann T, Maegdefrau U, Hartmann A, et al. GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2009;174(4):1544-1552. doi:10.2353/ajpath.2009.080596
186. Iansante V, Choy PM, Fung SW, et al. PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation. *Nat Commun*. 2015;6. doi:10.1038/ncomms8882
187. Liu Y, Wang Z, Wang J, et al. A histone deacetylase inhibitor, largazole, decreases liver fibrosis and angiogenesis by inhibiting transforming growth factor- $\beta$  and vascular endothelial growth factor signalling. *Liver Int*. 2013;33(4):504-515. doi:10.1111/liv.12034
188. Zimmermann A. Invasion Patterns and Metastatic Patterns of Hepatocellular Carcinoma. In: *Tumors and Tumor-Like Lesions of the Hepatobiliary Tract*. ; 2017. doi:10.1007/978-3-319-26956-6
189. Kim T, Veronese A, Pichiorri F, et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J Exp Med*. 2011;208(5):875-883. doi:10.1084/jem.20110235
190. Riener MO, Fritzsche FR, Soll C, et al. Expression of the extracellular matrix protein periostin in liver tumours and bile duct carcinomas. *Histopathology*. 2010;56(5):600-606. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03527.x
191. Clevers H. The cancer stem cell: Premises, promises and challenges. *Nat Med*. 2011;17(3):313-319. doi:10.1038/nm.2304
192. Lee TKW, Castilho A, Cheung VCH, Tang KH, Ma S, Ng IOL. CD24 + Liver Tumor-Initiating Cells Drive Self-Renewal and Tumor Initiation through STAT3-Mediated NANOG Regulation. *Cell Stem Cell*. 2011;9(1):50-63. doi:10.1016/j.stem.2011.06.005

193. Mokkapati S, Niopek K, Huang L, et al.  $\beta$ -Catenin activation in a novel liver progenitor cell type is sufficient to cause hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma. *Cancer Res.* 2014;74(16):4515-4525. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3275
194. Shibata T, Aburatani H. Exploration of liver cancer genomes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11(6):340-349. doi:10.1038/nrgastro.2014.6
195. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet.* 2015;47(5):505-511. doi:10.1038/ng.3252
196. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet.* 2014;46(12):1267-1273. doi:10.1038/ng.3126
197. Toh TB, Lim JJ, Chow EK-H. Epigenetics of hepatocellular carcinoma. *Clin Transl Med.* 2019;8(1). doi:10.1186/s40169-019-0230-0
198. Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet.* 2011;12(8):529-541. doi:10.1038/nrg3000
199. Shen J, Wang S, Zhang YJ, et al. Exploring genome-wide DNA methylation profiles altered in hepatocellular carcinoma using Infinium HumanMethylation 450 BeadChips. *Epigenetics.* 2013;8(1):34-43. doi:10.4161/epi.23062
200. Tao R, Li J, Xin J, et al. Methylation profile of single hepatocytes derived from hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2011;6(5). doi:10.1371/journal.pone.0019862
201. Revall K, Wang T, Lachenmayer A, et al. Genome-wide methylation analysis and epigenetic unmasking identify tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2013;145(6):1424-1435.e25. doi:10.1053/j.gastro.2013.08.055
202. Chen Y, Lin MC, Yao H, et al. Lentivirus-mediated RNA interference targeting enhancer of zeste homolog 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth through down-regulation of stathmin. *Hepatology.* 2007;46(1):200-208. doi:10.1002/hep.21668
203. Fernández-Miranda G, Méndez R. The CPEB-family of proteins, translational control in senescence and cancer. *Ageing Res Rev.* 2012;11(4):460-472. doi:10.1016/j.arr.2012.03.004
204. Belloc E, Piqué M, Méndez R. Sequential waves of polyadenylation and deadenylation define a translation circuit that drives meiotic progression. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(4):665-670. doi:10.1042/BST0360665
205. Wang X, Cooper NGF. Comparative in Silico Analyses of Cpeb1 - 4 with Functional Predictions. *Bioinform Biol Insights.* 2010;4:61-83.
206. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova T V. THE MECHANISM OF EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(2):113-127. doi:10.1038/nrm2838.THE
207. Kahvejian A, Svitkin Y V., Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* 2005;19(1):104-113. doi:10.1101/gad.1262905
208. Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(10):827-835. doi:10.1038/nrm1488

