



UNIVERSIDAD AUSTRAL
FACULTAD DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

EL PAPEL DE SPARC (*Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine*) EN EL DAÑO HEPÁTICO AGUDO Y EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas por la Universidad Austral

MSc. Estanislao Peixoto

Director de tesis: Prof. Dr. Guillermo D. Mazzolini

Pilar, Argentina, Junio de 2016

EL PAPEL DE SPARC (*Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine*) EN EL DAÑO HEPÁTICO AGUDO Y EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

Resumen

La insuficiencia hepática aguda grave es un síndrome clínico caracterizado por un deterioro agudo y severo de la función hepática, producto de la destrucción masiva de los hepatocitos. El único tratamiento curativo es el trasplante hepático, que afronta un costo elevado y el problema de la escasez de órganos. Por otra parte, la cirrosis es el resultado final de procesos repetidos de daño y reparación crónicos causados por diversos agentes como el alcohol y la infección crónica por los virus de la hepatitis B y C. Tanto la falla hepática aguda como la cirrosis constituyen un problema de salud pública a nivel mundial.

SPARC es una glicoproteína matricelular, involucrada en diversos procesos biológicos como la remodelación tisular, el depósito de colágeno y la regeneración de tejidos. Existen resultados que han mostrado la inducción de SPARC en respuesta al daño hepático por diferentes causas. Más aún, se demostró en un modelo de fibrosis avanzada inducido por tioacetamida (TAA) que la ausencia de SPARC juega un rol protector en la fibrosis hepática.

Los objetivos principales de este trabajo de Tesis fueron estudiar el rol de SPARC en el daño hepático agudo y crónico y dilucidar los mecanismos moleculares y celulares implicados.

Para examinar el papel de SPARC en la injuria hepática se utilizaron tres modelos experimentales de daño hepático (concanavalina A, D-galactosamina/LPS y el anticuerpo agonista anti-CD95 Jo2), y en los tres se observó un incremento de los niveles de expresión de SPARC en el hígado, en comparación con los ratones sanos. Más aún, esa inducción fue observada también al comparar la expresión de SPARC en hígados de pacientes con hepatitis alcohólica aguda con sujetos sanos. Por otra parte, al analizar los niveles de daño hepático en ratones deficientes en SPARC o *knock out* (SPARC^{-/-}), se encontró una disminución significativa del daño en los modelos de injuria hepática evaluados. Inclusive, los ratones heterocigotos para SPARC mostraron un daño intermedio y los ratones SPARC^{-/-} que fueron tratados con un adenovirus que expresaba una secuencia antisentido para el ARNm de SPARC fueron sensibles nuevamente al daño inducido por Con A. Los ratones SPARC^{-/-} mostraron, además, una marcada reducción en el proceso necro-inflamatorio inducido por Con A. Asimismo, la magnitud del infiltrado por células T CD4⁺, la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6 y la presencia de apoptosis fueron notablemente atenuadas en los ratones SPARC^{-/-}. En

línea con este hallazgo, un análisis mediante microscopía electrónica reveló que la monocapa celular del endotelio sinusoidal hepático se encontraba preservada y estudios de inmunomarcación mostraron menor expresión de VCAM-1. En esta línea, los ensayos *in vitro* en células humanas endoteliales (HMEC-1) mostraron que el silenciamiento *in vitro* de SPARC redujo la magnitud de los eventos de autofagia inducidos por Con A. En conjunto, estos resultados sugieren que el endotelio sinusoidal hepático se encontraba menos activado en los ratones SPARC^{-/-} tratados con Con A, comparado con los ratones SPARC^{+/+}. Por otra parte, el análisis del transcriptoma reveló redes de genes que podrían jugar un rol en la atenuación del daño hepático encontrado en los ratones SPARC^{-/-} tratados con Con A, incluyendo genes involucrados en el proceso de apoptosis, desmontaje de la adhesión celular y organización del citoesqueleto. Posteriormente, se utilizaron diversas herramientas de terapia génica a fin de evaluar si la inhibición *in vivo* de la expresión de SPARC, tanto de manera previa como posterior al daño, podría ser utilizada como estrategia terapéutica. En ambos modelos, tanto preventivo como terapéutico, el silenciamiento de SPARC resultó en una inhibición sustancial de la magnitud del daño hepático. Como fue mencionado previamente, y de manera similar a lo observado en el daño hepático agudo, la ausencia de SPARC resultó en un efecto protector hepático en un modelo de fibrosis avanzada. Con el fin de estudiar los mecanismos involucrados en este fenómeno, se analizaron los cambios de la expresión génica y proteica utilizando *microarrays* o la plataforma 2D-DIGE, respectivamente, en muestras hepáticas de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} tratados 10 semanas con TAA. El estudio de expresión génica mostró que luego de 10 semanas de tratamiento con TAA los ratones SPARC^{-/-} presentaron incremento en la expresión de genes relacionados con la reparación de DNA y la proliferación celular. Más aún, los hígados de los ratones SPARC^{-/-} mostraron un incremento significativo de PCNA a las 24 horas, tanto en los niveles de expresión génica como de proteínas. De manera similar, la expresión de proteínas relacionadas con la regeneración hepática (IL-6, HGF e IGF-1) se incrementó en los ratones SPARC^{-/-}. Por otra parte, el análisis proteómico mostró un aumento en los niveles de proteínas involucradas con la detoxificación de especies reactivas del oxígeno (Catalasa, Peroxirredoxina-1 y Glutation-S-Transferasa P1 y Mu1) en los ratones SPARC^{-/-} tratados con TAA. De manera interesante, en un modelo de daño agudo *in vitro* (hepatocitos de ratones deficientes en SPARC tratados con TAA) se observó una reducción en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS). Más aún, las mitocondrias hepáticas de los ratones SPARC^{-/-} tratadas con Con A presentaron menores niveles de ROS, se encontraron mejor preservadas y la actividad de sus complejos se mostró reducida.

Tomando en conjunto estos resultados podemos sugerir que la ausencia de SPARC tanto en modelos de daño crónico como agudo se acompaña de disminución en el estrés oxidativo.

Finalmente, también se sometieron animales al modelo de ligadura del ducto colédoco y se observó en los ratones SPARC^{-/-} disminución de la magnitud de la fibrosis y de la inflamación y una caída en el número de miofibroblastos activados, acompañada de una disminución en los niveles de TGF- β 1, corroborando lo observado previamente en el modelo de TAA.

Conclusiones: las evidencias obtenidas en este trabajo de Tesis Doctoral permiten afirmar que la ausencia de SPARC juega un rol protector tanto ante un estímulo de daño agudo por Con A como ante estímulos crónicos fibrogénicos como la TAA o la ligadura del ducto colédoco. Más aún, esa protección podría deberse a una mayor capacidad proliferativa de los hepatocitos o a una mayor resistencia frente a la acción de ROS. En conclusión, estos resultados sugieren que SPARC podría considerarse como una nueva diana terapéutica en procesos que involucren injuria hepática aguda o crónica.

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer primero a la Universidad Austral y a la Facultad de Ciencias Biomédicas por permitirme y darme lugar para realizar mis estudios de Doctorado.

Al Dr. Guillermo Mazzolini que me guió durante todos estos años en el camino del conocimiento. Innumerables reuniones demuestran su paciencia para guiar y enseñar. Siempre optimista viendo el lado positivo de cada paso que daba durante la tesis. Aprendí muchísimo durante su dirección. No solo es un gran científico sino también una gran persona y un gran director que admiro mucho.

Al grupo de Terapia génica, que es un excelente grupo, no solo académicamente sino también por el nivel humano. Fue una gran experiencia positiva formar parte de este grupo.

Catalina Atorrasagasti, que me enseñó todo sobre SPARC, me introdujo a la línea "SPARCOSA", trabajamos muchísimo tiempo juntos y no solo eso, me escucho mil veces y me salvo varios viajes a capital.

Esteban Fiore, le retrasé varios viajes en tren, todavía no entiendo bien porque, pero que si medito sobre el tema fue muy bueno que el tren nunca llegara porque teníamos charlas muy buenas y descubrí a una gran persona. Me ayudó también muchísimo a inyectar ratones por la vena de la cola.

Juan Bayo, Juancito, si habré tenido conversaciones muy positivas con Juan, también fue un gran guía durante estos años. Siempre con la respuesta certera a todos los interrogantes filosóficos, académicos y técnicos. Pensar que cuando llegué ni hablábamos y en la medida que fue pasando el tiempo descubrí a un gran amigo.

Mariana Malvicini, la Colo, siempre poniendo lo mejor de ella, proponiendo y estimulando actividades para mantener al grupo unido, todas actividades buenísimas que siempre voy a recordar y que me ayudaron bastante a integrarme al grupo.

Mariana Garcia, otra fuente inagotable de sabiduría que me ayudó muchísimo estos años y me enseñó no solo de ciencia sino también lo que es una buena cerveza.

Flavia Piccioni, me introdujo al principio del doctorado en sus experimentos de biología molecular. Los viajes en combi con Flavia no me los voy a olvidar más, hablando sobre mil temas diferentes...se la extraña mucho en el laboratorio

Laura Alaniz y Miguel Rizzo, que durante los años que estuvieron en el laboratorio siempre estuvieron dispuestos a ayudar.

A Marcelo, Sofia y Agostina, que son los más nuevos del laboratorio y que trajeron muchísima onda positiva.

Jorge Aquino, con el tuve la primera entrevista, y desde entonces siempre fue un gran consejero y una fuente de motivación con sus palabras positivas.

A los compañeros del 5to piso, Norma, que la visité tantas veces para hablarle de las compras del laboratorio y terminábamos anotándonos para carreras de 10k y 21k, Guille, que me ayudó tanto con todo lo relacionado al Bioterio y que siempre estuvo para escucharme, Rodrigo, Mariana Malet, Tomas, Melisa, Mariela, Gustavo Mariana Banis, Vanina, Soledad, etc, cada uno tuvo un rol muy importante y compartimos momentos buenísimos durante estos años.

Y por último a mi familia y Marisa Pedemonti que me tuvieron que soportar todos mis cambios emocionales a medida que iba avanzando con la Tesis.

Gracias totales!

COLABORACIONES

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las colaboraciones realizadas con:

- Dr. Osvaldo Podhajcer. Laboratorio de Terapia Molecular y Celular. Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina.
- Dr. Ramón Bataller. Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, y Universidad de Carolina del Norte, Estados Unidos de Norte América.
- Dr. Fernando Corrales. Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, Pamplona, España.
- Dra. Maria Isabel Colombo. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.
- Dr. Juan Poderoso. Instituto INIGEM, UBA-CONICET, Argentina
- Dr. M. Gidekel. Universidad de la Frontera, Temuco, Chile y Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile.

Parte de los resultados de este trabajo de tesis fueron publicados en las siguientes revistas:

Atorrasagasti, C.; **Peixoto, E.**; Aquino, J.B.; Kippes, N.; Malvicini, M.; Alaniz, L.; Garcia, M.; Piccioni, F.; Fiore, E.J.; Bayo, J.; Bataller, J.; Guruceaga, E.; Corrales, F.; Podhajcer, O.; Mazzolini, G “Lack of the Matricellular Protein SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine) Attenuates Liver Fibrogenesis in Mice.” PLoS ONE (2013) 8(2): e54962. doi:10.1371/journal.pone.0054962

Peixoto E., Atorrasagasti C., Aquino J. B., Militello R., Bayo J., Fiore E., Piccioni F., Salvatierra E., Alaniz L., García M., Bataller R., Corrales F., Gidekel M., Podhajcer O., Colombo M. I., Mazzolini. “SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) knockdown protects mice from acute liver injury by reducing vascular endothelial cell damage”. Gene Ther (2015) 22(1):9-19. doi: 10.1038/gt.2014.102.

Peixoto E., Atorrasagasti C., Malvicini M., Fiore E., Rodriguez M., Garcia M. G., Finocchietto P., Poderoso J. J., Corrales F., Mazzolini G. “SPARC gene deletion protects against toxic liver injury and is associated to an enhanced proliferative capacity and reduced oxidative stress response” Oncotarget (2016) May 18. doi: 10.18632/oncotarget.9456.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

2DDIGE: electroforesis diferencial en geles de 2 dimensiones

α -SMA: alfa-actina de músculo liso

ACAA2: 3-cetoacil-CoA tiolasa

AdasSPARC: adenovirus que contiene la secuencia antisentido para SPARC

AdsSPARC: adenovirus que contiene la secuencia sentido para SPARC

Ad β gal: adenovirus que contiene la secuencia para la enzima β galactosidasa

AdCD40L: adenovirus que contiene la secuencia para CD40L

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

Agk: acilglicerol quinasa

AH: hepatitis alcohólica

ALT: alanina aminotransferasa

ANXA3: Anexina A3

Aph1b: homólogo de faringe anterior defectuosa 1b

ARN: ácido ribonucleico

ARNi: ARN de interferencia

ARNm: ARN mensajero

ABCC4: miembro de subfamilia C de casete de unión a ATP 4

ASF1B: función ASF1 anti- silenciamiento 1 homólogo B

AST: aspartato aminotransferasa

ATM: ataxia telangiectasia mutada

BARD1: dominio RING-BRCA1 asociado

BDL: ligadura del ducto colédoco

Blm: Bloom síndrome, similar a RecQ helicasa

BM-40: proteína de membrana basal 40

BRCA1-2: cáncer de mama 1-2

Brip1: C-terminal de helicasa 1 de interacción con BRCA1

BSA: albúmina de suero bovino

BVA: módulo de análisis de variación biológica

CAPZB: proteína de *capping* de actina $\beta 2$

CAT: catalasa

CCl₄: tetracloruro de carbono

CCL19: quimiocina (motivo C-C) ligando 19

CCL21: quimiocina (motivo C-C) ligando 21

CD4: clúster de diferenciación 4

CD40: clúster de diferenciación 40

CD40L: ligando del clúster de diferenciación 40

CD95/Apo1: clúster de diferenciación 95

CDH1: cadherina-1 o E-cadherina

CDK2: quinasa dependiente de ciclina 2

CDT1: factor de replicación 1 de licenciamiento de ADN y cromatina

Chaf1A-B: factor de montaje 1 de cromatina, subunidad A (p150)

CEH: células estrelladas hepáticas

CIDEC: factor de inducción de fragmentación del ADN en muerte celular similar a α efector C

Cldn1: Claudina 1

Cldn4: Claudina 4

CMA: análisis morfométrico computarizado

Con A: concanavalina A

CTSF: catepsina F

CYP2E1: citocromo P-450 2E1

DAB: 3,3-diaminobenzidina

DAF-FM: 4-Amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína

DCFH-DA: dicloro-dihidro-fluoresceína

DEN: dietil nitrosamina

DIA: módulo de análisis diferencial en gel

DMEM: del inglés: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DMN dimetil nitrosamina

EC: calcio extracelular

EGF: factor de crecimiento epidérmico

Egr-1: respuesta de crecimiento temprano 1

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

ERK: quinasa regulada por señal extracelular

ESI: ionización por electroespray

ESTs: etiqueta de secuencia expresada

Fancc: anemia de Fanconi, grupo B de complementación

FasL: Fas ligando

FBP1: metabolismo: fructosa 1,6-bisfosfatasa 1

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

GNMT: glicina N-metiltransferasa

FS-like: dominios folistatina

G1: Gap 1

GalN/LPS: D-galactosamina/ lipopolisacárido

GO: ontología de gen

GSH: glutati3n reducido

GSSG: glutati3n oxidado

GSTM1: glutati3n S-transferasa Mu1

GSTP1: Glutati3n S-transferasa P1

H&E: hematoxilina y eosina

Hat1: histona acetiltransferasa 1

HCC: hepatocarcinoma

HCV: virus de la hepatitis C

HBV: virus de la hepatitis B

HEK-293: c3lulas embrionarias de ri3n3n humano 293

HGF: factor de crecimiento insul3nico 1

HGNA: h3gado graso no alcoh3lico

Hist1H3A: cl3ster histona 1 H3A

HMEC-1: c3lulas microvasculares endoteliales humanas

HSF4: del ingl3s: Factor de transcripci3n *Heat Shock 4*

IEF: isoelectroenfoque

IFN- γ : interfer3n gamma

IGF-1: factor de crecimiento insul3nico 1

IL-6: interleuquina 6

IL-10: interleuquina 10

i.p.: intraperitoneal

IPA: An3lisis *Ingenuity Pathways*

i.v.: intravenoso

KCNQ1: canal de potasio dependiente de voltaje, miembro de la subfamilia KQT-like 1

LC: cromatograf3a l3quida

LC3: cadena ligera de la proteína asociada a los microtúbulos 3

LOXL4: lisil oxidasa homólogo 4

LSEC: célula endoteliales sinusoidales

MAT1A: S-adenosilmetionina sintasa isoforma tipo 1

Mbd4: dominio metil-CpG de unión proteína 4

MCM2: minicromosoma mitotín 2 mantenimiento deficiente

MCM4: minicromosoma homólogo 4 mantenimiento deficiente

MEC: matriz extracelular

MEK/Erk: proteínas quinasas activadas por mitógenos / quinasas reguladas por señales extracelulares

MHV-3: virus de la hepatitis murina 3

MID2: línea media 2

Mpz1: proteína de la mielina similar a cero 1

MS/MS: espectrometría de masas en tándem

Msh2: mutS homólogo 2, cáncer de colon , sin poliposis de tipo 1 (*E. coli*)

MSHE: Buffer de aislamiento de mitocondrias

NASH: esteatohepatitis no alcohólica

NTC: control qPCR sin templado

Pag1: fosfoproteína asociada con microdominios de glucoesfingolípidos 1

PBS: buffer fosfato salino

PCGF2: dedo anular del grupo *Polycomb*

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PRDX1: peroxiredoxina-1

Pole1-2: subunidad catalítica de la polimerasa épsilon (dirigida por ADN)

PRIM1: primasa de ADN, subunidad p49

PRIM2: primasa subunidad p58

qPCR: PCR en tiempo real

Rfc4: factor de replicación C (activador-1) 4

ROS: especies reactivas del oxígeno

RPA2: proteína de replicación A2

Rrm1: ribonucleótido reductasa *M1*

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real

SC1/hevin, QR1: NAD(P)H deshidrogenasa, quinona 1, Testican

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SEM: error estándar de la media

SFB: suero fetal bovino

SCID/NOD: inmunodeficiencia combinada grave / diabético no obeso

siRNA: ARN pequeño de interferencia

Sox9: región determinante del sexo *Y-box 9*

SPARC: proteína secretada, ácida y rica en cisteína

SSH1: homólogo resortera 1

SV40: virus 40 vacuolado del simio

TAA: tioacetamida

TCID50: del inglés: dosis infecciosa de cultivo de tejidos 50%

TGF- β 1: factor de crecimiento transformante beta 1

THEM4: miembro de la superfamilia tioesterasa 4

TLR-4: receptor *Toll-like 4*

TMSB10: timosina β

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TNFRSF14: receptor del factor de necrosis tumoral miembro de la superfamilia 14

Topbp1: topoisomerase (ADN) II proteína de ligado 1

TRIM25: que contiene motivo tripartito 25

TUBB2B: tubulina clase β *IIb*

UA: unidades arbitrarias

UBE2U: enzima de conjugación a ubiquitina *E2U*

USP2: peptidasa específica de ubiquitina 2

VCAM-1: proteína de adhesión vascular

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

vWF: factor de von Willebrand

ZHX2: dedos de Zinc y homeoboxes 2

Índice

Índice

Resumen	2
Introducción	22
El Hígado.....	22
Función	22
Anatomía macroscópica	23
Anatomía microscópica	24
El daño hepático agudo.....	27
Fisiopatología del daño hepático agudo	27
Modelos murinos de daño hepático agudo	29
Importancia de las células endoteliales sinusoidales hepáticas	34
Autofagia de células endoteliales	35
El daño hepático crónico.....	36
Fisiopatología de la fibrosis hepática	36
Modelos experimentales para generar fibrosis	38
Estrés Oxidativo.....	41
SPARC	43
Estructura	43
Funciones	45
Características de los ratones SPARC ^{-/-}	45
SPARC y sistema inmunitario	46
SPARC y endotelio	46
SPARC, apoptosis y autofagia	47
SPARC y proliferación celular	48
SPARC y estrés oxidativo	49
SPARC y daño agudo	49
SPARC y fibrosis.....	49
SPARC y fibrosis hepática	50

Terapia génica: Generalidades y aplicaciones.....	51
Vectores de terapia génica.....	52
Terapia génica aplicada a la fibrosis hepática.....	55
Hipótesis.....	58
Objetivos generales.....	58
Objetivos específicos.....	59
Parte I.....	59
Parte II.....	60
Materiales y métodos	62
Parte I.....	62
Animales y diseño experimental	62
Obtención de biopsias de hígados humanos	63
Generación de vectores adenovirales recombinantes.....	64
Determinación de transaminasas hepáticas y producción TNF- α e IL6 en suero	66
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción reversa (RT-qPCR)....	66
Análisis histológico e inmunotinción.....	67
Análisis por citometría de flujo	69
Estudios de trans migración.....	69
Microscopía electrónica	70
Análisis por microarreglos de cDNA.....	70
Análisis estadístico	71
Parte II.....	71
Animales y diseño experimental	71
Análisis de microarreglos	72
Ensayo de migración	73
Obtención de biopsias de hígados humanos con diferentes patologías.....	74
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción reversa (RT-qPCR)....	74
Análisis histológico e inmunotinciones	75
Cuantificación del contenido de colágeno hepático y maduración de fibras de colágeno	78
Electroforesis en geles diferenciales de dos dimensiones (2D difference gel electrophoresis, 2DDIGE).	78

Análisis por cromatografía líquida (LC)- ionización por electoespray (ESI)-espectrometría de masas en tandem (MS/MS).....	80
Actividad Catalasa	80
Aislamiento de hepatocitos y evaluación del estrés oxidativo	81
Carbonilación de proteínas	82
Cuantificación de los niveles hepáticos de óxido nítrico mitocondrial	82
Microscopia electrónica	83
Utilización de O ₂ mitocondrial y actividad de transferencia de electrones	83
Determinación de transaminasas hepáticas	83
Análisis estadístico	84
Resultados	86
Parte I	86
Inducción de la expresión de SPARC durante el daño hepático agudo	86
Disminución del daño hepático agudo en ratones deficientes de SPARC	88
La inhibición de la expresión de SPARC en células endoteliales se asocia a un menor daño inducido por Con A.....	93
El análisis del transcriptoma revela mecanismos moleculares potencialmente relacionados con el rol de SPARC en el daño hepático inducido por Con A.....	97
Parte II	103
Caracterización del perfil de expresión génica en ratones naïve SPARC ^{-/-} mediante el análisis de microarreglos de ADNc.	103
Los análisis de microarreglos muestran cambios en el patrón de expresión de genes en la fibrosis avanzada en animales SPARC ^{-/-}	104
Los ratones SPARC ^{-/-} mostraron menor infiltrado inflamatorio mononuclear tras el tratamiento con TAA y menor poder migratorio de esplenocitos en ratones naïve	109
Los ratones SPARC ^{-/-} mostraron un incremento en la expresión de PCNA luego del daño por TAA	111
Los ratones SPARC ^{-/-} muestran un incremento de la expresión de factores relacionados con mecanismos de regeneración hepática tras la administración de TAA.	113
El análisis proteómico de los hígados de ratones SPARC ^{-/-} tratados con TAA revelan un incremento en el perfil de proteínas relacionadas con la detoxificación de ROS.....	115
Los animales SPARC ^{-/-} presentan bajos niveles de actividad catalasa y de carbonilación de proteínas y el cultivo primario de hepatocitos presenta bajos niveles de producción de ROS	117

.....	120
La deficiencia de SPARC se asocia a una disminución de la disfunción mitocondrial asociada al daño inducido por Con A.....	120
Expresión de SPARC durante la fibrosis hepática en muestras de pacientes	121
Expresión de SPARC durante la fibrosis hepática en el modelo de ligadura del conducto colédoco	122
Los ratones SPARC ^{-/-} mostraron una disminución del daño fibrótico generado por BDL	124
Los ratones deficientes de SPARC mostraron menor depósito de colágeno en el modelo de BDL	127
Reducción del número de miofibroblastos activados en hígados fibróticos de ratones SPARC ^{-/-} en el modelo de BDL	128
Discusión	131
Parte I	131
Parte II	135
Conclusiones	144
Parte I	144
Parte II	145
Bibliografía	149

Introducción

Introducción

El Hígado

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo humano y cumple funciones metabólicas críticas, por lo que ha sido considerado como el “cerebro fisiológico” del organismo. Está ubicado en la parte superior del abdomen, debajo del diafragma y por encima del estómago, riñón derecho e intestino delgado. Anatómicamente se encuentra dividido por el ligamento falciforme en dos lóbulos principales y dos lóbulos más pequeños, el cuadrado y el caudado, ubicados hacia la parte dorsal. Además, el hígado se encuentra rodeado por una fina capa de tejido conectivo fibroso, llamada cápsula de Glisson. Asimismo, la vesícula biliar, de aspecto piriforme, está situada en la cara inferior del lóbulo hepático derecho (Tortora and Derrickson, 2013).

Función

Residiendo y haciendo de nexo entre el tracto digestivo y el resto del cuerpo, el hígado mantiene la homeostasis metabólica del organismo. Esto incluye el procesamiento de los aminoácidos de la dieta, los carbohidratos, los lípidos y las vitaminas, como así también el almacenamiento de ciertas vitaminas (A, D y B₁₂) e hierro, y la degradación de ciertas hormonas. Junto con el músculo esquelético es el gran almacenador de glucógeno y el principal lugar de gluconeogénesis (conversión de aminoácidos, lípidos o carbohidratos simples en glucosa). También se encarga de la síntesis de las proteínas del suero (lipoproteínas, albúmina, fibrinógeno y otras proteínas participantes en la coagulación sanguínea) y la detoxificación y excreción hacia la bilis de los productos endógenos de desechos y xenobióticos. En el hígado se captan los quilomicrones ricos en colesterol y se descargan y degradan en los hepatocitos. Los hepatocitos sintetizan y segregan lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que son convertidas luego en otros tipos de lipoproteínas séricas. Los hepatocitos son una fuente importante de colesterol y su principal lugar de excreción. Juega también un rol importante en el metabolismo proteico ya que convierte el NH₃, que resulta tóxico para el organismo y es producto de la deaminación de las proteínas, en urea (Levy et al., 2006).

El hígado transforma y excreta diversas hormonas, fármacos y toxinas, transformándolas en formas inactivas mediante reacciones que ocurren en el retículo endoplasmático de los hepatocitos. Allí se

hallan enzimas y cofactores responsables de la transformación química de muchas sustancias, como los catalizadores de la conjugación de muchos compuestos con ácido glucurónico, glicina o glutatión. Facilita así también que muchos compuestos sean más hidrosolubles y más fácilmente excretados por los riñones, mientras que otros se excretan por la bilis. Es por eso que la insuficiencia hepatocelular produce repercusiones sistémicas que pueden ser críticas (Cotran et al., 2014; Levy et al., 2006).

Anatomía macroscópica

El sistema de circulación sanguínea del hígado es de naturaleza centrípeta. El 65-85% de la irrigación del parénquima hepático proviene de la vena porta que drena la sangre desde el tracto intestinal, más pobre en oxígeno y rica en compuestos absorbidos después de la digestión. La sangre oxigenada proviene de la circulación general a través de la arteria hepática, rama del tronco celíaco. En los espacios porta, zonas del hígado situadas por fuera de los lobulillos clásicos hepáticos, se encuentran una rama de la vena porta y otra de la arteria hepática. Estos lobulillos son las unidades anatómicas y funcionales del hígado y están formados por cordones de hepatocitos separados por sinusoides hepáticos, que vierten su contenido en una vena centrolobulillar. De este modo, luego de haber estado en contacto con los hepatocitos, la sangre llega a las venas centrolobulillares, que drenan en las venas hepáticas y éstas a su vez en la vena cava inferior (Porth, 2009). Entre otras funciones, los hepatocitos producen sales biliares. Estas sales, junto con colesterol, lecitina, iones bicarbonato, pigmentos biliares y agua, forman la bilis. La bilis es conducida dentro de canalículos biliares formados y limitados por las paredes de hepatocitos adyacentes. Esos canalículos se continúan en conductillos recubiertos de células epiteliales llamadas colangiocitos, que confluyen en los conductos biliares situados en los espacios porta, que se unen formando un único conducto. A la vía biliar extrahepática se une el conducto cístico, que proviene de la vesícula biliar, y ambos forman el conducto colédoco que desemboca en el duodeno (Theise et al., 1999).

Anatomía microscópica

Como se mencionó anteriormente, el hígado fue clásicamente dividido en lóbulos hexagonales de alrededor de 1 a 2 mm de diámetro orientados alrededor de terminales de la vena hepática (vénulas terminales hepáticas o venas centrales, Figura 1). Sin embargo, debido a que los hepatocitos cercanos a la vena central son los más alejados del suministro sanguíneo, se argumentó que están en la periferia de los lóbulos metabólicos referidos como *acinos*. Conceptualizados como triangulares, los acinos contienen los terminales de la vena portal y arteria hepática extendiéndose desde el tracto portal en su base y la vénula central en su ápice (Rappaport and Wilson, 1958). El parénquima del acino hepático está dividido en tres zonas, la zona I es la más cercana al suministro sanguíneo, la zona III que es contigua a la vena central y la zona II en la zona intermedia. Esta separación por zonas es de una consecuencia metabólica considerable, dado que existe un gradiente lobular de actividad para muchas enzimas hepáticas (Jungermann and Kietzmann, 1996). Los primeros hepatocitos en recibir la glucosa y almacenarla como glucógeno están en la zona I, y luego en las zonas II y III. Además, muchas formas de injuria hepática exhiben una distribución por zona (Cotran et al., 2014; Fawcett and Jensch, 1997).

El parénquima hepático está organizado en láminas de hepatocitos que se observan en secciones al microscopio como cordones de una o dos células de espesor. Los hepatocitos lindantes con el tracto portal son denominados placa limitante, formando un borde discontinuo alrededor del mesénquima del tracto portal. Hay una orientación radial de los cordones de hepatocitos alrededor de la vena central. Los hepatocitos exhiben una mínima variación en tamaño, pero los núcleos pueden variar en tamaño, número, y ploidia, particularmente con el avance de la edad. Las células uninucleadas y diploides tienden a ser la regla, pero hay una fracción significativa que son binucleadas y el cariotipo podría tender a la octoploidia (Cotran et al., 2014; Fawcett and Jensch, 1997).

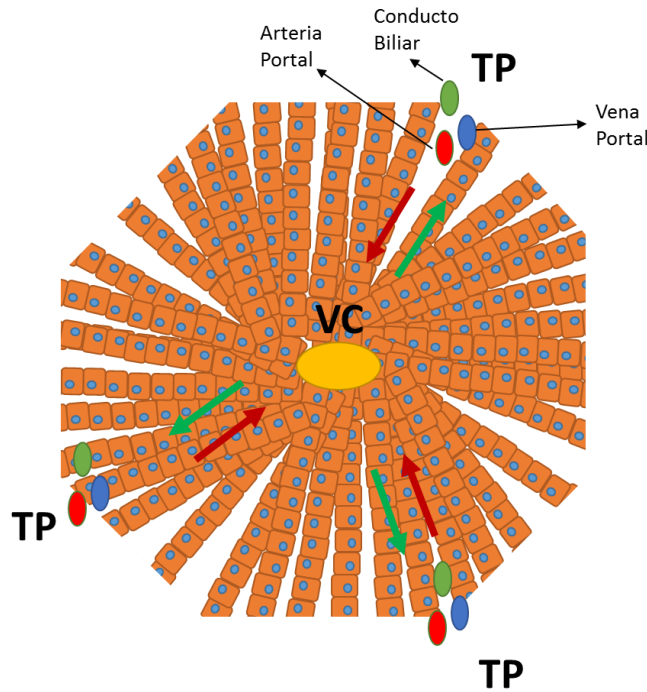


Figura 1 Histoarquitectura hepática

Modelo de la unidad estructural hepática, el lobulillo hepático. Las flechas rojas indican el flujo sanguíneo que circula por los sinusoides desde la zona portal hasta la vena central (VC). Las flechas verdes muestran la circulación de la bilis desde los hepatocitos que la producen hasta los conductos biliares. TP: tracto portal. Adaptado de Wallace et al, 2008 (Wallace et al., 2008).

Entre los cordones de hepatocitos están los sinusoides hepáticos. La sangre arterial y la venosa portal se mezclan y atraviesan los sinusoides y salen por la vena central hacia las venas suprahepáticas. Los hepatocitos están entonces bañados por sangre mezclada de la vena portal y de la arteria hepática, representando el 25 % del gasto cardíaco y dejando a los hepatocitos entre las células más profundas del organismo. Los sinusoides están alineados con células endoteliales discontinuas y fenestradas denominadas en inglés *liver sinusoidal endothelial cells* o LSEC, que demarcan un espacio extra-sinusoidal llamado espacio de *Disse*, dentro del cual protruyen abundantes microvellosidades de los hepatocitos. El íntimo contacto de una gran fracción de la superficie del hepatocito con la sangre contribuye a la capacidad del hígado para tomar eficazmente compuestos de la sangre (Levy et al., 2006). Sobre la cara luminal de las LSEC se encuentran unidas y esparcidas células del sistema monocito fagocitario denominadas de *Kupffer* o macrófagos hepáticos, y en el espacio de *Disse* se encuentran dispersas células que contienen gotas de lípidos,

de origen mesenquimal, denominadas células estrelladas hepáticas (CEH, también denominadas células de Ito). Estas células estrelladas juegan un rol en el almacenamiento y metabolismo de la vitamina A y se transforman en miofibroblastos productores de colágeno cuando hay inflamación y fibrosis, como veremos más adelante (Cotran et al., 2014).

Lindante con los hepatocitos se conforman los canaliculos biliares, que son canales de entre 1 y 2 μm de diámetro, formados por surcos en las membranas plasmáticas de los hepatocitos y delineados del espacio vascular por uniones estrechas. Hay numerosas microvellosidades que se extienden en estos espacios intercelulares. Los microfilamentos intracelulares de actina y miosina que rodean a los canaliculos ayudan a impulsar el fluido biliar secretado a través del canaliculo (Tsukada et al., 1995). Estos canales, compuestos por un epitelio biliar cúbico, empiezan en la región centrilobular y progresivamente siguen el drenaje a los canales de Hering, en el terminal parenquimal del sistema biliar. Los fluidos biliares son transportados a través del lumen a conductos biliares interlobulares en los tractos portales, compuestos por un epitelio cúbico más robusto (Cotran et al., 2014).

Los hepatocitos presentan múltiples complejos de Golgi pequeños localizados en la periferia cerca del canaliculo biliar. Las mitocondrias son muy numerosas y también existen muchos lisosomas y peroxisomas. Los peroxisomas participan en la actividad oxidativa del metabolismo de lípidos, purinas, alcohol y en la gluconeogénesis. El citoplasma también contiene numerosos gránulos densos y pequeños de glucógeno. En la cara sinusoidal de los hepatocitos, la membrana presenta receptores para sialoglicoproteínas, manosa-6-fosfato y otras sustancias tomadas de la sangre por endocitosis. Las membranas laterales contienen aminopeptidasas, fosfatasas y tres glicoproteínas que no se encuentran en otras áreas de la membrana. La adenilato ciclasa y la Na^+/K^+ ATPasa se encuentran tanto en los dominios sinusoidales como laterales. La membrana opuesta forma un pequeño canal intercelular de 0,5 a 1,5 μm de diámetro, el canaliculo biliar. Las zonas de la membrana se separan por un tipo de unión comparable a las uniones estrechas (Fawcett and Jensch, 1997).

El daño hepático agudo

El daño hepático agudo es un síndrome clínico caracterizado por un deterioro agudo y severo de la síntesis hepática (Bernuau et al., 1986; Stravitz and Kramer, 2009) y se genera por una destrucción masiva de los hepatocitos, con la consecuente claudicación abrupta de la función hepática. Es un síndrome de etiología diversa y que por distintos mecanismos (inmunológico, o directo sobre el hepatocito o por virus o toxinas) conduce a una insuficiencia del órgano y una elevada mortalidad, que depende de la etiología y de la edad del paciente (Bernuau et al., 1986). Específicamente, las causas más conocidas son las hepatitis virales agudas (hepatitis B y A), drogas hepatotóxicas (como paracetamol, tuberculostáticos), origen autoinmune, toxinas (*amanita phalloides*), enfermedades metabólicas (por depósito de cobre) e isquemia aguda (shock cardiogénico)(Bernuau et al., 1986). Sin embargo, en una proporción no despreciable de pacientes no existen causas conocidas. Al producirse el daño hepatocelular se activan mecanismos de regeneración hepática que, en general, no son suficientes para restablecer la pérdida de la función.

Fisiopatología del daño hepático agudo

Morfológicamente el hígado es un órgano simple, con un limitado repertorio de respuestas a la injuria. Como respuesta al daño agudo se gatillan diferentes procesos (Cotran et al., 2014). El daño de un insulto tóxico o inmunológico puede ocasionar que los hepatocitos adquieran una apariencia edematosa (degeneración por *ballooning*) con un citoplasma agrupado y espacios vacíos. Cualquier insulto significativo al hígado puede causar la necrosis de hepatocitos. La necrosis por lo general exhibe una distribución zonal. La más frecuente es la necrosis de los hepatocitos situados inmediatamente alrededor de la vena hepática terminal (necrosis centrilobular). Una injuria de ese tipo es característica de la injuria por isquemia y de un número de drogas y reacciones tóxicas. La necrosis de hepatocitos puede estar limitada a células dispersas en los lóbulos hepáticos (necrosis focal) o a la interface entre el parénquima periportal y los tractos portales inflamados (hepatitis de interface). La necrosis total de los lóbulos (necrosis semimasiva) o de gran parte del hígado (necrosis masiva) esta usualmente acompañada con falla hepática. Además, la injuria al hígado está asociada a la llegada de células inflamatorias agudas o crónicas (hepatitis). Aunque la necrosis de los hepatocitos puede preceder a la inflamación, el caso opuesto también es verdadero. El ataque a

células viables por células T sensibilizadas es una causa común de daño hepático. La inflamación puede estar limitada al lugar de entrada de los leucocitos (tractos portales) o diseminada a lo largo del parénquima. Cuando los hepatocitos padecen necrosis o apoptosis, los macrófagos eliminan en pocas horas a las células muertas, generando acúmulos de células inflamatorias. Los cuerpos extraños, organismos y una variedad de drogas pueden iniciar una reacción granulomatosa (Cotran et al., 2014).

El resultado final es la aparición de complicaciones a nivel hematológico (trastornos de la coagulación), sistema nervioso central (edema cerebral), sepsis y alteraciones metabólicas e hidroelectrolíticas entre otras (Bernuau et al., 1986; Stravitz and Kramer, 2009). La consecuencia clínica más severa de la enfermedad hepática es la falla hepática, que puede ser el resultado de la inminente y masiva destrucción del hígado. Más frecuentemente, es el fin de un daño progresivo ya sea por destrucción de los hepatocitos o por daño repetitivo. Cualquiera sea la causa, para que exista falla hepática, debe existir ~80% a 90% de la capacidad funcional del hígado afectada. En la mayoría de los casos, el trasplante de hígado es la única esperanza para la supervivencia del paciente. Sin embargo, este procedimiento no está al alcance de todos los que padecen este cuadro clínico, principalmente por la escasez de donantes. Desafortunadamente, aun cuando sea posible el trasplante hepático, esta enfermedad siempre presenta una elevada mortalidad. Gracias a los importantes avances en el cuidado y tratamiento médico de la falla hepática se ha logrado una mejoría significativa de su sobrevida, del 10-20% a aproximadamente 40,7%. (Cotran et al., 2014; Stravitz and Kramer, 2009).

Cuando el progreso de la insuficiencia hepática, desde el inicio de los síntomas a la encefalopatía hepática, ocurre dentro de las 2 o 3 semanas, se la denomina falla hepática fulminante. Un desarrollo más lento, que puede extenderse durante tres meses, se denomina falla subfulminante. La necrosis hepática masiva es frecuente, por ejemplo, en la hepatitis viral fulminante. Esta hepatitis es la causa del 50 al 65% de los casos de falla hepática fulminante. Puede ser inducida por los virus de la hepatitis A, B (HBV), C (HCV), D y E o la infección aguda con el virus del herpes. Las drogas y químicos que también pueden inducir necrosis masiva en 25 al 30% de los casos son el acetaminofeno, el halotano, drogas contra la tuberculosis (rifampina, isoniazida), antidepresivos inhibidores de la monoamino oxidasa, compuestos químicos industriales como el tetracloruro de carbono, y venenos de hongos (*Amanita phalloides*). El mecanismo puede ser por acción tóxica

directa sobre los hepatocitos (por ejemplo el acetaminofeno, el tetracloruro de carbono o las toxinas de hongos), pero también puede deberse a una combinación de toxicidad e inflamación con destrucción de hepatocitos, mediada por el sistema inmune (Cotran et al., 2014). Existen otras causas más raras, pero que también ponen en riesgo la vida del paciente, como la necrosis hepática isquémica, la obstrucción de las venas hepáticas, la infiltración masiva del hígado, la enfermedad de Wilson, la hipertermia, y la esteatosis microvesicular, frecuente de observar en el hígado graso agudo durante el embarazo (Cotran et al., 2014).