209. Min Gao, Fritz DT, Ford LP, Wilusz J. Interaction between a Poly(A)-Specific Ribonuclease and the 5' Cap Influences mRNA Deadenylation Rates In Vitro. *Mol Cell*. 2000;5(3):479-488. doi:10.1038/jid.2014.371
210. Mendez R, Richter JD. Translational control by CPEB: A means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(7):521-529. doi:10.1038/35080081
211. Afroz T, Skrisovska L, Belloc E, Guillén-Boixet J, Méndez R, Allain FHT. A fly trap mechanism provides sequence-specific RNA recognition by CPEB proteins. *Genes Dev*. 2014;28(13):1498-1514. doi:10.1101/gad.241133.114
212. Giangarrà V, Igea A, Castellazzi CL, Bava FA, Mendez R. Global analysis of CPEBs reveals sequential and non-redundant functions in mitotic cell cycle. *PLoS One*. 2015;10(9):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0138794
213. Chen PJ, Huang YS. CPEB2-eEF2 interaction impedes HIF-1 $\alpha$  RNA translation. *EMBO J*. 2012;31(4):959-971. doi:10.1038/emboj.2011.448
214. D'Ambrogio A, Nagaoka K, Richter JD. Translational control of cell growth and malignancy by the CPEBs. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(4):283-290. doi:10.1038/nrc3485
215. Alexandrov IM, Ivshina M, Jung DY, et al. Cytoplasmic polyadenylation element binding protein deficiency stimulates PTEN and Stat3 mRNA translation and induces hepatic insulin resistance. *PLoS Genet*. 2012;8(1). doi:10.1371/journal.pgen.1002457
216. Maillo C, Martín J, Sebastián D, et al. Circadian- and UPR-dependent control of CPEB4 mediates a translational response to counteract hepatic steatosis under ER stress. *Nat Cell Biol*. 2017;19(2):94-105. doi:10.1038/ncb3461
217. Calderone V, Gallego J, Fernandez-Miranda G, et al. Sequential Functions of CPEB1 and CPEB4 Regulate Pathologic Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in Chronic Liver Disease. *Gastroenterology*. 2016;150(4):982-997.e30. doi:10.1053/j.gastro.2015.11.038
218. Garcia-Pras E, Gallego J, Coch L, et al. Role and therapeutic potential of vascular stem/progenitor cells in pathological neovascularisation during chronic portal hypertension. *Gut*. 2017;66(7):1306-1320. doi:10.1136/gutjnl-2015-311157
219. Hu W, Yuan B, Lodish HF. Cpeb4-mediated translational regulatory circuitry controls terminal erythroid differentiation. *Dev Cell*. 2014;30(6):660-672. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.061.Vascular
220. Hu J, Zhang L Bin, Chen Q, et al. Knockdown of CPEB4 expression suppresses cell migration and invasion via Akt pathway in non-small cell lung cancer. *Cell Biol Int*. 2018;42(11):1484-1491. doi:10.1002/cbin.10930
221. Wu YY, Hwang YT, Perng WC, et al. CPEB4 and IRF4 expression in peripheral mononuclear cells are potential prognostic factors for advanced lung cancer. *J Formos Med Assoc*. 2017;116(2):114-122. doi:10.1016/j.jfma.2016.01.009
222. Ortiz-Zapater E, Pineda D, Martínez-Bosch N, et al. Key contribution of CPEB4-mediated translational control to cancer progression. *Nat Med*. 2012;18(1):83-90. doi:10.1038/nm.2540
223. Pérez-Guijarro E, Karras P, Cifdaloz M, et al. Lineage-specific roles of the cytoplasmic polyadenylation factor CPEB4 in the regulation of melanoma drivers. *Nat Commun*. 2016;7(13418). doi:10.1038/ncomms13418