La falla hepática fulminante puede presentarse con ictericia, encefalopatía, y hedor hepático. Las complicaciones extrahepáticas riesgosas para la vida incluyen la coagulopatía y el sangrado, la inestabilidad cardiovascular, la falla renal, el síndrome de *distress* respiratorio del adulto, disturbios en el equilibrio ácido-base y sepsis. En promedio, la mortalidad oscila entre 25% a 90% en ausencia de trasplante hepático (Cotran et al., 2014).

Modelos murinos de daño hepático agudo

El conocimiento de la fisiopatología y del tratamiento del daño hepático agudo y su tratamiento dependen del conocimiento generado en modelos animales. No existe un modelo que reproduzca fielmente la patología humana y los modelos existentes presentan limitaciones (Newsome et al., 2000; Rahman and Hodgson, 2000). Sin embargo, dado el conocimiento actual sobre la patología, los modelos animales cumplen un papel fundamental, a pesar de sus limitaciones. Los tres principales procedimientos para generar un modelo animal de daño hepático agudo son: los procedimientos quirúrgicos, la injuria química y la infección (Tunon et al., 2009).

- **Modelos quirúrgicos**

- **Hepatectomía:** (total o parcial): la hepatectomía fue realizada por primera vez en perros por Mann en 1921 (Mann, 1921). La extracción de ~95% de hígado en ratas es un buen modelo de daño agudo (He et al., 2003), mientras que en ratones se requieren extracciones menores al 90% para que ocurra regeneración (Makino et al., 2005). Los modelos de hepatectomía parcial son equivalentes a lo que sucede en pacientes con grandes resecciones hepáticas debido a la extirpación de un

tumor. Con este modelo se demostró en ratas que la falla hepática aguda es una consecuencia del incremento de la tasa de apoptosis y de la reducción de la regeneración hepática (Morita et al., 2002). El equivalente clínico de la hepatectomía total es el daño masivo del hígado por un trauma o rechazo de un injerto (van de Kerkhove et al., 2004). La hepatectomía en los modelos animales es una técnica adecuada para estudiar la insuficiencia hepática y el tratamiento del daño agudo vía dispositivos de soporte bioartificiales.

- **Devascularización:** (total o parcial): la desvascularización completa del hígado puede lograrse mediante la desviación de la vena porta seguida de la oclusión de la arteria hepática, y en la mayoría de los casos también la oclusión del ducto biliar y vasos hepáticos accesorios (Nakazawa et al., 2002; Ytrebo et al., 2002). Dependiendo del tiempo de oclusión, el modelo es frecuentemente reversible. La desvascularización es el modelo quirúrgico más efectivo para estudiar el desarrollo y el tratamiento del daño agudo producido por isquemia y sus efectos secundarios relacionados (Fruhauf et al., 2004).

- **Modelos químicos:**

- **Concanavalina A (Con A):** una única inyección de Con A induce destrucción del parénquima hepático (Mizuhara et al., 1994). La Con A es una lectina que se purifica de la planta canavalia y se caracteriza por activar la población de células T (Lazarus et al., 1997; Tiegs et al., 1992). La Con A se pega a los residuos de manosa de diferentes glicoproteínas (por ejemplo en células LSEC) y desencadena una lesión endotelial sinusoidal hepática selectiva, acompañada de un incremento en la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1, que ocasionan una infiltración rápida y masiva de células del sistema inmunitario, especialmente linfocitos T CD4⁺, células V α 14 NKT y macrófagos, remedando una reacción de tipo autoinmune e inclusive una hepatitis viral, contra las células parenquimatosas hepáticas (Gantner et al., 1995; Jaeschke, 2002; Kaneko et al., 2000; Wands and Isselbacher, 1975). En este modelo, aumentan en el tejido hepático y en el suero las citoquinas proinflamatorias, mayormente de tipo Th1. Aunque los mecanismos inducidos por la Con A no se conocen suficientemente, de entre las citoquinas

inducidas tempranamente es de destacar TNF- α , capaz de inducir la muerte de hepatocitos (Ksontini et al., 1998; Tagawa et al., 1997). La aplicación de Con A lleva a la activación no específica de células T (CD4⁺ T, NKT y células de Kupffer) y resulta en injuria severa con necrosis masiva y hemostasia intra-sinusoidal. La lesión mediada por células NK depende de la inducción de otras citoquinas del tipo Th1, también inducida tempranamente (Kusters et al., 1996; Mizuhara et al., 1996; Tagawa et al., 1997). Otras citoquinas que estarían involucradas en la muerte hepatocitaria inducida por Con A son TGF- β 1 y el IFN- γ (Gantner et al., 1995; Kusters et al., 1996), mientras que IL-10 tiene un rol protector en este modelo (Louis et al., 1997; Marco et al., 1999). Los niveles sanguíneos de IL-2, IL-4, e IFN- γ se incrementan dramáticamente luego de la administración de Con A (Wang et al., 2012). Así, fue observado que la Con A puede inducir tanto hepatitis dependiente de células T o independiente (Chang and Lei, 2008; Yang et al., 2010). La injuria hepática severa inducida por Con A en animales de experimentación es usada como modelo de daño agudo de hepatitis autoinmune humana, ya que simula varias de las características de esta enfermedad. En la hepatitis autoinmune se observa inflamación del hígado, con pérdida de tolerancia a lo propio, niveles de transaminasas elevados, aparición de auto-anticuerpos, hipergammaglobulinemia y hepatitis (Manns et al., 2010). La intervención terapéutica con corticoides y otros fármacos inmunosupresores apunta a evitar la sobreactividad del sistema inmunitario; sin embargo, estos tratamientos se asocian con diversos efectos adversos.

- **Anti CD95, Jo2:** Fas (CD95/Apo1) es una glicoproteína de 43-kDa de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (Itoh et al., 1991). La unión al receptor de Fas induce apoptosis, promoviendo el clivaje catalítico por caspasas endógenas (Scaffidi et al., 1998). *In vivo*, Fas media la apoptosis en numerosos tejidos (Nagata, 1997; Watanabe-Fukunaga et al., 1992); el hígado es especialmente sensible, ya que la administración sistémica del anticuerpo agonista anti-Fas en ratones causa muerte masiva de hepatocitos por apoptosis. Los animales tratados con el anticuerpo anti-Fas en dosis letales mueren entre las 6 a 8 horas, con hemorragia

en el parénquima hepático, apoptosis de hepatocitos y de LSEC (Cardier et al., 1999; Faouzi et al., 2001; Ogasawara et al., 1993). El mecanismo postulado de daño es la apoptosis de los hepatocitos, ya que estas células expresan Fas y porque en experimentos *in vitro* se comprobó que el Fas ligando (FasL) induce tanto su apoptosis así como también apoptosis en LSEC, si se utiliza en altas dosis (Cardier et al., 1999).

- **Galactosamina:** La D-galactosamina es una molécula que cuando se metaboliza en la vía de la galactosa a nivel del hígado causa severas alteraciones metabólicas y necrosis hepática, mediadas por la depleción de diferentes mediadores intracelulares de uridina (Newsome et al., 2000). Este modelo comparte muchas de las características del daño agudo en humanos, como el incremento de los niveles en sangre de enzimas hepáticas, bilirrubina, amonio y lactato con presencia de coagulopatía, hipoglicemia, y aumento de la presión intracraneal (Keppler et al., 1968). La combinación de D-galactosamina y lipopolisacárido (GalN/LPS), utilizando el LPS para sensibilizar el efecto de la D-galactosamina, también fue ampliamente utilizada a nivel experimental. Administrando GalN/LPS se mostró la acción terapéutica del tratamiento con VEGF en el daño hepático agudo (Namisaki et al., 2006) y se encontró un enlace directo entre TNF- α y Fas/FasL para mediar la apoptosis de hepatocitos (Kuhla et al., 2008). También se demostró que el factor de transcripción *early growth response* (Egr-1) juega un rol importante en la aceleración de la inflamación hepática, apoptosis y muerte en el daño hepático agudo (Pritchard et al., 2007). También se encontró que hay una sobreexpresión de *leukotriene C4 synthase* y *microsomal glutathione-S-transferase* (Ma et al., 2008). En ratones deficientes de *uncoupling protein-2* (UCP2), que juega un rol en el incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), el tratamiento con GalN/LPS demostró protección, indicando la importancia del estado bioenergético en este modelo (Le Minh et al., 2009).
- **Tioacetamida (TAA):** La TAA es un potente hepatotóxico centrilobular. Tiene dos pasos de bioactivación: primero transformándose en sulfóxido de tioacetamida

mediante la enzima microsomal CYP1 y luego a óxido de S-tioacetamida (Chilakapati et al., 2007). Estas moléculas interactúan con las macromoléculas hepáticas e incrementan dramáticamente la producción de ROS, que desencadena la necrosis hepática centrilobular (Chieli and Malvaldi, 1984; Koen et al., 2013). La TAA ha sido usada para explorar la neurobiología de la encefalopatía hepática, el rol de ROS (Pallottini et al., 2006) y el efecto protector de antioxidantes como la curcumina (Shapiro et al., 2006) o sustancias proregenerativas (Margeli et al., 2003). También es administrada para generar un modelo de daño crónico, como se detalla más adelante en esta introducción.

- **Tetracloruro de Carbono (CCl₄):** usado para inducir daño crónico se intentó usarlo para el daño agudo, pero su reproducibilidad es baja y existe gran variación entre especies (Rahman and Hodgson, 2000; Shi et al., 1997). Actúa a través del retículo endoplasmático por formación de intermediarios reactivos al procesarse con isoenzimas del citocromo P-450 (Brattin et al., 1985). Este mecanismo también involucra alteraciones significativas de la homeostasis de calcio y es dosis dependiente (Clawson, 1989).
- **Acetaminofeno:** el acetaminofeno (paracetamol) es una droga de uso común que puede producir daño hepático a nivel experimental. De hecho, es la droga más frecuentemente usada en Inglaterra con intenciones suicidas. La sobredosis de acetaminofeno en Estados Unidos, Inglaterra y gran parte de Europa es la principal causa de daño hepático agudo (Lee, 2008). La toxicidad es dosis dependiente, pero sus efectos se exacerbaban con el ayuno, con drogas inductoras del citocromo P-450 y alcohol. Los estudios en cultivo primario de hepatocitos y en ratones mostraron que la *c-jun kinase* (JNK) y *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1) juegan un rol importante en el efecto tóxico de la droga (Gunawan et al., 2006; Nakagawa et al., 2008). Cuando un exceso de la droga está presente, los mecanismos de detoxificación se saturan y la droga se metaboliza a través del citocromo P-450 a N-acetil-p-benzoquinoneimina, que, si no se conjuga con glutatión, interrumpe el flujo

de calcio mitocondrial e induce daño celular con la formación de radicales hidroxilo, nitritos y nitratos, llevando a la necrosis y apoptosis (Sakai et al., 1992).

- **Azoxymetano:** la administración de azoxymetano en ratones induce parámetros similares a los encontrados en el daño hepático agudo en los humanos (Matkowskyj et al., 1999). Se ha demostrado que es un modelo animal sencillo y reproducible para el estudio de los efectos de la manipulación génica sobre las complicaciones cerebrales que acompañan al daño hepático agudo (Belanger et al., 2006).
- También se ha inducido daño hepático agudo mediante el uso de venenos como el derivado de la *Amanita phalloides*. El efecto de esta toxina se debe a la inducción de la ARN polimerasa, que provoca toxicidad celular en hepatocitos.
- Dentro de los primeros mecanismos gatillados por el daño hepático agudo se encuentra la sobre-expresión intrahepática de la molécula inmunoactivadora CD40 y su ligando (CD40L). La sobre-expresión de CD40 intra-hepática inducida por un adenovirus (AdCD40L) que expresa CD40L en ratones demostró que la interacción entre CD40-CD40L puede inducir daño hepático (Schmitz et al., 2006).
- **Modelos Virales:** si bien la hepatitis viral es la principal causa de daño hepático agudo en muchos países, no hay suficientes modelos disponibles. Sin embargo, el uso de ratones transgénicos que sobre-expresan proteínas del virus HBV o ratones BALB/cJ infectados con el virus de la hepatitis murina, MHV-3, permitieron estudiar los mecanismos de daño agudo inducidos por los virus (Ando et al., 1993; Ding et al., 1997).

Importancia de las células endoteliales sinusoidales hepáticas

Las LSEC no solo constituyen una barrera física entre el sistema circulatorio y el parénquima, sino que también participan activamente en los mecanismos fisiopatológicos del daño agudo del hígado. Una de las características particulares de las LSEC es su habilidad para eliminar sustancias pro-inflamatorias, como el LPS, que proviene desde el tracto digestivo, evitando la inflamación por la vía de la activación de TLR-4 (Uhrig et al., 2005). Esta capacidad única es mediada por la producción de mediadores anti-inflamatorios y reduciendo así la expresión de moléculas de adhesión y

presentación de antígenos (Antoniades et al., 2008; Wu et al., 2010). Además, el endotelio vascular constituye una barrera selectiva que regula activamente el paso de macromoléculas y células desde el espacio vascular al parénquima hepático. Las LSEC desempeñan un papel crítico en este proceso, ya que cambios en su morfología y uniones entre las células permite la apertura de espacios intercelulares que regulan el paso de células a través de la barrera endotelial (Schnittler et al., 1990). Parecería ser que el endotelio es el primer lugar de liberación de agentes vasoactivos que afectan de forma local y distal el flujo sanguíneo en la fase crítica del daño agudo, siendo esenciales el óxido nítrico, prostaciclina y endotelina (Tunon et al., 2009; Zwingmann et al., 2003). Su importancia se manifiesta por ejemplo, en el modelo de daño hepático agudo inducido por Con A, que presenta particularidades que se asemejan a la hepatitis autoinmune en humanos, donde se produce un masivo aumento del infiltrado de células inmunitarias al parénquima hepático asociado en un primer momento a la interacción de la Con A con las LSEC y a un posterior daño celular (Knolle et al., 1996).

Autofagia de células endoteliales

La autofagia es un proceso donde el material citoplasmático, incluidas las organelas, es englobado en vesículas que permiten la posterior fusión a los lisosomas para la degradación (Mehrpour et al., 2010; Mizushima and Komatsu, 2011). Esta vía está muy conservada desde levaduras a mamíferos. En el momento de la inducción de la autofagia, un pequeño saco vesicular llamado membrana de aislamiento o fagóforo se elonga, encerrando así una porción de citoplasma, con la formación de una estructura de doble membrana llamada autofagosoma. Luego, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma (para formar un autolisosoma), llevando a la degradación de los materiales encerrados en el interior de la membrana autofagosomal (Rautou et al., 2010). La autofagia ocurre a niveles basales en todas las células del organismo, con el fin de mantener funciones homeostáticas de recambio de proteínas y organelas. Es un proceso que se regula positivamente por la inhibición de la proteína mTOR cuando las células necesitan generar nutrientes y energía intracelular (Mehrpour et al., 2010; Mizushima et al., 2008). La ejecución de la autofagia requiere la participación de un conjunto de proteínas conservadas llamadas *Atg*, que son necesarias para la formación de la membrana de aislamiento y del autofagosoma. La elongación de la

membrana de aislamiento requiere de la activación de la proteína *microtubule-associated protein light chain 3* (LC3-I) por adquisición de un residuo lipídico de fosfatidiletanolamina para transformarse en LC3-II (He and Levine, 2010; Levine and Kroemer, 2008; Mehrpour et al., 2010).

En el daño hepático agudo, específicamente en el inducido por Con A, podrían existir mecanismos relacionados con la autofagia. Ha sido comunicado que existe daño hepático agudo dependiente de células T y daño hepático agudo independiente de células T en animales inmunodeficientes tratados con Con A (Chang and Lei, 2008). Las células LSEC son el primer blanco de la Con A en ambos casos (Yang et al., 2010). Yang *et al.* comunicaron que la Con A interacciona primero con las LSEC y gatilla el proceso de autofagia en tejido hepático. Asimismo, al estudiar el efecto de la Con A sobre células microvasculares endoteliales humanas (HMEC-1), se observó una respuesta autofágica dosis dependiente al medir la conversión de LC3-I a LC3-II (Yang et al., 2010).

El daño hepático crónico

La cirrosis es el estadio final de la fibrosis hepática y es la principal causa de trasplante hepático (Bataller and Brenner, 2005). En Argentina es un problema importante de salud pública y se encuentra, junto a otras enfermedades crónicas del hígado, entre las 10 primeras causas de muerte (fuente Ministerio de Salud, año 2010; <http://www.deis.gov.ar>). Entre los agentes etiológicos más comunes que producen esta patología se encuentran la infección crónica por los virus de las hepatitis B y C o la ingesta crónica de alcohol (Pinzani et al., 2011). Otras etiologías menos frecuentes corresponden a enfermedades autoinmunes, enfermedades metabólicas, toxicidad por drogas, enfermedades colestásicas, hígado graso no alcohólico (HGNA) y esteatohepatitis no alcohólica (Friedman, 2003).

Fisiopatología de la fibrosis hepática

La fibrosis hepática es un proceso dinámico que resulta de un desbalance entre la producción y degradación de matriz extracelular (MEC) en respuesta a una agresión crónica sobre el hígado (Elpek, 2014; Lee et al., 2015). Ante un daño necrótico ocurre proliferación hepatocelular que se caracteriza por un aumento de la mitosis, el engrosamiento de los cordones de hepatocitos, y la

desorganización de la estructura del parénquima. Cuando ocurre la necrosis hepatocelular y deja al tejido conectivo intacto, se logra la casi perfecta restitución de la estructura hepática afectada, incluso luego de una necrosis masiva o submasiva. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se forma tejido fibroso en respuesta a la inflamación o al insulto directo de tóxicos en el hígado. A diferencia de otras respuestas, que son reversibles, la fibrosis es generalmente una consecuencia irreversible del daño hepático. El depósito de colágeno tiene consecuencias que perduran, como por ejemplo, en el patrón de flujo de sangre hepática y perfusión de los hepatocitos. En los estadios iniciales, la fibrosis se puede desarrollar alrededor de los tractos portales o de la vena hepática terminal, o puede depositarse directamente en el espacio de *Disse*. Con el aumento de la fibrosis, el hígado se subdivide en nódulos de regeneración de hepatocitos rodeados de tejido de cicatrización, estadio al que denominamos cirrosis.

En el hígado normal, el colágeno intersticial (tipos I y III) está concentrado en tractos portales y alrededor de las venas centrales, con eventuales manojos en el espacio de *Disse*. El colágeno (reticulina) próximo a los hepatocitos está compuesto por hebras delicadas de colágeno tipo IV en el espacio de *Disse*. En la cirrosis, se deposita colágeno tipo I y III en el lóbulo, creando amplios tractos septales. Se forman nuevos canales de vasculatura en los septos que conectan las estructuras vasculares en las regiones portales (arterias hepáticas y venas portales) y las venas hepáticas terminales, cambiando así el flujo de sangre alrededor del parénquima y distorsionando así la arquitectura de todo el hígado. El depósito continuo de colágeno en el espacio de *Disse* dentro del parénquima es acompañado por la pérdida de las fenestraciones en las LSEC. En el proceso, el espacio sinusoidal comienza a parecerse más a un capilar que a un canal de intercambio de solutos entre hepatocitos y plasma. En particular, la secreción de proteínas (e.g. albumina, factores de coagulación, y lipoproteínas) es gravemente perjudicada. También se forman nódulos parenquimatosos creados por la regeneración de hepatocitos cercados, variando desde pequeños (<3 mm de diámetro, micronódulos) a grandes (varios centímetros de diámetro, macronódulos) (Cotran et al., 2014).

Las CEH, que se encuentran en el espacio de *Disse*, son las mayores productoras de colágeno en la cirrosis. Mientras que en condiciones normales funcionan como células de almacenaje de vitamina A y lípidos, se activan ante el daño, pierden sus reservas de retinil ester y se transforman en células

del tipo de miofibroblastos. La inducción del depósito de colágeno puede provenir de diferentes fuentes:

- Inflamación crónica, con la producción de citoquinas como TNF- α , TGF- β e interleuquina-1
- Producción de citoquinas por estimulación de células endógenas (Células de Kupffer, células endoteliales, hepatocitos, y células epiteliales del conducto biliar)
- Disrupción de la MEC
- Estimulación directa de las CEH por toxinas

Durante la fibrosis hepática se induce la expresión de TGF- β 1. Esta citoquina juega un rol central en la activación de las células CEHs y en el desarrollo de la fibrosis hepática (Gressner and Weiskirchen, 2006). Es por eso que diferentes estrategias moleculares fueron exploradas para bloquear y reducir los mecanismos mediados por TGF- β 1, incluyendo la transferencia del receptor truncado de TGF- β 1 tipo II (George et al., 1999; Qi et al., 1999).

Clínicamente, los síntomas de la cirrosis aparecen con manifestaciones no específicas como anorexia, pérdida de peso, debilidad, osteoporosis, y en el estado avanzado, debilitamiento. También se puede desarrollar falla hepática. Otro cambio es el desbalance en el flujo de sangre pulmonar, que puede ocasionar oxigenación deficiente, perjudicando más al paciente (Lange and Stoller, 1996). Los mecanismos más frecuentes que llevan a la muerte por cirrosis son (1) la falla hepática progresiva, (2) complicaciones por la hipertensión portal, o (3) el desarrollo de un hepatocarcinoma (HCC)(Cotran et al., 2014).

Modelos experimentales para generar fibrosis

Los modelos disponibles para estudiar la fibrosis intentan imitar los procesos fisiopatológicos de la enfermedad en humanos y por eso es tan importante la elección del modelo para responder a preguntas específicas. Sin embargo, no hay un modelo animal que exhiba todos los atributos de la enfermedad (Liu et al., 2013). La repetición de un insulto tóxico en el hígado es una vía clásica de inducir fibrosis en animales.

Modelos clásicos en animales para inducir fibrosis hepática experimental:

Modelo de tioacetamida (TAA): la TAA no es *per se* tóxica al hígado, pero sus metabolitos intermediarios, en especial el óxido de S-tioacetamida, una ROS, sí lo son (Andres et al., 2003; Chilakapati et al., 2007; Stankova et al., 2010). El óxido de S-tioacetamida se une covalentemente a las macromoléculas hepáticas, ocasionando daño celular y necrosis de los hepatocitos. La TAA daña la zona I y la zona III de hepatocitos. La administración prolongada de TAA induce la formación de septos porto-portales, porto centrales y, finalmente, cirrosis (Liu et al., 2013; Muller et al., 1988; Park et al., 2010; Starkel and Leclercq, 2011; Zimmermann et al., 1987). Comparado con el CCl₄, las lesiones fibróticas son más prominentes con la administración de TAA en ratas (Zimmermann et al., 1987) y estas lesiones pueden persistir por varias semanas luego de discontinuar el tratamiento, contrariamente al daño reversible que genera CCl₄ una vez que se deja de administrar. Con la administración prolongada de TAA se pueden generar colangiocarcinomas y HCC (Newell et al., 2008). Se necesita de un tiempo más prolongado para inducir una fibrosis significativa con el tratamiento de TAA, en comparación con otras hepatotoxinas (Palacios et al., 2008).

Modelo de tetracloruro de carbono: el tetracloruro de carbono (CCl₄) es muy usado para inducir injuria en animales de laboratorio. CCl₄ daña de forma directa a los hepatocitos, alterando así la permeabilidad de las membranas plasmáticas, lisosomales y mitocondriales. Su metabolito tóxico, un triclorometilo radical (CCl₃[•]) producido por el citocromo P-450 2E1 (CYP2E1) en los hepatocitos, induce la peroxidación lipídica y el daño de membrana, causando una severa necrosis centrilobular (Starkel and Leclercq, 2011; Wu and Norton, 1996). Una sola dosis de CCl₄ lleva a una necrosis reversible que gatilla procesos de cicatrización. Con la administración repetida, el hígado desarrolla progresivamente fibrosis, comenzando el proceso por las zonas pericentrales, siguiendo con la formación de puentes fibróticos y culminando en cirrosis y el desarrollo de HCC (Constandinou et al., 2005; Domenicali et al., 2009; Frezza et al., 1994). Este es un modelo que después de 4 semanas de intoxicación, genera una fibrosis establecida que puede resolverse espontáneamente al suspender la administración de la toxina por remodelación de las proteínas de la MEC, como se mencionó más arriba (Iredale et al., 1998)

Modelo de dimetil o dietil nitrosamina (DMN y DEN): DMN y DEN se hidroxilan a CYP2E1 en los hepatocitos generándose así los iones diazonio, sus intermediarios biorreactivos. Los metabolitos reaccionan subsecuentemente con los ácidos nucleicos formando productos de alquilación

(Kroeger-Koepke et al., 1981). Estas mutaciones de DNA pueden llevar a la necrosis de hepatocitos y al HCC (Poirier, 1975). El daño al hígado y la necrosis ocurren en las áreas centrilobulares y periportales, con la subsiguiente formación de septa fibróticos centroportales. La fibrosis hepática se desarrolla en estos modelos de forma progresiva, y una vez formado el daño permanece estable, inclusive varias semanas o meses después de dejar de administrar las toxinas (Jenkins et al., 1985; Schiffer et al., 2005; Tsukamoto et al., 1990). Además, se puede desarrollar HCC luego de un tiempo prolongado de exposición a dosis bajas de DEN (Newell et al., 2008; Poirier, 1975; Schiffer et al., 2005). Este modelo es de especial interés para estudiar el desarrollo del HCC a partir de la fibrosis.

Modelo de ligadura del conducto colédoco: la ligadura del conducto colédoco (BDL) es un modelo clásico experimental para estudiar la fibrosis biliar secundaria (Kountouras et al., 1984). Esta técnica requiere una laparotomía y el aislamiento del conducto colédoco, seguido de la ligadura del conducto (Starkel and Leclercq, 2011). La BDL estimula la proliferación de las células epiteliales biliares y de las células ovas, resultando en la proliferación de los ductos biliares, colestasis, inflamación portal, fibrosis y finalmente cirrosis biliar secundaria (Geerts et al., 2008; Kountouras et al., 1984; Popov et al., 2010). El modelo de BDL presenta una alta mortalidad debido a la ruptura de la vesícula biliar en ratones. Luego de eliminar la obstrucción del colédoco se comprobó reversibilidad del daño en modelos en ratas (Issa et al., 2001)-

Ratones modificados genéticamente: En los últimos años se están empleando modelos en ratones con modificaciones genéticas o una combinación de modificación genética y de estímulo profibrótico (CCl₄, BDL, xenobióticos, dieta o factores ambientales), que permitieron evidenciar la función de varios genes candidatos de la progresión de la fibrosis hepática (Hayashi and Sakai, 2011). Por ejemplo, los ratones deficientes de Fas, muestran menor nivel de fibrosis después de la ligadura del conducto colédoco (Canbay et al., 2002). En cambio, los ratones con hepatocitos deficientes de Bcl-xL (proteína antiapoptótica) mostraron apoptosis espontánea y continua y desarrollaron fibrosis (Takehara et al., 2004). Los ratones deficientes de catepsina-B mostraron una disminución de la apoptosis y fibrosis luego de la ligadura del conducto colédoco (Canbay et al., 2003). Los ratones deficientes de la proteína *CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP)*, un factor clave en el estrés del retículo endoplásmico, mostraron resistencia a la apoptosis en varios modelos de daño hepático (Tamaki et al., 2008). La sobreexpresión de TGF-β1 induce la activación espontánea de CEH, mientras que la represión de TGF-β en estadios avanzados de fibrosis hepática

reverten el cuadro (Ueberham et al., 2003). El ratón *null* para Smad3, que es un factor activado por TGF- β 1, muestra niveles inferiores de fibrosis en respuesta a la injuria. La disrupción de TNF- α , que puede activar a las células CEH, atenúa la fibrogénesis después del ligamento del conducto colédoco (Gabele et al., 2009).

Estrés Oxidativo

En los modelos de daño hepático crónico como el de CCl₄ y TAA, el daño se produce por la generación de metabolitos intermedios que son ROS (Liu et al., 2013). Los radicales libres son especies químicas que tienen un solo electrón desapareado en su órbita externa. La energía creada por esta configuración inestable es liberada a través de reacciones con las moléculas más cercanas, que pueden ser proteínas, lípidos, carbohidratos, y ácidos nucleicos. Los radicales libres inician reacciones en cadena que propagan fácilmente el daño. Entre las causas que pueden explicar la generación de estas especies reactivas está el metabolismo enzimático de químicos exógenos o drogas como, por ejemplo, la administración de CCl₄ (Adler et al., 1999; Boonstra and Post, 2004; Droge, 2002; Murphy, 2009). También se producen especies reactivas y estrés oxidativo durante las reacciones de oxidación-reducción que ocurren durante el metabolismo. Por ejemplo, durante la respiración celular, el oxígeno molecular es secuencialmente reducido por la adición de cuatro electrones para generar agua. En este proceso se producen pequeñas cantidades de intermediarios tóxicos, como el anión radical superóxido, el peróxido de hidrogeno o el ion hidroxilo (Cotran et al., 2014; Murphy, 2009).

Las células desarrollaron múltiples mecanismos para remover las especies reactivas y minimizar la injuria. Entre los sistemas no enzimáticos y enzimáticos que participan en esa inactivación se encuentran:

- Antioxidantes, que bloquean o inactivan la iniciación de la formación de radicales, por ejemplo, las vitaminas liposolubles E y A, el ácido ascórbico y el glutatión en el citosol.
- El hierro y el cobre pueden catalizar la formación de especies reactivas. Los niveles de estos metales se disminuyen con proteínas de almacenamiento y transporte como transferrina, ferritina, lactoferrina y ceruloplasmina.

- Hay una serie de enzimas que actúan como sistemas de limpieza de especies reactivas. Entre ellas encontramos:
 - Catalasa, presente en los peroxisomas, que descompone H_2O_2 ($2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$)
 - Superóxido dismutasa, que se encuentra en varios tipos celulares y convierte superóxido a H_2O_2 ($2O_2^{\cdot-} + 2H \rightarrow H_2O_2 + O_2$).
 - Glutatión peroxidasa que también protege contra la injuria catalizando la rotura de radicales libres ($H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$ o $2OH^{\cdot} + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$). La proporción intracelular de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH) es un reflejo del estado oxidativo de la célula y es un aspecto importante de cómo la célula es capaz de detoxificar ROS (Cotran et al., 2014).
 - Glutatión-S-transferasa, que cataliza la conjugación de la forma reducida de glutatión a xenobióticos, con el propósito de detoxificar compuestos.
 - Entre otras enzimas importantes están la metionina adenosil transferasa en la vía de generación de homocisteína, y que es necesaria para la producción de glutatión (Mesa et al., 1996; Murray et al., 2015). En la misma vía bioquímica, la glicina N-metiltransferasa cataliza la metilación de glicina usando S-adenosilmetionina para formar sarcosina y S-adenosilhomocisteína (Lu et al., 2001).

En el caso del modelo de daño crónico inducido por TAA hay producción de ROS, en particular por su metabolización a óxido de S-tioacetamida, una especie reactiva (Andres et al., 2003; Chilakapati et al., 2007; Stankova et al., 2010). Entre los efectos adversos producidos por la producción de ROS asociada al óxido de S-tioacetamida están la peroxidación lipídica, la movilización de calcio, la depleción de glutatión, la caída de la expresión de la enzima glutatión-S-transferasa y la reducción de grupos SH-tioles (Lotkova et al., 2007; Sanz et al., 2002; Spira and Raw, 2000; Stankova et al., 2010). El calcio y ROS activan mecanismos relacionados con la reparación del daño celular y la proliferación (Brookes et al., 2004; Lotkova et al., 2007; Sanz et al., 2002; Spira and Raw, 2000; Stankova et al., 2010; Zaragoza et al., 2000), pero también pueden afectar la función mitocondrial (Bernardi et al., 2001).

SPARC

Secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), también llamada osteonectina o BM-40, es una glicoproteína multifuncional, altamente conservada entre especies, secretada a la MEC y relacionada con múltiples procesos biológicos (Bradshaw and Sage, 2001; Brekken and Sage, 2001; Trombetta-eSilva and Bradshaw, 2012).

En 1981, Termine *et al.* demostraron que SPARC se expresaba en tejido óseo como un componente de tipo no colágeno (Termine et al., 1981). Más tarde, Sage *et al.* describieron a SPARC como una proteína secretada *in vitro* por células endoteliales (Sage et al., 1984; Sage et al., 1981); Otsuka *et al.* describieron que SPARC también es producida por fibroblastos en cultivo (Otsuka et al., 1984). También se describió su expresión en la membrana basal del tumor Engelbreth-Holm-Swarm de ratón (Mann et al., 1987). Es importante mencionar que SPARC se expresa durante el desarrollo embrionario, y que en ratones puede ser detectada desde el día 9 en el primordio del corazón. Más tarde aparece en cartílago, hueso, epitelio del tracto digestivo, vasos sanguíneos y piel. En el humano, se han observado niveles elevados de expresión en osteoblastos, odontoblastos y fibroblastos adyacentes a condrocitos (Mundlos et al., 1992). En adultos, la expresión se limita a tejidos que sufren cambios en su entorno y que requieren modificaciones en las interacciones célula-matriz y célula-célula, como por ejemplo tejidos en regeneración y remodelación (Bornstein, 2000).

Estructura

SPARC es codificada por un gen de copia única localizado en el cromosoma 11 murino y en el brazo largo del cromosoma 5 en humanos (Mason et al., 1986; Schwarzbauer and Spencer, 1993). En vertebrados, la proteína codificada posee entre 283 a 304 aminoácidos. Aunque su peso molecular estimado es de 32 kDa, su forma secretada migra como una proteína de ~40-44kDa en SDS-PAGE debido a modificaciones post-traduccionales. Diferencias en su glicosilación pueden explicar la heterogeneidad funcional y estructural observada (Kelm and Mann, 1991). Estudios de su estructura secundaria determinaron que posee tres dominios estructurales bien diferenciados (Figura 2):

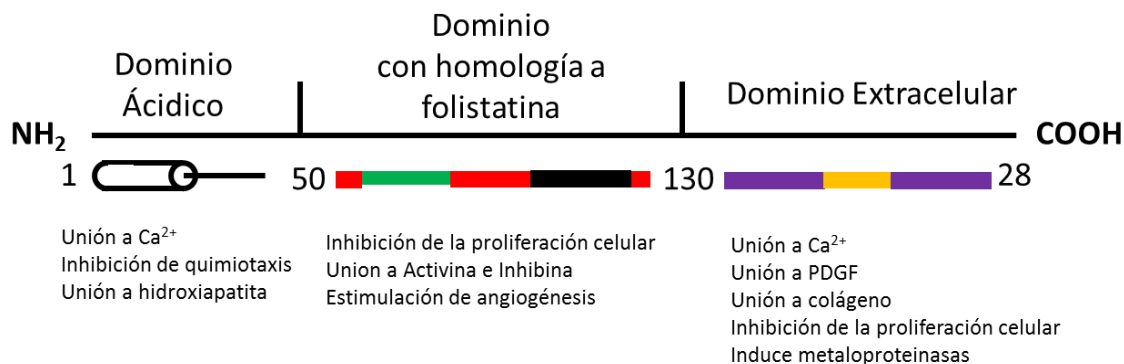


Figura 2 Estructura y función de SPARC

Propiedades funcionales de cada uno de los dominios de SPARC. El dominio folistatina posee dos péptidos relevantes, el péptido 2.1 (en verde) y el péptido angiogénico (K)GHK (en negro). El dominio carboxiterminal el péptido 4.2 (en amarillo). Adaptado de Brekken *et al* (Brekken and Sage, 2001).

Dominio ácido (aa 3-51): este dominio se encuentra en el extremo amino terminal y es rico en aminoácidos Asp y Glu. Presenta epítopes inmunodominantes (Stenner et al., 1984) y se une a hidroxiapatita, por lo que SPARC ha sido implicada en la mineralización de hueso y cartílago (Romberg et al., 1985).

Dominio con homología a folistatina (aa 52-132): este dominio presenta homología con los dominios folistatina (FS-like). Los estudios de cristalografía de rayos X demostraron que esta región consiste en estructuras alargadas formadas por una horquilla β N-terminal y un pequeño núcleo de estructura mixta α/β . Tanto los estudios de secuenciación como la estructura cristalina muestran que el núcleo del dominio se asemeja a un inhibidor de resina-proteasa y que el dominio tipo horquilla β se parece al del EGF. A su vez, este dominio presenta un péptido 2.1 y un péptido (K)GHK con conocidos efectos proliferativos y anti-angiogénicos (Funk and Sage, 1993; Lane and Sage, 1994). Los dominios folistatina se caracterizan por inhibir citoquinas semejantes a TGF- β 1, como activina o inhibina.

Dominio de unión a Ca²⁺ extracelular (aa 133-285): en el extremo carboxiterminal se observa un dominio de unión a calcio extracelular (EC). Estudios de cristalografía de rayos X muestran una estructura globular con dos motivos manos EF con elevada afinidad a Ca²⁺ (Hohenester et al., 1996). Este dominio posee el péptido 4.2 que inhibe la proliferación de células endoteliales (Kupprion et al., 1998; Motamed and Sage, 1998). Este dominio también está involucrado en la interacción célula-

célula y es capaz de unir colágeno. De hecho, los colágenos fibrilares tipo I, III y V, y el colágeno de lámina basal tipo IV, se unen a este dominio en forma dependiente de Ca^{2+} . Tanto el dominio FS-like como EC se encuentran conservados en otras proteínas de la familia de SPARC, como SC1/hevin, QR1 (*NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1, Testican*), mientras que el extremo ácido es el más divergente (Brekken and Sage, 2001).

Funciones

Si bien SPARC es secretada a la MEC, no sería estructuralmente funcional para formar matriz, pero podría facilitar la interacción entre las células y la MEC (Bornstein, 2000). De hecho interacciona con diferentes proteínas de la MEC como la trombospondina 1, vitronectina, entactina, nidogen, colágeno fibrilar (tipos I, II, III, y V) y colágeno tipo IV. Entre otras funciones, SPARC participa en la respuesta de cicatrización de heridas ante la injuria y el remodelado tisular y estimula el depósito de colágeno (Blazejewski et al., 1997; Bradshaw and Sage, 2001; Frizell et al., 1995; Lamireau et al., 1999). SPARC se expresa durante el desarrollo o en los tejidos con alto recambio de MEC, por ejemplo después de un daño. Es catalogada como una proteína anti-adhesiva (Sage et al., 1989) sobre células endoteliales, fibroblastos y células del músculo liso al ser añadida durante el cultivo celular. Esta cualidad anti-adhesiva es sensible a los inhibidores de tirosina quinasa (Motamed and Sage, 1998).

Se ha observado que existe una relación entre los niveles de TGF- β y SPARC. TGF- β estimula, mediante un *feedback* positivo, la expresión de SPARC y la síntesis de colágeno de tipo I (Francki et al., 1999; Wrana et al., 1991). De forma recíproca, SPARC también induce la síntesis de TGF- β y la síntesis de colágeno (Francki et al., 1999; Zhou et al., 2005).

Características de los ratones SPARC^{-/-}

Para entender su función es importante notar que la ausencia de SPARC en ratones SPARC^{-/-} resulta en la generación de cataratas (Gilmour et al., 1998), osteopenia severa (Delany et al., 2003), el cierre acelerado de las heridas de la dermis (Bradshaw et al., 2002) y mayores depósitos de grasa subcutánea y en el epidídimo, comparado con ratones SPARC^{+/+} (Bradshaw and Sage, 2001). La reparación tisular en ratones SPARC^{-/-} se encuentra comprometida, en parte, debido a la inhibición

de la migración de fibroblastos a las zonas lesionadas (Basu et al., 2001). Los mismos autores realizaron estudios *in vitro* de reparación de heridas donde demuestran que fibroblastos dérmicos obtenidos de ratones SPARC^{-/-} y tratados con mitomicina C (para impedir su proliferación) son incapaces de migrar. Estos resultados resaltan el papel de SPARC en la migración hacia sitios en proceso de cicatrización. Los ratones SPARC^{-/-} también presentan diferencias significativas en la morfología de las fibras de colágeno y cambios en la estructura y composición de la MEC (Bradshaw and Sage, 2001). Estos investigadores demostraron que las fibrillas de colágeno de la dermis de los ratones SPARC^{-/-} eran más pequeñas en comparación con la dermis normal y observaron disminución en el colágeno intersticial y en depósitos grasos (Bradshaw et al., 2009; Bradshaw et al., 2003), por lo que se postula que la expresión de SPARC sería necesaria para la correcta maduración del colágeno en la MEC. Por otro lado, se observó disminución de mensajeros para TGF- β 1 y de proteína en las células mesangiales de ratones SPARC^{-/-} en cultivo y en células epiteliales de pulmón (Francki et al., 2004).