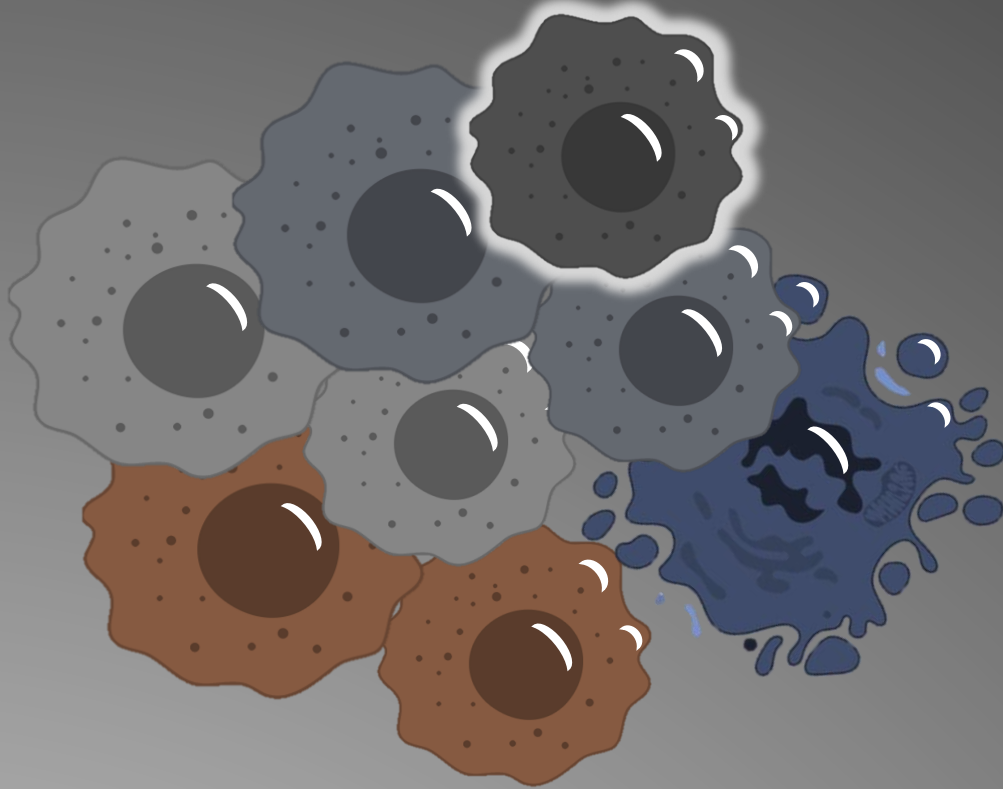
224. Chen W, Hu Z, Li X zhao, et al. CPEB4 interacts with Vimentin and involves in progressive features and poor prognosis of patients with astrocytic tumors. *Tumor Biol.* 2016;37(4):5075-5087. doi:10.1007/s13277-015-3975-0
225. Wang H xiang, Qin R, Mao J, et al. CPEB4 regulates glioblastoma cell proliferation and predicts poor outcome of patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2018;169(March):92-97. doi:10.1016/j.clineuro.2018.04.008
226. Zhijun L, Dapeng W, Hong J, Guicong W, Bingjian Y, Honglin L. Overexpression of CPEB4 in glioma indicates a poor prognosis by promoting cell migration and invasion. *Tumor Biol.* 2017;39(4):1-9. doi:10.1177/1010428317694538
227. Lu R, Zhou Z, Yu W, Xia Y, Zhi X. CPEB4 promotes cell migration and invasion via upregulating Vimentin expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;489(2):135-141. doi:10.1016/j.bbrc.2017.05.112
228. Cortés-Guiral D, Pastor-Iodate C, Díaz del Arco C, del Puerto-Nevado L, Fernández-Aceñero MJ. CPEB4 immunohistochemical expression is associated to prognosis in stage IV colorectal carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2017;213(6):639-642. doi:10.1016/j.prp.2017.04.020
229. Zhong X, Xiao Y, Chen C, et al. MicroRNA-203-mediated posttranscriptional deregulation of CPEB4 contributes to colorectal cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;466(2):206-213. doi:10.1016/j.bbrc.2015.09.008
230. Cao G, Chen D, Liu G, Pan Y, Liu Q. CPEB4 promotes growth and metastasis of gastric cancer cells via ZEB1-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Onco Targets Ther.* 2018;11:6153-6165. doi:10.2147/OTT.S175428
231. Zeng M, Li F, Wang L, et al. Downregulated cytoplasmic polyadenylation element-binding protein-4 is associated with the carcinogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2018;15(3):3226-3232. doi:10.3892/ol.2017.7661
232. Yang D, Liu K, Fan L, et al. LncRNA RP11-361F15.2 promotes osteosarcoma tumorigenesis by inhibiting M2-Like polarization of tumor-associated macrophages of CPEB4. *Cancer Lett.* 2020;473(301):33-49. doi:10.1016/j.canlet.2019.12.041
233. Tian Q, Liang L, Ding J, et al. MicroRNA-550a Acts as a Pro-Metastatic Gene and Directly Targets Cytoplasmic Polyadenylation Element-Binding Protein 4 in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One.* 2012;7(11):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0048958
234. Tsai LY, Chang YW, Lee MC, et al. Biphasic and stage-associated expression of CPEB4 in hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2016;11(5):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0155025
235. Xu H, Liu B. CPEB4 is a candidate biomarker for defining metastatic cancers and directing personalized therapies. *Med Hypotheses.* 2013;81(5):875-877. doi:10.1016/j.mehy.2013.08.030
236. Hotamisligil GS, Davis RJ. Cell signaling and stress responses. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(10). doi:10.1101/cshperspect.a006072
237. Kwok KHM, Rydén M, Andersson DP, et al. Prospective analyses of white adipose tissue gene expression in relation to long-term body weight changes. *Int J Obes.* 2020;44(2):377-387. doi:10.1038/s41366-019-0385-1
238. Akiyama M, Okada Y, Kanai M, et al. Genome-wide association study identifies 112 new loci for body mass index in the Japanese population. *Nat Genet.* 2017;49(10):1458-1467.