SPARC y sistema inmunitario

Rempel *et al.* compararon el sistema inmunitario de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} y observaron que los bazo de ratones SPARC^{-/-} presentaban mayor pulpa blanca, células B hiperproliferativas en los centros germinales, y zonas marginales disminuidas. Por citometría de flujos se observaron en la médula ósea disminución de la densidad de células B y un incremento de células T. En este trabajo se demuestra que los ratones SPARC^{-/-} mostraron incapacidad de originar una respuesta inmunitaria adecuada ante la inoculación de LPS, confirmando que los ratones SPARC^{-/-} presentan un sistema inmunitario comprometido (Rempel et al., 2007b).

SPARC y endotelio

SPARC se expresa en las células endoteliales donde induce cambios morfológicos y de contractilidad. A su vez colabora aumentando la permeabilidad del endotelio redondeando a las células y aumentando los *gaps* intercelulares como se observó al tratar con SPARC células endoteliales arteriales pulmonares bovinas confluentes *in vitro* (Goldblum et al., 1994). No se conoce con certeza

cuál es el receptor de SPARC ni se sabe cuál vía de señalización es capaz de activar. Sin embargo, Kelly *et al.* demostraron utilizando ensayos de co-inmunoprecipitación que SPARC se puede unir a VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) en el endotelio y contribuye a la diapédesis de leucocitos induciendo rearrreglos del citoesqueleto de actina y de los gaps intercelulares en la barrera de células endoteliales (Kelly *et al.*, 2007); y, como se comentó anteriormente, también puede ejercer funciones anti-adhesivas afectando a los complejos de adhesiones focales y reorganizando las fibras de estrés de actina (Murphy-Ullrich *et al.*, 1995). También se observó que SPARC producida por las células de neuroblastoma suprimió la expresión de factores de crecimiento inhibiendo la vía de señalización de Notch e indujo tanto la apoptosis de células endoteliales como la inhibición de la angiogénesis (Gorantla *et al.*, 2013). Por otro lado, SPARC puede influir sobre otras proteínas de la MEC incrementando la fosforilación de tirosina de proteínas como la β -catenina y paxillina, proceso que induce la reorganización del citoesqueleto de actina en células endoteliales, aumentando así su permeabilidad (Young *et al.*, 1998).

SPARC, apoptosis y autofagia

SPARC fue asociado con procesos pro-apoptóticos (Bhoopathi *et al.*, 2010; Sailaja *et al.*, 2013; Tai *et al.*, 2005; Tang and Tai, 2007a; Yiu *et al.*, 2001). Así, SPARC fue descrito como un quimio-sensibilizador con capacidad de revertir la resistencia a la terapia con radiación, 5-fluorocilo e irinotecan en el cáncer de colon aumentando la apoptosis *in vitro* e inhibiendo el crecimiento tumoral *in vivo* (Tai *et al.*, 2005). El mecanismo observado fue un aumento de la actividad de caspasa 8, ya que el efecto fue abolido con el uso de ARN de interferencia contra caspasa 8. Es interesante mencionar que hay interacción entre SPARC con el dominio que contiene al *death effector domain* (DED) en el extremo N terminal de la procaspasa-8, como se observó en experimentos de coimmunoprecipitación en lisado de células de cáncer colorectal avanzado (Tang and Tai, 2007a). También se comunicó que la expresión de SPARC en células de cáncer de ovario está inversamente correlacionada con el grado de malignidad; al tratar células epiteliales de la superficie del ovario y células de cáncer de ovario humanas con SPARC, se observó que SPARC inhibe la proliferación de ambos tipos celulares e induce además induce la apoptosis de las células tumorales (Yiu *et al.*, 2001). Otra evidencia del rol de SPARC en la apoptosis fue reportada por Bhoopathi *et al.* que mostraron

que la expresión de ADNc de SPARC en células de tumor neuroectodermal primitivo (PNET) induce autofagia seguida de muerte celular apoptótica. La autofagia inducida por SPARC fue caracterizada morfológicamente por la formación de vacuolas autofágicas, incremento en los niveles de LC3 e inducción de la enzima lisosomal catepsina B. En dicho trabajo se mostró también que la catepsina B estaba asociada con la inducción de la liberación del citocromo C mitocondrial y activación de la caspasa-3 (Bhoopathi et al., 2010). La expresión de SPARC combinada con irradiación en células SK-N-AS y NB-1691 (líneas celulares derivadas de neuroblastoma) también mostró activación de caspasa 4, clivaje de PARTP e inducción de apoptosis (Sailaja et al., 2013). En el mismo trabajo, la sobre-expresión de SPARC gatilló estrés del retículo endoplásmico y respuesta por proteínas no plegadas, fenómeno propuesto como un posible mecanismo de activación de la autofagia (Ding et al., 2007; Hoyer-Hansen and Jaattela, 2007; Sailaja et al., 2013).

SPARC y proliferación celular

Aunque SPARC es principalmente una proteína secretada, también se ha observado expresión intracelular con una localización perinuclear, rodeando al aparato de Golgi, y en el núcleo de células en división (Gooden et al., 1999). Aunque la función de SPARC en el núcleo es desconocida, la evidencia sugiere que podría estar involucrada en la regulación de la mitosis (Gooden et al., 1999). Los primeros hallazgos relacionados con la funcionalidad de SPARC demostraron que esta proteína podía ser un inhibidor del ciclo celular con capacidad para frenar a los fibroblastos en fase G₁ (Funk and Sage, 1991; Sage et al., 1995). También se demostró que SPARC inhibe la proliferación de células endoteliales, de músculo liso, mesangiales y fibroblastos estimulados con factores de crecimiento (Bradshaw et al., 1999; Hasselaar and Sage, 1992; Motamed et al., 2002; Raines et al., 1992; Schiemann et al., 2003). SPARC puede atenuar la capacidad mitogénica tanto de PDGF como de VEGF, al menos en parte, por la alteración de la interacción entre estos factores y sus receptores (Kupprion et al., 1998; Raines et al., 1992; Yan and Sage, 1999). Además, puede inhibir la capacidad de inducir proliferación sobre células de músculo liso estimuladas por FGF (Brekken and Sage, 2000; Yan and Sage, 1999).

SPARC y estrés oxidativo

Aunque muy poco estudiado, SPARC también podría cumplir un rol en la generación de ROS. Se comunicó una caída en la producción de ROS en riñones de ratones SPARC^{-/-} con respecto a ratones SPARC^{+/+} (Socha et al., 2007). También se observó que SPARC podría ser requerido para la producción de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en fibroblastos tratados con TGF-β (Shibata and Ishiyama, 2013).

SPARC y daño agudo

SPARC es expresado en respuesta a injuria tisular y a la inflamación. Se lo encontró relacionado con varios modelos de estrés agudos como la remodelación ventricular, un proceso complicado que ocurre en el corazón estresado (Schellings et al., 2004), gastritis, ulcera gástrica e infarto agudo de miocardio. El rol de SPARC en el daño agudo del hígado es un nuevo tópico de estudio. Bykov *et al.* comunicaron que SPARC es una de las proteínas de fase aguda reguladas positivamente luego del consumo crónico de alcohol. Los autores de este trabajo postularon que SPARC emerge como un nuevo candidato de marcador para la detección temprana del daño hepático (Bykov et al., 2007).

SPARC y fibrosis

La fibrosis hepática es el resultado final de una serie de factores que ocasionan daño crónico en el hígado, frecuentemente relacionado a ciclos repetitivos de inflamación y reparación (Kisseleva and Brenner, 2008). Los agentes etiológicos más frecuentemente observados son los virus HBV y HCV, el consumo crónico y exagerado de alcohol, enfermedades autoinmunes y anormalidades genéticas o metabólicas, entre otras (Bataller and Brenner, 2005). En el proceso de la fibrosis, hay secreción y depósito desregulado de MEC que resulta en la remodelación del tejido hepático que finalmente conduce a la desorganización de la arquitectura del parénquima y a insuficiencia hepatocelular (Friedman, 2003; Wallace et al., 2008). La expresión de SPARC y su inducción en diferentes escenarios de fibrosis, tanto en humanos como en modelos experimentales en animales ha sido ampliamente comunicada en la literatura. Por ejemplo, SPARC está involucrada en la patogénesis

de la fibrosis renal (Pichler et al., 1996). Además, la sobre-expresión de SPARC ha sido observada en la injuria y fibrosis pulmonar (Kuhn and Mason, 1995). En la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina se observó menor desarrollo de daño en ratones SPARC^{-/-}, en comparación con ratones SPARC^{+/+} (Strandjord et al., 1999). También ha sido descripta la expresión de SPARC en fibroblastos de pacientes con esclerodermia (Zhou et al., 2005). La inhibición de SPARC con ARNi disminuyó la expresión de colágeno y atenuó el estímulo pro-fibrogénico de TGF-β1 exógeno en fibroblastos humanos cultivados *in vitro* (Zhou et al., 2005). Para una revisión más extensa del rol de SPARC en la fibrosis pulmonar, renal, dermal, intestinal y cardiaca pueden consultarse otras citas bibliográficas (McCurdy et al., 2010; Trombetta-eSilva and Bradshaw, 2012).

SPARC y fibrosis hepática

SPARC se expresa constitutivamente en bajas cantidades en el hígado normal y bajo condiciones fisiológicas en CEH aisladas de rata (Frizell et al., 1995). Sin embargo, en la cirrosis (Blazejewski et al., 1997; Frizell et al., 1995; Lamireau et al., 1999), en el HCC (Goldenberg et al., 2002; Lau et al., 2006; Le Bail et al., 1999) y en la atresia biliar (Lamireau et al., 1999) se encontró SPARC altamente sobre-expresado. Durante la fibrogénesis, SPARC es sobre-expresado específicamente en células CEH y en miofibroblastos, tanto en humanos (Blazejewski et al., 1997) como en células de ratas (Kristensen et al., 2000). Recientemente, hemos demostrado la expresión de SPARC en células LSEC y CEH en ratones sometidos por 10 semanas a TAA (Atorrasagasti et al., 2013). Además, la expresión de SPARC se localiza difusamente en la hepatitis crónica inducida por HCV, específicamente en las LSEC de las zonas periportales, intermedias y pericentrales del hígado (Nakatani et al., 2002). Además, la sobre-expresión de SPARC que se observa en el HCC (Goldenberg et al., 2002; Lau et al., 2006; Le Bail et al., 1999) se observó a lo largo de los capilares presentes de la cápsula del HCC y en los hepatocitos transformados. Las líneas celulares derivadas de carcinomas hepatocelulares humanos también expresan SPARC (Atorrasagasti et al., 2010).

El rol de SPARC en la fibrosis hepática fue extensamente estudiado en nuestro laboratorio. La sobre-expresión de SPARC está asociada con niveles incrementados de colágeno de tipo I fibrilar (Frizell et al., 1995), evento de mayor importancia, ya que la acumulación de colágeno es una de las características centrales de la fibrosis hepática. Además, también observamos que la reducción de

la expresión de SPARC protege contra el daño inducido por TAA (Camino et al., 2008). En este sentido, el uso terapéutico de un adenovirus que expresa una secuencia antisentido para el ARNm de SPARC (AdasSPARC) fue capaz de reducir los niveles de daño hepático y el número de células α -SMA⁺, característico de las CEH activadas. Los ratones que recibieron el vector AdasSPARC mostraron fibras de colágeno más finas y en un estadio más inmaduro que las de los ratones no tratados. También mostraron valores más bajos de TGF- β , citoquina maestra en el proceso de fibrosis en el hígado (Camino et al., 2008). Consistente con estos resultados, los ratones SPARC^{-/-} tratados de forma crónica con TAA mostraron una reducción en los niveles de fibrosis al compararlo con ratones SPARC^{+/+} (Atorrasagasti et al., 2013) (Figura 3). Además, los ratones SPARC^{-/-} redujeron la expresión y secreción de TGF- β y la expresión de colágeno tipo I. Iguales resultados se encontraron en dos líneas celulares de CEH: CFSC-2G (rata) y LX-2 (humana), y en cultivos primarios de CEH de rata al inhibir la expresión de SPARC con ARN de interferencia (Atorrasagasti et al., 2011). La fisiología de las células CEH se encontró modificada por la acción de SPARC. La inhibición de SPARC incrementó la adhesión y disminuyó la migración hacia citoquinas fibrogénicas como PDGF y TGF- β . Estos datos sugieren que la sobre-expresión de SPARC participa activamente en la fibrogenesis hepática y podría ser postulada como un blanco terapéutico en esta patología.

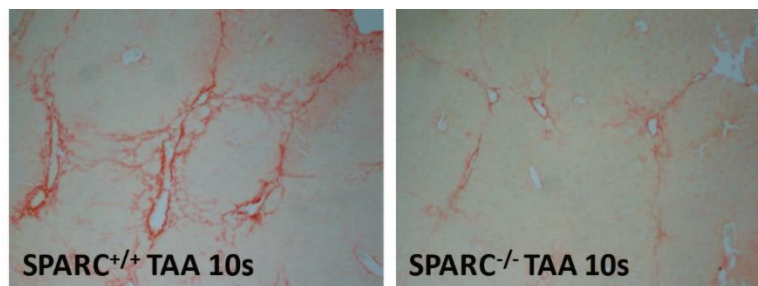


Figura 3 Reducción de la fibrosis en ratones SPARC^{-/-}

Figuras representativas teñidas con rojo Sirio de hígados de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} tratados con TAA por 10 semanas (100X)

Terapia génica: Generalidades y aplicaciones

La terapia génica podría definirse como la transferencia de material genético exógeno a células, tejidos u órganos para corregir un defecto genético o conferir una nueva función biológica con el propósito de prevenir o tratar una enfermedad (Anderson, 2000; Miller, 1992; Mulligan, 1993). La terapia

génica es una prometedora modalidad terapéutica, que no se limita solo a enfermedades hereditarias sino que también puede ser usada para una amplia variedad de enfermedades adquiridas, como las infecciones, los desórdenes degenerativos y el cáncer. Como se describe a continuación, para la transferencia del material génico es necesaria la utilización de un vehículo o vector que facilite su introducción. A la hora de diseñar una terapia génica para enfermedades humanas, es necesario estudiar la mejor estrategia para la elección del gen terapéutico más relevante (Miller, 1992), el promotor (Mulligan, 1993), las secuencias regulatorias que manejarán la expresión del transgén (Herskowitz, 1987), y el vector a utilizar para transferir el transgén a las células (Schmitz et al., 2002).

A pesar del impresionante progreso en las ciencias biomédicas durante décadas, el tratamiento de varias enfermedades hepáticas no es satisfactorio. La terapia génica emerge como un nuevo y prometedor método para tratar enfermedades humanas. El material génico que puede ser transferido es muy diverso, como genes completos (Schiedner et al., 1998), moléculas antisentido (Dias and Stein, 2002), ribozimas (Mulhbachter et al., 2010) o ARN de interferencia (Shim and Kwon, 2010). Las moléculas antisentido son construcciones de ADN o ARN que se pegan de forma complementaria a secuencias por hibridación e interfieren con el procesamiento del ARN mensajero y su traducción, acelerando así su degradación (Crooke, 1998; Eguchi et al., 1991). La interferencia de ARN (ARNi) es un proceso natural donde la expresión de un gen blanco puede ser silenciada con alta especificidad y selectividad (Rao et al., 2009). La transferencia de material genético a los tejidos o a las células puede realizarse *in vivo* o *ex vivo*. El procedimiento *ex vivo* requiere el aislamiento de las células diana, su cultivo *in vitro*, la transferencia del material genético y, posteriormente, la reintroducción de las células en el huésped. Por el contrario, en el procedimiento *in vivo*, el material genético se introduce directamente en el organismo, sin aislar previamente las células diana.

Vectores de terapia génica

Un vector ideal es capaz de transferir el material genético a las células deseadas de una manera segura y específica, sin que resulte tóxico o inmunogénico para el huésped, y que pueda producirse en cantidades adecuadas. Lógicamente es difícil conseguir un vector que reúna todas las cualidades necesarias, pero existen importantes avances en los últimos años. Los vectores pueden ser de dos

tipos: virales y no virales o físicos. En general, los vectores no virales son menos eficientes y permiten un tiempo de expresión del transgén menor que el de los vectores virales (Prieto et al., 2004). El vector ideal debería ser de un bajo potencial antigénico, alta capacidad para contener información genética, alta eficiencia de transducción, permitir la expresión controlada del transgén solo en las células blanco, y ser seguro para el paciente y el medio ambiente (Prince, 1998).

Vectores no virales

Existen numerosos métodos de transferencia génica basados en vectores no virales. En general, son simples y fáciles de preparar, permiten transferir moléculas de gran tamaño, son poco inmunogénicos, su toxicidad suele ser baja y son seguros. Sin embargo, la eficacia de transferencia génica alcanzada suele ser baja y son poco específicos (Ledley, 1995). Los vectores no virales más empleados son el DNA desnudo, los liposomas, la pistola génica, los polímeros catiónicos (poliplejos), los complejos DNA-proteína y los ARN de interferencia. En los últimos años se han desarrollado numerosas estrategias para mejorar la eficiencia de estos vectores. De particular interés para esta tesis es el uso de ARN de interferencia, que constituye una excelente herramienta para el silenciamiento de genes *in vitro* (Iorns et al., 2007). A pesar de la degradación a pocos días de la administración, esta técnica también puede ser usada satisfactoriamente para generar respuestas inmunes eficientes contra las proteínas codificadas por el ADN inyectado.

Vectores Virales

Los vectores virales son los vehículos más eficientes para la transferencia génica. Su diseño se realiza mediante la suspensión de regiones implicadas en el proceso de replicación viral y la incorporación, en su lugar, del material genético de interés (Prieto et al., 2004). De esta forma, el nuevo virus es defectivo y mantiene así la capacidad de infectar las células y la incapacidad de replicarse en ellas. Se pueden utilizar diferentes tipos de virus para construir vectores, incluyendo adenovirus, retrovirus, virus adeno-asociados, herpesvirus, lentivirus, baculovirus, SV40 virus y vacciniavirus, entre otros (Waehler et al., 2007).

Los lentivirus son miembros de la familia de los virus Retroviridae (retrovirus), caracterizados por presentar una simple cadena de ARN y el uso de su retrotranscriptasa viral e integrasa para insertar su información viral en el genoma del huésped (Gordon and Anderson, 1994). Como los hepatocitos no proliferan activamente bajo condiciones fisiológicas, el hígado es un tejido difícil para infectar

con vectores retrovirales. Además, la eficacia de infección está limitada por el bajo título del virus obtenido mediante los procesos de purificación. Como la infección *in vitro* de hepatocitos lleva a una alta eficacia de transducción, los retrovirus pueden ser usados por transferencia génica *ex vivo* (Grossman et al., 1995; Kalpana, 1999). El desarrollo de lentivirus basado en vectores humanos ofrece perspectivas prometedoras para la transferencia en células que no se dividen (Kafri et al., 1997; Sakuma et al., 2012). Así, los lentivirus de tercera generación permiten, al poseer la glicoproteína G del virus VSV-G en su envoltura, la infección de un variado rango de tipos de células huésped (Burns et al., 1993; Emi et al., 1991; Yee et al., 1994).

De particular interés en esta Tesis Doctoral es el uso de vectores adenovirales. Los adenovirus recombinantes son uno de los vectores virales más empleados (Hall et al., 2010). Son virus pertenecientes a la familia *adenoviridae*, de estructura icosaédrica, y carentes de envoltura. Están constituidos por ADN de doble cadena y proteína, con una partícula viral de aproximadamente 75 nanómetros de diámetro y un genoma de 36 Kb. Existen 6 subgéneros (A-F) y alrededor de 47 serotipos diferentes, de los cuales los tipos 2 y 5 son los más empleados (Hall et al., 2010). El virus posee un ciclo de replicación en dos fases: una fase temprana que implica a los sucesos que ocurren antes de la replicación del ADN, y otra tardía que se corresponde con los sucesos posteriores. Las proteínas necesarias para la transcripción y replicación viral (regiones E1a y E1b, E2a y E2b, E3, y E4) se expresan en la fase temprana. En la fase tardía (L1-L5) se expresan las proteínas que conformarán la envoltura del adenovirus (Zhang, 1999).

En los adenovirus de primera generación, las regiones E1 y E3 son suprimidas, incapacitando así la replicación. La delección de las regiones E1 y E3 permite además una capacidad de portación de transgenes de 8 kb. Los adenovirus recombinantes se propagan en células empaquetadoras que expresan en forma constitutiva la proteína E1 (células 293) (Graham et al., 1977). Los adenovirus son de especial interés en hepatología por su tropismo natural por los hepatocitos y por su capacidad para infectarlos, a pesar de tratarse de células en estado de reposo (Sullivan et al., 1997; Topf et al., 1998). Sin embargo, deben tenerse los recaudos necesarios, ya que desde que los adenovirus comenzaron a usarse se observó que la expresión de estos vectores es transitoria, y que desencadena en el huésped una importante respuesta inmunitaria de tipo humoral y celular, tanto contra las proteínas virales como contra el transgén, llevando así a la eliminación de las células traducidas (Kaufman, 1999; Ponnazhagan et al., 1997; Yang et al., 1994; Zhang, 1999).

Terapia génica aplicada a la fibrosis hepática

En los últimos años se ha avanzado significativamente en el empleo de herramientas de terapia génica para el tratamiento de la cirrosis hepática en modelos experimentales (Salazar-Montes et al., 2015). En relación con la utilización de vectores físicos, por ejemplo, se han utilizado plásmidos o liposomas para incorporar genes que induzcan la regeneración hepática o inhiban el progreso de la fibrosis. Sin embargo, si bien se han obtenido resultados positivos luego de su aplicación, estos fueron limitados debido a la baja eficiencia y durabilidad de la expresión génica. Hasta el momento no se ha comunicado el empleo de vectores virales en ensayos clínicos en fibrosis hepática; sin embargo, considerando las ventajas que presentan, los vectores de tipo virales han sido los más utilizados en modelos experimentales. En este contexto, con el fin de revertir la fibrosis, se han aplicado adenovirus que expresan genes como el activador de plasminógeno tipo uroquinasa humano (Ad-huPA) (Miranda-Díaz et al., 2004), metaloproteasa tipo 1 (Ad-MMP1) (Salazar-Montes et al., 2015) y metaloproteasa tipo 8 (Ad-MMP8) (García-Banuelos et al., 2002; Siller-López et al., 2004). Asimismo, el empleo de adenovirus con el objeto de bloquear vías de señalización de mediadores clave en el proceso de fibrogenesis, como TGF- β 1 (AdT β RII Δ cyt), que codifica para receptor dominante negativo de TGF- β 1, Ad5-CMV-AS-TGF- β 1 que expresa la secuencia antisentido de TGF- β 1 (Arias et al., 2003) o PDGF (Ad5-CMV-asPDG, adenovirus antisentido para PDGF), han mostrado eficacia en reducir el grado de fibrosis hepática (Salazar-Montes et al., 2015).

Por otra parte, otro vector terapéutico empleado para vehicular la transferencia génica en modelos de fibrosis hepática fue el virus SV40 (virus del simio 40) (Vera et al., 2007). SV40 es un virus desnudo icosaédrico, con un genoma de ADN bicatenario que reconoce en las células proteínas del CMH tipo I a través de una glicoproteína vírica (VP1) para ser endocitado posteriormente a través de vesículas. Se han comunicado estudios en modelos experimentales de cirrosis establecida, donde el tratamiento con el virus SV40 codificante para IGF-I redujo el daño hepatocelular, disminuyó la expresión de genes profibrogénicos y estimuló la fibrólisis; conduciendo así a una mejora en la funcionalidad del hígado y a una reducción del grado de fibrosis hepática (Sobrevals et al., 2010). Si bien estos resultados son promisorios, la utilización de vectores virales presenta algunas limitaciones, ya que la expresión del transgén es transitoria y cuando son administrados directamente en el huésped pueden generar respuesta inmunitaria innata o específica tanto contra proteínas virales como contra el transgén. Como consecuencia de esta respuesta inmunitaria la vida

media de estos vectores es reducida y puede generar efectos colaterales no deseados en el huésped cuando son administrados de forma sistémica (Verma and Somia, 1997; Yang et al., 1994).

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La inducción de SPARC cumple un rol importante durante el proceso fibrogénico generado por la administración crónica de TAA. Se ha observado previamente en nuestro laboratorio, que la inhibición de su expresión protege contra el daño hepático crónico pudiéndose utilizar como estrategia terapéutica (Atorrasagasti et al., 2013; Camino et al., 2008). Sin embargo, los mecanismos por los cuales SPARC actúa durante el daño agudo o crónico no han sido dilucidados con precisión. Como fue descrito previamente, la ausencia de SPARC en ratones podría resultar en una respuesta deficiente del sistema inmunitario frente a la injuria. Por otra parte, SPARC es capaz de modular la morfología de las células endoteliales, así como los procesos de apoptosis y autofagia. La *hipótesis de este trabajo* es que SPARC se encuentra involucrada en el desarrollo del daño hepático agudo favoreciendo la susceptibilidad de las células endoteliales sinusoidales hepáticas a la muerte celular. Por lo tanto, la ausencia de SPARC conduciría a la preservación del endotelio sinusoidal hepático resultando en una reducción del proceso inflamatorio, y la posterior necrosis de los hepatocitos que conduce a la insuficiencia hepatocelular.

Asimismo, dado que la ausencia de SPARC desempeña una función protectora frente al daño crónico como se mostró previamente (Atorrasagasti et al., 2013), nos propusimos realizar un *screening* mediante la aplicación de técnicas de genómica y proteómica funcional para indagar sobre los posibles mecanismos que pudieran estar implicados. Así exploramos la hipótesis de que esta protección podría deberse, al menos en parte, a una reducción en los niveles de especies reactivas del oxígeno y a un aumento de la capacidad de proliferación celular frente al daño.

Objetivos generales

Con el fin de explorar las hipótesis planteadas se proponen los siguientes objetivos generales:

- 1) Determinar la función de SPARC durante el desarrollo de injuria hepática aguda en modelos experimentales
- 2) Identificar y caracterizar el perfil de expresión de ARNm (genómica) y proteínas hepáticas (proteómica) en modelos de daño hepático agudo y crónico en animales SPARC^{-/-} y SPARC^{+/-}.

- 3) De observar un efecto protector en ausencia de SPARC, caracterizar los mecanismos de acción que median este efecto en el daño hepático agudo y crónico

Objetivos específicos

Parte I

- Caracterizar los cambios de la expresión de SPARC en tejido hepático en pacientes con diferentes patologías hepáticas y en modelos experimentales generados tras la administración de Concanavalina A, el anticuerpo anti-CD95 Jo2, o galactosamina/Lipopolisacarido.
- Comparar el grado de lesión hepática producido por la aplicación de Concanavalina A, anticuerpo anti CD-95 Jo2 o galacosamina/lipopolisacarido tanto en ratones SPARC^{+/+}, SPARC^{+/-}, SPARC^{-/-} y en ratones SPARC^{-/-} resensibilizados con el uso de un adenovirus que expresa una secuencia sentido para SPARC (AdsSPARC).
- Analizar bioquímicamente la evolución del modelo de daño hepático agudo, determinar el perfil de citoquinas en suero y el grado de respuesta inflamatoria en animales SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-}.
- Estudiar la integridad, el grado de activación del endotelio vascular sinusoidal, el proceso de trans migración celular y el nivel de apoptosis y autofagia durante la evolución del modelo de daño hepático agudo en ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-}.
- Explorar nuevos mecanismos para explicar la protección al daño hepático agudo en ausencia de SPARC luego del tratamiento con Concanavalina A utilizando microarreglos.
- Estudiar los efectos protectores preventivos y terapéuticos inhibiendo la expresión de SPARC con un adenovirus que expresa una secuencia antisentido para SPARC y un lentivirus que expresa siRNA anti SPARC, respectivamente, en el modelo de Concanavalina A.

Parte II

- Caracterizar el perfil de expresión diferencial de genes y proteínas asociadas al efecto protector del daño hepático crónico con tioacetamida ante la ausencia de SPARC y realizar ensayos funcionales para validar las posibles vías implicadas en la protección por ausencia de SPARC
- Estudiar el estado proliferativo de hígados de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} sometidos a modelos de daño agudo y crónico
- Estudiar los niveles de estrés oxidativo en ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} en diferentes modelos de daño agudo y crónico
- Evaluar el estado de las mitocondrias de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} en el modelo de daño agudo
- Caracterizar el modelo de ligadura de conducto biliar en ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-}.

Materiales y Métodos

Materiales y métodos

Parte I

Animales y diseño experimental

Para este trabajo de tesis se utilizaron ratones de 6 a 8 semanas, de la cepa C57BL/6x129SvJ *knockout* para SPARC (SPARC^{-/-}), wild type (SPARC^{+/+}) y heterocigotas (SPARC^{+/-}), provenientes de The Jackson Laboratory, USA. Durante el período de experimentación los animales fueron mantenidos en el bioterio de la Universidad Austral. Los animales fueron alojados en jaulas y sometidos a ciclos de luz-oscuridad de 12 h de duración a una temperatura y humedad constantes. Recibieron alimento balanceado y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales con animales se realizaron ajustándose a las normas indicadas en "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" (National Academy Press, Washington, D.C. 1996) y aprobados por la Escuela de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral

Para el modelo de Con A (SIGMA, St Louis USA), los ratones recibieron una sola inyección intravenosa (i.v.) de Con A de 15 µg/g de peso. Para obtener muestras, los animales fueron sacrificados 3, 9 y 24 horas después de la aplicación de Con A (Figura 4).

Para evaluar el uso terapéutico del siARN anti SPARC, se utilizó siARN (Dharmacon, Chicago, IL, USA) de rata (siSPARC: se usaron cuatro construcciones en combinación: 5'-GAGAAGAACUACAACAUGUUU-3', 5'-CCAGAACCAUCAUUGCAAUU-3', 5'-GAACAUUGCACCACUCGCUUU-3', 5'-CUACAUCGGACCAUGCAAUU-3') y un control de siARN (siControl D-001210-05-05, Dharmacon, Chicago, IL, USA). Los ratones recibieron una inyección i.v. de Con A de 10 µg/g de peso corporal. Otro grupo de animales recibió 1 ml de solución salina por la vena porta, siControl o siSPARC. Los ratones *sham* fueron operados pero no recibieron Con A. Las muestras se obtuvieron de ratones que fueron sacrificados luego de 48 h de aplicar la Con A. Un grupo de ratones fue utilizado para un análisis de supervivencia.

Otros grupos de animales recibieron una dosis subletal (0,25 µg/g) del anticuerpo agonista de CD95, Jo2 de forma intraperitoneal (i.p.) (BD, New Jersey, USA), o D-Galactosamina / Lipopolisacrido (ambos productos de SIGMA, St Louis, USA, utilizados a una concentración de GalN: 0,125 mg/g/ LPS; 12.5 µg/kg) también de forma i.p y se sacrificaron a las 24 h.

La Con A (SIGMA, St Louis USA) y la cloroquina (SIGMA, St Louis USA, utilizada para inducir un bloqueo del flujo autofágico), se administraron para los estudios *in vitro* en el medio de cultivo a una concentración de 15 µg/ml y 20 µM respectivamente.

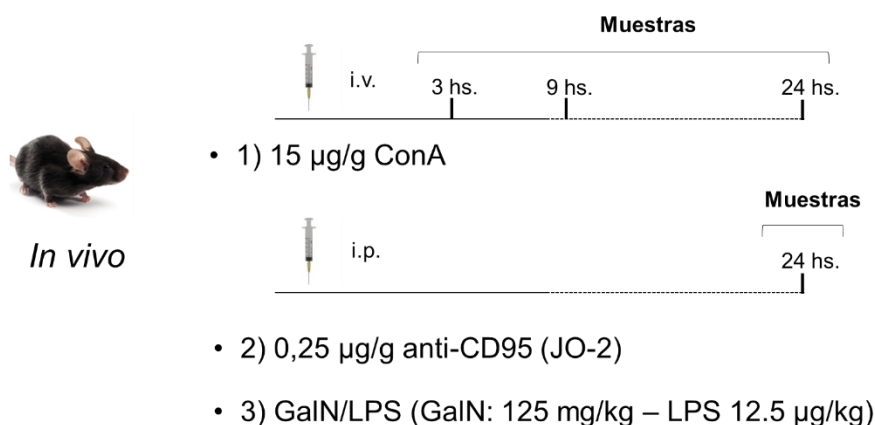


Figura 4 Diseño experimental

Obtención de biopsias de hígados humanos

Para estudiar los niveles de expresión de SPARC en humanos se incluyeron pacientes admitidos a la Unidad Hepática, del Hospital Clínico de Barcelona con diferentes características clínicas, analíticas e histológicas desde el año 2007 al 2010. Un grupo de pacientes tuvieron diagnóstico histológico de hepatitis alcohólica (n=34). Las muestras de tejido hepático de los pacientes con hepatitis alcohólica fueron obtenidas mediante una biopsia transyugular. También incluimos una cohorte de pacientes con obesidad mórbida asociada a esteatohepatitis no alcohólica (n=10). Las biopsias hepáticas se obtuvieron durante su cirugía bariátrica. También se incluyeron en el estudio muestras de pacientes con hepatitis C crónica que no habían recibido tratamiento previo con antivirales (n=5). Se utilizaron fragmentos de tejido hepático normal de donantes cadavéricos (n=3) o muestras obtenidas durante la resección de metástasis de hígado (n=3) como tejido de control. El protocolo de trabajo siguió las guías éticas de la Declaración de Helsinki de 1975 y fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de Barcelona. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado para este estudio.

Generación de vectores adenovirales recombinantes

Para este trabajo se utilizaron adenovirus de primera generación no replicativos (Camino et al., 2008). El adenovirus que contiene la secuencia antisentido para SPARC humano (AdasSPARC) (clonado en el laboratorio del Dr. O. Podhajcer) fue preparado cortando un fragmento de 1.7 kb con Sal I del plásmido pBSSK+. Este fragmento fue clonado en el vector *shuttle* pADPSY (provisto por el Dr. Jacques Mallet) con Sal I. El nuevo plásmido, pADPSY, que contiene la secuencia antisentido del ARN mensajero para SPARC fue co-transfectado posteriormente con el DNA del adenovirus tipo 5 (desprovisto de regiones E1 y E3) empleando Cla I mediante precipitación con fosfato de calcio. La recombinación homóloga resultante entre ambos ADNs se realizó en células HEK-293. La incorporación de la secuencia antisentido para SPARC en el esqueleto adenoviral se confirmó por efecto citopático en células HEK-293. Dado que las células HEK-293 expresan SPARC se estableció el descenso en el nivel de SPARC mediante análisis con Northern blot y Western blot de los clones y del adenovirus stock. También se utilizó un vector que codifica para SPARC humano (AdsSPARC). El fragmento de 1,7 kb que contiene la secuencia sentido de SPARC humana se clonó en el vector pADPSY-LTRSVpolyA para generar el vector adenoviral AdsSPARC (Sosa et al., 2007). El adenovirus que expresa β -galactosidasa (Ad- β gal) fue clonado con Sal I en el vector *shuttle* pADPSY-LTRSVpolyA.

El primer paso en la generación del stock adenoviral consistió en infectar células HEK-293 cultivadas en una placa de 150 mm con una confluencia aproximada del 80%. Se retiró el medio sobrenadante de la placa y se colocaron 8 ml de DMEM 2% SFB y luego las células fueron infectadas con 1-2 μ l de un stock viral previamente generado en el laboratorio del Dr. Podhajcer. Tras una incubación de 3 h con agitación esporádica se agregó medio y las células se incubaron por 18-20 h. Se colectaron las células y se lisaron por ciclos de congelado/descongelado. Luego de centrifugar por 10 minutos a 4000 rpm, se utilizó el sobrenadante para infectar 15 placas de 150 mm. Se incubó 2 h a 37°C con agitación cada 20 min y se esperó 24 h para colectar las células infectadas. Luego de ese tiempo las células se centrifugaron y se lisaron por congelado/descongelado. Para obtener el virus, el extracto se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante fue utilizado para purificar el virus amplificado. Se utilizó un gradiente de CICs de densidad 1,6 más 1 ml de CICs de densidad 1,3 para separar el virus del ADN remanente y de las cápsidas vacías. El sobrenadante se sembró sobre el gradiente y se centrifugó a 35000 rpm durante 1,5 h. Se obtuvieron tres bandas; la banda inferior que corresponde al virus, se extrajo con una aguja y se sometió a una nueva centrifugación. Para

ello se colocó la muestra obtenida del primer gradiente sobre 2 ml de CICs densidad 1,34 y se centrifugó a 35000 rpm durante 18 h .De esta forma se obtuvo una nueva banda con virus puro, que fue dializado en solución de diálisis (1l de PBS / Cl₂Mg 1mM). El virus fue resuspendido en glicerol 10% y las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

El título de adenovirus fue determinado mediante análisis de formación de calvas en cultivo por ensayo de dilución límite. Para ello, se infectaron células HEK-293 (1x10⁴ células por pocillo) previamente sembradas en placas de 96 pocillos. El adenovirus fue diluido en series de 10 y por duplicado. Se removió el sobrenadante de la placa de 96 y se agregó el adenovirus diluido en un volumen de 100 µl por pocillo. Se incubaron a 37°C durante un periodo de 10 días, fecha en la cual fue evaluada la presencia del efecto citopático del virus sobre las células mediante tinción con cristal violeta. El título de los vectores fue expresado como 50% de dosis infectiva por mililitro sobre células HEK-293 (TCID₅₀/ml), aplicando el siguiente calculo:

$$TCID_{50}/ml = -\log (X_0 + \frac{1}{2} + 1 * \frac{\sum X}{n})$$

X₀ exponente de la dilución con 100% de efecto citopático

X número de pocillos con 100% de efecto citopático

n número de réplicas

Para estudiar si al inhibir la expresión de SPARC 48 h antes de administrar Con A existía un efecto preventivo del daño generado por la toxina, algunos grupos de animales recibieron por vía i.v. AdasSPARC o Adβgal a una TCID₅₀ de 1,3x10⁹. Otro grupo de animales control recibió una administración intrahepática de AdsSPARC o Adβgal (TCID₅₀: 5x10⁹).

En este trabajo también se utilizaron vectores lentivirales para inhibir la expresión de SPARC y fueron producidos como se detalla a continuación. El plásmido pRNATin.H1.4-L.51 que contiene la secuencia siRNA de SPARC (tggatcccgccgagcagagcgcgctctcttgatccggagagcgcgctctgcctgccgtttttccaactcgagg) fue producido siguiendo los protocolos de clonado de Genscript. El vector *scramble* fue ordenado a Genscript. Los vectores lentivirales fueron producidos usando el kit ViraPower™ Lentivirus Technology 2000

(Invitrogen, Massachusetts, USA). Las células 293 FT fueron transfectadas con una mezcla de 36 μ l de Lipoafectamina 2000 (Invitrogen, Massachusetts, USA), 9 μ g (9 μ l) de ViraPower™ Packaging Mix y 3 μ g del plásmido de expresión pRNATin.H1.4-L51 (siSPARC) o *scramble* (siSCR) en un 1ml de Opti-MEM® I Medium sin suero. Los sobrenadantes conteniendo el lentivirus fueron recolectados después de 48-72h post transfección. Los sobrenadantes fueron usados por 48 horas para transducir células HMEC-1.

Determinación de transaminasas hepáticas y producción TNF- α e IL6 en suero

El suero fue obtenido por sangrado retro-orbital de ratones anestesiados. La sangre se centrifugó por 10 min a 3000 rpm. Se midieron los niveles de las transaminasas hepáticas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) usando un analizador clínico standard (ARCHITECT®, Abbott, Chicago, USA). Además, se midieron los niveles de TNF- α , e IL6 en suero utilizando kits de ELISA (R&D Systems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción reversa (RT-qPCR)

Las muestras de tejido hepático fueron homogeneizadas y el ARN total fue extraído con Trizol Reagent siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich Co., St Louis, USA). El ARN (2 μ g) fue retrotranscrito con 200 U de transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen, Massachusetts, USA) usando 500 ng de primers de Oligo (dT). El ADNc fue sometido a qPCR. Los niveles de ARNm de SPARC y de TGF- β 1 fueron cuantificados por SYBR® Green (Invitrogen, Massachusetts, USA) qPCR (Stratagene Mx3005p, Stratagene, USA). Todas las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo usando 40 ciclos de 95°C por 30s, 55°C por 30s, y 72°C por 30s. Para las biopsias humanas, las reacciones de qPCR se realizaron utilizando un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ usando pares de sondas comerciales (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para medir los niveles de ARNm de SPARC humano. Se usó el ARN 18S como control endógeno. Los valores de expresión génica fueron calculados basándose en el método de $\Delta\Delta C_t$. Los resultados fueron expresados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ comparados con la expresión media cuantificada en hígados normales (Tabla I).