- doi:10.1038/ng.3951
239. Cubillos-Ruiz JR, Mohamed E, Rodriguez PC. Unfolding anti-tumor immunity: ER stress responses sculpt tolerogenic myeloid cells in cancer. *J Immunother Cancer*. 2017;5(1):1-10. doi:10.1186/s40425-016-0203-4
  240. Barthelme L, Tait IS. Liver cell adenoma and liver cell adenomatosis. *Hpb*. 2005;7(3):186-196. doi:10.1080/13651820510028954
  241. Guillén-Boixet J, Buzon V, Salvatella X, Méndez R. CPEB4 is regulated during cell cycle by ERK2/Cdk1-mediated phosphorylation and its assembly into liquid-like droplets. *Elife*. 2016;5(NOVEMBER2016):1-26. doi:10.7554/eLife.19298
  242. Shalini S, Nikolic A, Wilson CH, et al. Caspase-2 deficiency accelerates chemically induced liver cancer in mice. *Cell Death Differ*. 2016;23(10):1727-1736. doi:10.1038/cdd.2016.81
  243. Wree A, Johnson CD, Font-Burgada J, et al. Hepatocyte-specific Bid depletion reduces tumor development by suppressing inflammation-related compensatory proliferation. *Cell Death Differ*. 2015;22(12):1985-1994. doi:10.1038/cdd.2015.46
  244. Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonja T, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun*. 2017;8. doi:10.1038/ncomms15691
  245. Tominaga K, Suzuki HI. TGF- $\beta$  signaling in cellular senescence and aging-related pathology. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20). doi:10.3390/ijms20205002
  246. Chen H, Chen H, Liang J, et al. TGF- $\beta$ 1/IL-11/MEK/ERK signaling mediates senescence-associated pulmonary fibrosis in a stress-induced premature senescence model of Bmi-1 deficiency. *Exp Mol Med*. 2020;52(1):130-151. doi:10.1038/s12276-019-0371-7
  247. Xu M, Fang S, Song J, et al. CPEB1 mediates hepatocellular carcinoma cancer stemness and chemoresistance. *Cell Death Dis*. 2018;9(10). doi:10.1038/s41419-018-0974-2
  248. Lee H, Lee IS, Choue R. Obesity, inflammation and diet. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2013;16(3):143-152.
  249. House IG, Savas P, Lai J, et al. Macrophage-derived CXCL9 and CXCL10 are required for antitumor immune responses following immune checkpoint blockade. *Clin Cancer Res*. 2020;26(2):487-504. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1868
  250. Fabregat I, Moreno-Càceres J, Sánchez A, et al. TGF- $\beta$  signalling and liver disease. *FEBS J*. 2016;283:2219-2232. doi:10.1111/febs.13665
  251. Fabregat I, Caballero-Díaz D. Transforming growth factor- $\beta$ -induced cell plasticity in liver fibrosis and hepatocarcinogenesis. *Front Oncol*. 2018;8(SEP). doi:10.3389/fonc.2018.00357
  252. Huang C-K, Aihara A, Iwagami Y, et al. Expression of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Promotes Cholangiocarcinoma Development and Progression. *Cancer Lett*. 2016;380(1):153-162. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
  253. Dooley S, Ten Dijke P. TGF- $\beta$  in progression of liver disease. *Cell Tissue Res*. 2012;347(1):245-256. doi:10.1007/s00441-011-1246-y
  254. Polanczyk MJ, Walker E, Haley D, Guerrouahen BS, Akporiaye ET. Blockade of TGF- $\beta$  signaling to enhance the antitumor response is accompanied by dysregulation of the functional activity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells. *J Transl Med*. 2019;17(1):1-12. doi:10.1186/s12967-019-1967-3