Tabla I: Primers empleados para qPCR

Gen Objetivo	Primer Sentido	Primer Antisentido
SPARC ratón	5'-CCACACGTTTCTTTGAGACC-3'	5'-GATGTCCTGCTCCTTGATGC-3'
SPARC humano	5'-AAACCGAAGAGGAGGTGGTG-3'	5'-GCAAAGAAGTGGCAGGAAGA-3'
GAPDH	5'-GGGGCTGCCAGAACATCAT-3'	5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'
TGF-b1	5'-ACCAACTATTGCTTCAGCTC-3'	5'-TGTTGGTTGTAGAGGGCAAG-3'

Análisis histológico e inmunotinción

Para los diferentes estudios histológicos, las muestras hepáticas fueron fijadas en formalina al 10%, deshidratadas y luego embebidas en parafina. Posteriormente, un grupo de muestras fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). Se seccionaron muestras a 5 µm de espesor con micrótopo y estos cortes se desparafinizaron mediante dos pasajes de 10 minutos cada uno en xilol (Biopack) y luego se hidrataron en agua. Se incubaron con una solución de hematoxilina por 40 segundos. Se lavaron con agua corriente hasta viraje de la tinción. Para deshidratar el tejido se lavó en etanol 70% y 3 minutos en alcohol 96%. Se realizó una contratinción con solución de eosina alcohólica durante 5 minutos. Se eliminaron los restos de eosina con etanol 70%. Se deshidrató y aclaró en xilol y se montó con bálsamo de Canadá (Biopack).

Para estudiar la presencia de células CD4 mediante inmunohistoquímica se incluyó el tejido hepático en un medio de montaje para congelación (Cryoplast, Biopack, Buenos Aires, Argentina), seccionado en criostato a 12 µm y fijado por 15 minutos en formalina alcohólica. Luego de la deshidratación se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3 % en etanol al 95%. Luego se bloqueó la biotina y avidina endógena (Blocking kit, Vector Laboratories Inc.) y las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-CD4 (1:75, 0,2% BSA en PBS) durante una noche. Luego de lavarse en buffer PBS, los preparados se incubaron con un anticuerpo secundario anti ratón hecho en cabra, biotinilado y vinculado a peroxidasa (1:100, Vector Laboratories Inc.) por 2 horas, lavado y luego incubado con complejo AB (Vector, CA, USA). Se lavó dos veces con PBS y dos más con buffer acetato 0.1 M antes de la incubación con la solución de 3,3-diaminobenzidina (DAB; Sigma, St Louis, USA), amonio níquel sulfato (Aldrich, St Louis, USA) y H₂O₂ hasta el desarrollo de señal.

Para la inmunohistoquímica de SPARC el tejido hepático fue congelado rápidamente en nitrógeno líquido y guardado a -80°C en un medio de montaje para congelación (Cryoplast, Biopack, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente, las muestras se seccionaron a 12 µm de espesor. Luego los cortes fueron fijados en formalina alcohólica por 15 minutos. Después de lavar con PBS se procedió a deshidratar los tejidos para luego bloquear las peroxidasas endógenas con H₂O₂. Luego de volver a hidratar se bloquearon la avidina y biotina endógenas con kit VECTOR y los sitios de unión inespecífica con BSA al 1% en PBS. Se incubó toda la noche con el anticuerpo primario AON generado en hibridoma de ratón (1:200 en BSA al 0,2% y Tritón 0,1% en PBS 1X, cedido por el Dr. Podhajcer). Luego del lavado se incubó en un anticuerpo secundario anti-ratón, acoplado a biotina a una dilución de 1:100 durante dos horas. Se lavó y se procedió a revelar como en el caso de la inmunomarcación para CD4, según descripción en el párrafo anterior.

El análisis por inmunofluorescencia para LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), en células HMEC-1 transfectadas con siSPARC o siSCR (scrambled siRNA) fue realizado con el anticuerpo anti-LC3 (1:50, Abgent, USA), usando un anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 488-conjugado IgG (1:200, Promega, USA). Para la detección de células apoptóticas *in situ* se aplicó la técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated labeling of nick-end DNA) en secciones congeladas, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Calbiochem, Alemania). Las secciones de hígado congeladas fueron teñidas usando un anticuerpo primario anti-VCAM (1:25, BD, New Jersey, USA) y un anticuerpo secundario anti-rat Cy3-conjugado IgG (1:400, Jackson, USA).

Para los estudios *in vitro* en células HMEC-1 (Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA) la Con A y la cloroquina fueron agregadas al medio en concentraciones de 15 µg/ml y 20 µM, respectivamente. La apoptosis fue cuantificada mediante tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio. Luego de aplicar los diferentes tratamientos las células fueron resuspendidas en una mezcla de tinciones (100 µg/ml naranja de acridina y 100 µg/ml de bromuro de etidio en PBS) y se visualizó por microscopia de fluorescencia (Nikon Eclipse E800, Nikon, Tokio, Japón). El porcentaje de células apoptóticas o índice de apoptosis fue calculado de la siguiente manera: células apoptóticas (%) = (número total de células con núcleo apoptótico / número de células totales contabilizadas) x 100.

Para la tinción con faloidina conjugada con Alexa Fluor 546 (Invitrogen, Massachusetts, USA), una micotoxina capaz de unir específicamente filamentos de actina, se plaquearon células hasta alcanzar

confluencia. Las células plaqueadas fueron incubadas con Con A durante 3 h y tratadas con siSCR o siSPARC, o bajo condiciones de control. Luego fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y permeabilizadas con 0,1% Tritón X-100/PBS por 10 minutos. Luego de tres lavados en PBS, las células fueron incubadas con faloidina por 2 horas a temperatura ambiente. Luego los cubreobjetos fueron montados usando un medio con glicerol-gelatina (Sigma, St Louis, USA). Las fotos fueron tomadas usando un microscopio Nikon Eclipse E800 acoplado a una cámara DN100 CCD.

Análisis por citometría de flujo

Las células CD4⁺ también fueron cuantificadas por citometría de flujo de muestras frescas de hígado. Los ratones fueron sacrificados a las 24 horas después de administrar la Con A y el tejido hepático fue digerido enzimáticamente con colagenasa de *Clostridium histolyticum* (SIGMA, St Louis, USA, 5 mg por ratón) y disgregado mecánicamente hasta generar una suspensión unicelular. Adicionalmente, las células fueron tratadas con buffer de lisis de glóbulos rojos (0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂-EDTA) y, luego de la sedimentación de los hepatocitos, se tiñó el sobrenadante con anti-CD4-PECy5 (Cat.553050; BD Biosciences). Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 1% y analizadas mediante citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences, San Diego, California, USA). Los datos fueron analizados usando el software WinMDI.

Estudios de trans migración

Se analizó el proceso de trans migración a través de una monocapa de células HMEC-1 pre-tratadas por 3 horas con Con A. Para ello, las células HMEC-1 empleadas fueron infectadas o no con los vectores lentivirales que expresaban secuencias siSPARC (anti-SPARC) o siSCR (control). Se sembraron un número total de 1x10⁵ células HMEC-1 sobre filtros policarbonados con porosidad de 8 µm en unidades de transwells de 24 pocillos (Falcon, BD Labware) recubiertos con 10 µg/ml de fibronectina de plasma bovino (SIGMA, St Louis, USA). Las células HMEC-1 se dejaron adherir durante la noche a 37°C. En la cámara inferior se agregaron las quimiocinas CCL19 y CCL21 (Peprotech, New Jersey, USA, 10 ng/µl) como quimioattractantes de esplenocitos. Los esplenocitos teñidos previamente con DAPI (5x10⁵) fueron ubicados en la cámara superior sobre las células

HMEC-1 confluentes y se dejaron transmigrar por 4 horas a 37°C. Posteriormente, la membrana fue removida cuidadosamente y las células del lado superior fueron desechadas. Las células adheridas del lado inferior fueron fijadas con formaldehído 2%. Las células fueron contadas usando un microscopio de fluorescencia y las imágenes capturadas por tres campos visuales representativos (10x) fueron analizadas utilizando el software CellProfiler (www.cellprofiler.com) y se obtuvo la media del número de células/campo.

Microscopía electrónica

Los ratones fueron tratados con Con A por 6 h, para ser luego sacrificados y obtener una disección del tejido hepático. Para procesar las muestras, se tomaron secciones de tejido hepático de 1 mm³ que fueron fijadas en 2,5% de glutaraldehído, seguido de un lavado y de una fijación con tetróxido de osmio. El tejido fue incluido en Epon 812, una resina epoxi, y fue seccionado con un micrótopo con el cual se obtuvieron secciones ultrafinas (50 nm) que se observaron en un microscopio electrónico Hitachi H-7000 (Hitachi, Tokyo, Japon).

Análisis por microarreglos de cDNA

Las muestras fueron procesadas siguiendo las recomendaciones de Microarrays Inc. (Nashville, USA) y el RNAa fue hibridado en microarreglos 48.5K Exonic Evidence-Based Oligonucleotide (HEEBO). La intensidad de señal del microarray fue evaluada usando el software SpotReader (Niles Scientific, USA). La normalización fue realizada con el paquete Limma (<http://www.r-project.org>) en el entorno estadístico de R. Los datos crudos de los microarreglos individuales fueron procesados utilizando correcciones de background standard y normexp (Ritchie et al., 2007) y normalización *print-tip loess* (Smyth and Speed, 2003). Para la normalización entre microarreglos se utilizó la función de normalización a escala global con desviación de la mediana absoluta (Yang et al., 2002). Los *heatmaps* fueron construidos usando el software MeV (Saeed et al., 2006). El análisis de ontología de genes (GO) fue realizado usando DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Huang da et al., 2009), y el análisis de vías fue realizado con Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com).

Análisis estadístico

Los datos están expresados con sus medias \pm SEM. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test de Fisher LSD cuando la distribución fue normal, o el test de Mann-Whitney o el test múltiple de Dunn cuando la distribución no se ajustaba a una distribución normal. Las diferencias fueron consideradas como significativas con valor de $p < 0.05$. Los resultados mostrados son valores de medias de tres experimentos independientes.

Parte II

Animales y diseño experimental

Para los siguientes estudios se utilizaron ratones C57BL-6x129Svj macho SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) con una forma de cuidado y manipulación similar a la descrita en la primera parte. Para los estudios de daño crónico se administró TAA (SIGMA, St Louis, USA) de forma i.p. a una concentración de 200 mg/kg por ratón, 3 veces por semana. Las muestras de hígado y sangre se obtuvieron luego de 10 semanas del comienzo del tratamiento con TAA.

Por otro lado, para los modelos de daño agudo los ratones recibieron una dosis simple de TAA de 100 mg/kg administrada de forma i.p. o una inyección de Con A (Sigma, St. Louis, MO, USA) de 15 μ g/g administrada por vía i.v. Los ratones se sacrificaron 24 h después de la administración de TAA o Con A para obtener las muestras de hígado y suero (Figura 5). Otro grupo de animales recibió una dosis sub-letal (0,25 μ g/g) del anticuerpo agonista de CD95, Jo2 (BD, New Jersey, USA) y se obtuvieron las muestras de hígado y suero a las 24 horas.

Como un modelo alternativo al desarrollo de fibrosis por TAA se utilizó el modelo de ligadura del conducto colédoco. Ratones SPARC^{+/+} o SPARC^{-/-} de 8 semanas de edad fueron sometidos a laparotomía y ligadura del conducto biliar (BDL) o solamente a una laparotomía (*sham*). Para las cirugías, los animales fueron anestesiados con sodio pentobarbital sódico. Se realizó una laparotomía medial tras exponer la vía biliar extra-hepática y se ligó el conducto colédoco con seda 5-0, realizando una doble sutura. Los ratones fueron sacrificados 7 días después de la cirugía para

obtener muestras de sangre y de tejido hepático. Para los estudios *in vitro* la TAA fue usada a una concentración de 10 mM.

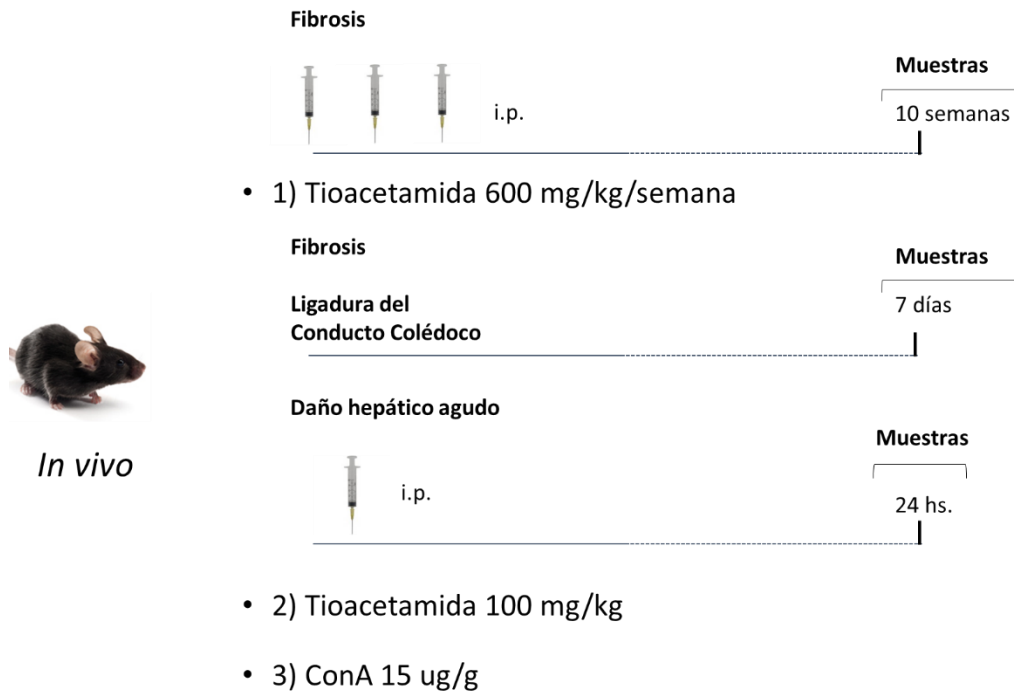


Figura 5 Modelos aplicados para daño hepático

Análisis de microarreglos

Se obtuvieron muestras de hígados de animales tratados con TAA por 10 semanas (n=4) o sin tratar (n=4) para ser procesadas siguiendo las recomendaciones de Affymetrix. El ADNc obtenido fue hibridado con un microarreglo Affymetrix Mouse Gene ST 1.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA). El algoritmo de RMA (*Robust Multichip Average*) (Irizarry et al., 2003) se utilizó tanto para la corrección de base como para la normalización. Luego se realizó un proceso de filtrado para eliminar el conjunto de sondas de baja expresión. Se aplicó el criterio de selección de manera que dos muestras por condición experimental presenten un valor mayor a 64. Así se seleccionaron 18187 conjuntos de sondas. Para procesar los datos y el análisis estadístico se utilizó R y Bioconductor. Para encontrar

el conjunto de sondas que mostraban expresión diferencial significativa entre las condiciones experimentales se utilizó LIMMA (Modelos Lineales para los datos de microarreglos) (Gentleman, 2005; Smyth, 2004). Los genes fueron seleccionados como significativos usando un criterio de valor $p < 0,01$. Se utilizó el test hipergeométrico standard (Draghici, 2003) para el análisis funcional de enriquecimiento de categorías de ontología genética (GO). La extracción de datos biológicos conocidos fue complementada a través del uso del “Ingenuity Pathway Analysis” (IPA, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com), una base de datos que incluye datos curados y trazables manualmente derivados de fuentes bibliográficas.

Ensayo de migración

Los ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} fueron sacrificados y se les extrajo el bazo para obtener una suspensión celular. Esta suspensión se trató con buffer de lisis de globulos rojos RBC (0,15 mol/L NH₄Cl, 1mmol/L KHCO₃, 0,1 nmol/L Na₂EDTA) y se lavó con PBS al 1% de albumina de suero bovino. Luego, las células fueron plaqueadas en una placa de Petri por 15 minutos y finalmente contadas y sometidas a un ensayo de migración. La capacidad migratoria a la quimiocina CCL19 recombinante (Prepotech) fue analizada utilizando una cámara de tipo Boyden de 48 Transwells (Neuroprobe, Inc.). Para este fin, se ubicaron en los pocillos de la cámara superior de la unidad de Transwell los esplenocitos (20.000 células por pocillo), separados de la cámara inferior por un filtro de policarbonato de 8 μ m (Nucleopore membrane, Neuroprobe). La quimiocina CCL19 recombinante (10ng/ μ l) fue agregada en los pocillos inferiores de la unidad Transwell. Todo el sistema fue incubado por 2 horas a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Luego, se removió cuidadosamente la membrana y las células en el lado superior se separaron con una hoja de afeitar. Las células pegadas del lado inferior de la membrana se fijaron con formaldehido al 2%, y la membrana fue teñida con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Las células se contaron usando un microscopio con campo fluorescente y lentes de objetivo 10X: las imágenes fueron capturadas en tres campos representativos que fueron analizados con el software CellProfiler (www.cellprofiler.com), y se anotó el número promedio de células por campo.

Obtención de biopsias de hígados humanos con diferentes patologías

Un total de 7 biopsias de hígado, 2 de pacientes no cirróticos, y 5 de pacientes cirróticos, fueron utilizadas en un estudio de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. La etiología de la cirrosis en las diferentes muestras fue diversa (cirrosis biliar primaria, atresia biliar, infección de virus de hepatitis C (HCV), hemocromatosis y criptogénica; pacientes de #1 a #5). Todos los participantes dieron su consentimiento informado para el estudio, que fue aprobado por el Comité de Ética Institucional y por el Ministerio de Salud de Buenos Aires (Número de autorización: 2919/179/2011).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción reversa (RT-qPCR)

Las muestras de tejido hepático fueron homogenizadas y el ARN fue extraído y purificado empleando el reactivo Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). El ARN total (2 µg) fue retrotranscrito utilizando la enzima transcriptasa reversa y primers oligo (dT) incluidos el kit First Strand cDNA Synthesis Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Los niveles de ARNm de las muestras de ratones fueron cuantificados por qPCR usando las sondas que se detallan en la tabla II y utilizando SYBR® Green (Invitrogen, Massachusetts, USA). Todas las amplificaciones por PCR fueron llevadas a cabo usando un ciclo de 95°C por 10 minutos y 40 ciclos bajo los siguientes parámetros: 95°C por 30 segundos, temperatura de pegado por 30 segundos y a 72° por 1 minuto. Al final de la reacción de qPCR la temperatura fue incrementada de 60°C a 95°C a una tasa de 2°C/min, y la fluorescencia fue medida cada 15 segundos para construir una curva de fusión. Los valores fueron normalizados a los niveles del transcripto de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, usado como control interno). Los datos fueron procesados por el método de $\Delta\Delta Ct$. La cantidad relativa de producto de PCR amplificado de células no tratadas fue definido como 1. Un control sin templado (NTC) fue corrido en cada ensayo, y todas las determinaciones se realizaron en triplicado en dos o tres experimentos separados. Los resultados fueron descriptos como unidades arbitrarias (UA) relativizadas a controles.

Tabla II: Primers qPCR

Gen Objetivo	Primer Sentido	Primer Antisentido
SPARC ratón	5'-CCACACGTTTCTTTGAGACC-3'	5'-GATGTCCTGCTCCTTGATGC-3'
COL1A2	5'-CCTACATGGACCAGCAGACTG -3'	5'- GGAGGTCTTGGTGGTTTTGTA -3'
TGF- β 1	5'-CCACTCGCTTCTTTGAGACC-3'	5'-TAGTGGAAAGTGGGTGGGGAC-3'
PCNA	5'-AAAGATGCCGTCGGGTGAAT-3'	5'-TTCCATTGCCAAGCTCTCC-3'
IGF-1	5'-CAGTTCGTGTGTGGACCAAG-3'	5'-GTCTTGGGCATGTCAGTGTG-3'
HGF	5'-GGCTGAAAAGATTGGATCAGG-3'	5'-CCAGGAACAATGACACCAAGA-3'
IL6	5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA -3'	5'-TCCACGATTTCCAGAGAAC -3'
SPARC humano	5'-AAACCGAAGAGGAGGTGGTG-3'	5'-GCAAAGAAGTGGCAGGAAGA-3'
GAPDH	5'-CATCTCTGCCCCCTCTGCTG -3'	5'-GCCTGCTTACCACCTTCTTG-3'

Análisis histológico e inmunotinciones

Los hígados fueron inmersos en 10% de buffer fosfato formalina. Los tejidos fijados fueron incluidos posteriormente en parafina y seccionados (5 μ m). Para el análisis mediante tinción inmunohistoquímica y la cuantificación de la expresión de PCNA, se desparafinizaron los cortes, se rehidrataron y se sometieron a una recuperación antigénica con buffer citrato (pH=6). El peróxido endógeno fue bloqueado con 0,5% H₂O₂ en metanol. El tejido fue posteriormente incubado con el anticuerpo de conejo anti-ratón policlonal de PCNA (1:100, Santa Cruz Biotechnology, TX). Luego de un lavado minucioso, los portaobjetos se incubaron con un anticuerpo secundario anti-mouse hecho en cabra biotinilado enlazado a peroxidasa durante 1 hora, luego lavados e incubados con un complejo avidina-peroxidasa. Los portaobjetos luego se lavaron dos veces con PBS y dos veces con 0,1 M buffer acetato. Posteriormente, se incubaron con una solución de 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St Louis, USA), sulfato de níquel amonio (Aldrich, St Louis, USA) y H₂O₂ hasta que se divisó la señal. Para los portaobjetos controles, se omitió la incubación con el anticuerpo primario. Por último, se realizó el análisis cuantitativo del área positiva para PCNA y los resultados fueron expresados como número de núcleos positivos. La inmunohistoquímica para CD4 se describe en la parte I de la sección de materiales y métodos.