255. Dewidar B, Soukupova J, Fabregat I, Dooley S. TGF- $\beta$  in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis: Updated. *Curr Pathobiol Rep*. 2015;3(4):291-305.
256. Baker KJ, Houston A, Brint E. IL-1 family members in cancer; two sides to every story. *Front Immunol*. 2019;10(JUN).
257. Ye J, Livergood RS, Peng G. The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity. *Am J Pathol*. 2013;182(1):10-20.
258. Grohmann M, Wiede F, Dodd GT, et al. Obesity Drives STAT-1-Dependent NASH and STAT-3-Dependent HCC. *Cell*. 2018;175(5):1289-1306.e20. doi:10.1016/j.cell.2018.09.053
259. Connolly E, Hussell T. The Impact of Type 1 Interferons on Alveolar Macrophage Tolerance and Implications for Host Susceptibility to Secondary Bacterial Pneumonia. *Front Immunol*. 2020;11(March). doi:10.3389/fimmu.2020.00495
260. Saka HA, Valdivia R. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:411-437. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-153958
261. Rozman P, Svajger U. The tolerogenic role of IFN- $\gamma$ . *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;41(December):1359-6101. doi:10.1016/j.cytogfr.2017.12.002
262. Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon- $\gamma$  in cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(19):6118-6124. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0482
263. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (80- )*. 2011;331(6024):1565-1570. doi:10.1126/science.1203486
264. Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, et al. IFN- $\gamma$  from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(9):1501-1509. doi:10.1038/bjc.2015.101
265. Park SH, Kang K, Giannopoulou E, et al. Type I interferons and the cytokine TNF cooperatively reprogram the macrophage epigenome to promote inflammatory activation. *Nat Immunol*. 2017;18(10):1104-1116. doi:10.1038/ni.3818
266. Chen CK, Yu WH, Cheng TY, et al. Inhibition of VEGF 165/VEGFR2-dependent signaling by LECT2 suppresses hepatocellular carcinoma angiogenesis. *Sci Rep*. 2016;6(August):1-12. doi:10.1038/srep31398





**Marta Ramírez Pedraza**

**Institut D'Investigacions Biomèdiques Agust Pi i Sunyer**

**Director de tesi: Dra. Mercedes Fernández Lobato**

**Tutor de tesi: Dr. Albert Tauler Girona**

**Grup d'Angiogènesi i malalties hepàtiques**

**Programa de doctorat en Biomedicina**

**2020**