Algunas muestras hepáticas recolectadas fueron sumergidas en formalina al 10% en buffer fosfato. El tejido fijado fue incluido en parafina, seccionado (5 µm) y teñido con:

-Hematoxilina-eosina (H&E): se extrajo la parafina del tejido mediante dos pasajes de 10 minutos cada uno en xilol (Biopack) y se hidrató en agua. Se incubó con una solución de hematoxilina por 40 segundos. Se lavó con agua corriente hasta viraje de la tinción. Para deshidratar el tejido se lavó en etanol 70% y 3 minutos en alcohol 96%. Se realizó una contratinción con solución de eosina alcohólica durante 5 minutos. Se eliminaron los restos de eosina con etanol 70%. Se deshidrató y aclaró en xilol y se montó con bálsamo de Canadá (Biopack, Buenos Aires, Argentina).

-Tricrómico de Masson: se extrajo la parafina del tejido mediante dos pasajes de 10 minutos en xilol y se lavó con agua destilada por 5 minutos. Se incubó con una solución de hematoxilina férrica de Weigert por 10 min. Se lavó en flujo de agua corriente por 5 minutos. Se incubó con rojo Masson (Fucsina ácida 0,4% m/v, Rojo Biedbric 1,6% m/v, Sigma-Aldrich, B6008). Se lavó con agua destilada. Se trató con solución acuosa de ácido fosfotúngstico (1% m/v en agua destilada), durante 15 minutos. Se lavó con agua destilada. Se tiñó con solución verde luz (Verde Luz 0,3% m/v, Acético Glacial 0,3% v/v en agua destilada) durante 5 minutos. Se lavó en solución de ácido acético al 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se deshidrató mediante un pasaje de 30 segundos en etanol 70%, 30 segundos en etanol 96% y 30 segundos en etanol 100%, se aclaró en xilol y se montó con bálsamo de Canadá.

-Rojo Sirio: se extrajo la parafina del tejido mediante dos pasajes en xilol durante 10 minutos. Se incubó durante 1 hora con rojo sirio (rojo sirio 0,1% m/v; Sigma Aldrich 365548) en ácido pícrico saturado. Se lavó dos veces en ácido acético glacial al 0,005% en agua destilada. Se deshidrató mediante dos pasajes de 30 segundos en etanol 100%. Se aclaró en xilol y se montó con bálsamo de Canadá.

El puntaje de Knodell se utilizó para evaluar la severidad del proceso necroinflamatorio y la fibrosis (Knodell et al., 1981). La evaluación de los preparados fue realizada por un patólogo experto sin tener conocimiento de los diferentes tratamientos durante el análisis.

Para el análisis de expresión de SPARC, α -SMA y Von Willebrand por inmunofluorescencia, se perfundieron ratones con 4% de paraformaldehído y se fijaron los hígados por 90 minutos para luego ubicarlos en soluciones crecientes de sacarosa del 10 al 20%. Se incluyeron las muestras en

un medio de montaje para congelación (Cryoplast, Biopack, Buenos Aires, Argentina) y se seccionaron en criostato a 12 μm de espesor. Luego de 1 hora de incubación del tejido en buffer de bloqueo (5% suero de burro, Jackson ImmunoResearch, PA, USA, 1% BSA, 0,3% Tritón-X en 1xPBS; temperatura ambiente), se incubó toda la noche con un anticuerpo monoclonal anti-SPARC de ratón (1:150, 0,1% BSA, 0,3% Tritón-X, 0,02% azida sódica en PBS, 4°C; R&D, MN, USA), junto al anticuerpo policlonal anti-ratón α -SMA de conejo (1:75; ab5694, Abcam, MA, USA) o con el anticuerpo policlonal anti- factor de Von Willebrand de conejo (vWF; 1:215; Sigma, MO, USA). Luego de un lavado minucioso, el tejido fue incubado con un anticuerpo secundario IgG anti-rata hecho en burro y conjugado a Cy3 y con un anticuerpo IgG anti-conejo hecho en burro conjugado a FITC (1:450; 1% BSA en PBS, por 2 horas, a temperatura ambiente; Jackson ImmunoResearch). Las imágenes fueron capturadas usando un microscopio confocal láser Nikon C1.

Para el análisis de expresión de α -SMA mediante tinción por inmunohistoquímica, las secciones de tejido hepático fueron desparafinizadas, rehidratadas y calentadas con buffer citrato (pH=6) en microondas. La peroxidasa endógena fue bloqueada con 3% H_2O_2 en etanol al 95%. Luego, se bloquearon la biotina y avidina endógena de las secciones (Blocking kit, Vector Laboratories Inc.) y los sitios de pegado no específico del anticuerpo primario (1% BSA-PBS). El tejido se incubó con el anticuerpo policlonal α -SMA anti-ratón hecho en conejo (1:100; Abcam). Luego de un lavado extensivo, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo secundario anti conejo hecho en cabra biotinilado conjugado a peroxidasa por 2 horas, lavados y luego incubados en complejo AB (Vector, CA, USA). A continuación fueron lavados dos veces con PBS y dos veces con buffer acetato 0,1 M. Luego se incubaron con una solución de 3,3-diaminobenzidina (DAB; Sigma), amonio níquel sulfato (Aldrich, St Louis, USA) y H_2O_2 hasta que se desarrolló la señal. El análisis cuantitativo del área inmunoreactiva de α -SMA se realizó por análisis morfométrico computarizado (CMA). Alrededor de 80 imágenes sacadas con microscopio lumínico (200X) por espécimen fueron capturadas y analizadas usando un sistema de detección de umbral de color desarrollado con el software ImageJ (NIH, USA). Los resultados fueron expresados como porcentaje de área positiva.

Cuantificación del contenido de colágeno hepático y maduración de fibras de colágeno

El análisis cuantitativo del contenido de colágeno se realizó por un análisis morfométrico computarizado de muestras teñidas con rojo Sirio. Con este propósito se gestaron aleatoriamente 80 imágenes con el microscopio lumínico (200X) por corte, exceptuando las zonas de venas centrolobulillares grandes y tractos portales grandes ($\geq 150 \mu\text{m}$). Las imágenes se analizaron usando un sistema de umbral de detección de color desarrollado en el software ImageJ (National Institute of Health). Los valores se expresaron como porcentaje de fibras positivas por área. Para evaluar el grado de empaquetamiento de las fibras de colágeno y su estado de maduración, las secciones de hígado se examinaron con un microscopio Olympus BX60 (Olympus, Tokio, Japón) de luz polarizada.

Electroforesis en geles diferenciales de dos dimensiones (2D difference gel electrophoresis, 2DDIGE).

Todas las determinaciones proteómicas se realizaron en el Centro de Investigaciones de Medicina Aplicada (CIMA), un afiliado de ProteoRed, del Instituto Nacional de Entidades Proteómicas. Los extractos proteicos se obtuvieron de animales tratados con TAA por 10 semanas (n=4) o no tratados (n=4). Las muestras se solubilizaron en buffer 2DDIGE: 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, y 30 mM Tris, tamponado a pH 8. La concentración de proteínas se determinó usando el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hércules, CA). Se tomaron 50 μg de proteína, se etiquetaron con 400 pmoles de tinción mínima CyDye DIGE Fluor (GE Healthcare, Madrid, España) y se incubó a 4C en oscuridad por 30 minutos de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para marcar las muestras se utilizaron las tinciones fluorescentes Cy3 y Cy5. Una mezcla compuesta por cantidades iguales de las proteínas de todas las muestras se marcaron con Cy2 para utilizarse como control interno. Las muestras pareadas para comparar fueron etiquetadas en cada réplica con una combinación diferente de la tinción para prevenir un sesgo potencial por etiquetado. La reacción de marcación fue interrumpida por la adición de 1 μl de lisina 10 mM y se incubó en hielo por 10 minutos. Se cargaron las muestras en tiras con un gradiente de pH inmovilizado (24 cm de largo, pH 3-11 NL, de GE Healthcare, Madrid, España), y se sometieron a un isoelectroenfoco (IEF) en un sistema IPGphor isoelectro-focusing (GE Healthcare, Madrid, España) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Al finalizar el IEF,

las tiras fueron incubadas 15 minutos en buffer de equilibrio (50 mM Tris-HCl de pH 8,8, 6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS, y una traza de azul de bromofenol) conteniendo ditiotreititol al 0,5%, y subsecuentemente se dejaron en buffer de equilibrio con 4,5% de iodoacetamida. Para la segunda dimensión, las tiras fueron cargadas en un gel de 12,5% de poliacrilamida y corridas, a 1 W/gel por 12-14 h, hasta que el azul de bromofenol llegara al final del gel. Posteriormente, se escanearon los geles en 2D usando un Typhoon Trio Imager (GE Healthcare, Madrid, España) a una resolución de 100λ con $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ de 488/520 nm por Cy2, 532/580 nm por Cy3, y 633/670 nm por Cy5. Se configuró el tubo fotomultiplicador para asegurarse que la máxima intensidad de pixeles estuviera entre 90,000 y 99,000 pixeles. El análisis de la imagen se realizó con el software DeCyder 6.5 (GE Healthcare, Madrid, España) siguiendo las especificaciones en el manual de usuario y como se describe a continuación. Se utilizó el módulo de análisis diferencial en gel (DIA) para la detección de *dots*, cuantificación del volumen de *dots* y para la normalización de la proporción de volúmenes de diferentes muestras en el mismo gel. Se utilizó el módulo de análisis de variación biológica (BVA) para aparear *dots* de proteínas en diferentes geles y para identificar *dots* de proteínas con diferencias sustanciales. En el módulo BVA se realizó edición manual para asegurarse que los *dots* estuvieran correctamente apareados en los diferentes geles y para remover rayas y manchas. Los *dots* expresados diferencialmente se consideraron para el análisis de espectrometría de masas (MS) si su valor de p correspondiente al test de t era menor a 0,05. Los geles preparativos se corrieron con 350 μg de proteína. Las proteínas se visualizaron tiñendo con SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Bio-Rad, Hercules, CA), y las imágenes se adquirieron con un Typhoon Trio Imager usando una $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ de 532/560 nm. Se cortaron los *dots* manualmente, y se procesaron con una estación MassPrep (Waters, Saint-Quentin, Francia) (Santamaria et al., 2003). La digestión trípica se realizó con 12,5 ng/ μl de tripsina en 50 mM de bicarbonato de amonio por 12 horas a 37 °C. Los péptidos resultantes se extrajeron con 5% de ácido fórmico y 50% de acetonitrilo. Las muestras se concentraron en un Speed-vac antes del análisis por MS.

Análisis por cromatografía líquida (LC)- ionización por electoespray (ESI)- espectrometría de masas en tandem (MS/MS)

La cromatografía líquida microcapilar en fase reversa se realizó con un sistema capilar CapLC (Waters, Saint-Quentin, Francia). La separación en fase reversa del producto de la digestión con tripsina se realizó con una columna de sílica capilar Atlantis, C18, 3µm, 75 µmx10cm Nano Ease (Waters, Saint-Quentin, Francia) tamponada con 5% acetonitrilo y 0,2% de ácido fórmico. Luego de la inyección de 6 µl de muestra, se lavó la columna por 5 minutos con las mismas soluciones tamponadas, y los péptidos fueron eluidos usando un gradiente lineal de 5-50% de acetonitrilo en 30 minutos y a una tasa de flujo de 0,2 µl/min. La columna fue acoplada en línea con un Q-TOF Micro (Waters, Saint-Quentin, Francia) usando una fuente de ionización de nanospray PicoTip (Waters, Saint-Quentin, Francia). La temperatura capilar se incrementó a 80°C y el voltaje de spray fue de 1,8-2,2 kV. Los datos de MS/MS fueron compilados en forma automática, en un modo dato-dependiente. Los tres iones más intensos en cada estudio de escaneo fueron secuencialmente fragmentados por disociación inducida por colisión (CID) usando un ancho de aislamiento de 2,5 y una energía de colisión relativa del 35%. El procesamiento de los datos se realizó con el software MassLynx 4.0. La búsqueda en base de datos se realizó con ProteinLynx Global Server 2.1 (Waters) y Phenyx 2.2 (GeneBio, Geneva, Suiza) contra Uniprot Knowledgebase Release 12.3 (UniprotKB/Swiss-Prot Release 54.3 y UniprotKB/TrEMBL Release 37.3). La búsqueda fue acotada para cortes con tripsina y se permitió un error de un solo sitio no reconocido de clivaje (Folio et al., 2009).

Actividad Catalasa

La actividad catalasa se midió como fue descrito por Beers et al (Beers and Sizer, 1952). Para ello se monitorizó espectrofotométricamente la desaparición de catalasa a 240 nm. Primero se homogenizaron los hígados por sonicación y se diluyó el homogenato según la relación 300 µl de buffer fosfato de potasio (KH₂PO₄) 50 mM pH 7 cada 20 mg de tejido. Luego se centrifugó el homogenato a 14000 rpm durante 25 minutos. Se preparó una solución de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) 0,036% en buffer fosfato de potasio y se determinó la absorbancia (Figura 6). Para cada muestra se colocó una alícuota de sobrenadante en una solución 0,036% de H₂O₂ en buffer y se

midió la pendiente de la curva de consumo de peróxido de hidrogeno durante 2 minutos. A partir de ese valor se calcularon las unidades enzimáticas de catalasa por mg de tejido y se relativizó al control.

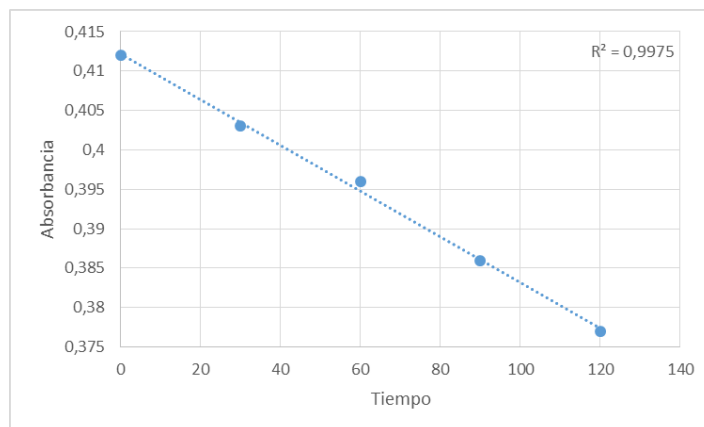


Figura 6 Curva representativa de consumo de peróxido de hidrógeno durante 2 minutos en presencia de dilución de homogenato hepático

Aislamiento de hepatocitos y evaluación del estrés oxidativo

Los hepatocitos fueron aislados de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} por perfusión local del hígado con colagenasa. Se perfundió el hígado con buffer de lavado (*Hank's balance salt solution*) a través de la vena porta y por medio de una cánula, seccionando la vena cava para evacuar la sangre y las soluciones. Posteriormente, se digirió con colagenasa de *Clostridium histolyticum* (SIGMA, St Louis, USA, 5 mg por ratón) durante 15 minutos y se extrajo el hígado. Luego de remover las células de la cápsula, se recolectaron, filtraron y centrifugaron a 200g. Finalmente se lavaron y plaquearon en DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB. Después de 3 horas, se cambió el medio removiendo las células en suspensión y quedando los hepatocitos adheridos a la placa de cultivo. Se cultivaron los hepatocitos en DMEM al 10% de suero fetal bovino durante 48 h. Los hepatocitos se trataron con 100 mM TAA por 3 o 24 horas. Luego de incubar los hepatocitos en DMEM utilizando dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH-DA) 5 μ M por 30 minutos a 37 °C con 5% CO₂ (Franco et al., 2006), se detectó el nivel de estrés oxidativo por citometría de flujo.

Carbonilación de proteínas

Se homogeneizaron las muestras hepáticas en urea 7M, CHAPS 4%, EDTA 1 mM y Tris 50 mM, pH 7,5. Los extractos citosólicos se obtuvieron por ultracentrifugación a 100000xg por 1 h a 10°C. Se midió la concentración de proteínas con un kit de ensayo de Bradford (BioRad) y se mezclaron 25 µg de proteína con un mismo volumen de 12% SDS e incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos. La carbonización de proteínas fue medida con el kit de detección para oxidación de proteínas OxyBlot™ siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó la electroforesis y el *blotting* de las muestras (Sanchez-Quiles et al., 2011). La membrana fue bloqueada con 5% DPBST-BSA por 1 h. Se diluyó el anticuerpo primario 1/75 en el mismo buffer y la incubación fue de 14 horas a 4°C. Luego de 5 minutos de lavados con DPBST, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (cabra, anti conejo IgG HRP, Sigma Aldrich) en una dilución 1/5000 en DPBST-BSA. La inmunoreactividad fue visualizada por quimioluminiscencia mejorada (Perkin Elmer).

Cuantificación de los niveles hepáticos de óxido nítrico mitocondrial

Los hígados se homogeneizaron en buffer MSHE (225 mM manitol, 70 mM sacarosa, 1 mM EGTA, 25 mM HEPES), pH 7,4 con 5 µg/ml de aprotinina (Sigma, St Louis, USA), leupeptina (SIGMA, St Louis, USA) y 0,1% de albumina de suero bovino. Los homogenatos fueron centrifugados a 700g a 4°C por 10 minutos; el sobrenadante fue centrifugado a 7000 g por 10 minutos. El pellet mitocondrial se purificó usando un gradiente de Percoll para remover completamente la contaminación de organelas y mitocondrias rotas. La contaminación de las mitocondrias purificadas fue evaluada comparando la actividad de la enzima lactato dehidrogenasa (marcador citosólico) con la actividad de la enzima succinato-citocromo c reductasa (marcador mitocondrial); se encontró una contaminación mínima (del 2 al 5%)(Carreras et al., 2004). Se incubaron las mitocondrias (1 mg de proteína por ml) en PBS por 30 minutos a 37 °C con 5% CO₂, 10 M 4-Amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína (DAF-FM), y 0,5 M MitoTracker. Se midió la fluorescencia con un citómetro Ortho-Cytoron Absolute (Johnson and Hohnson) (Franco et al., 2006; Lopez-Figueroa et al., 2000).

Microscopia electrónica

Se administró a ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} una dosis de Con A y a las 6 h se obtuvieron muestras de tejido hepático que fueron rápidamente lavadas en buffer fosfato y fijadas en glutaraldehído al 3%. Luego de 2-3 minutos, las muestras fueron cortadas en piezas de 1-mm³ y se agregó glutaraldehído al 3% fresco. Luego de un enjuague, las muestras fueron fijadas en OsO₄, enjuagadas y deshidratadas, para luego ser incluidas en Epon 812, una resina epoxi, antes de cortar secciones ultrafinas (de aproximadamente 50 nm), que luego fueron observadas en un microscopio electrónico Hitachi H-7000 (Hitachi, Tokyo, Japón).

Utilización de O₂ mitocondrial y actividad de transferencia de electrones

La actividad del complejo I (NADH: ubiquinona reductasa) se midió analizando la reducción de 50 μ M 2,3-dimetoxi-6-metil-1,4-benzoquinona en presencia de 1 mM KCN y 200 μ M de NADH como donante de electrones a 340 nm con un espectrofotómetro Hitachi U3000 a 30°C. La actividad de los complejos II-III se determinó por la reducción del citocromo c a 500 nm. La actividad citocromo oxidasa (complejo IV) se determinó monitorizando la oxidación del citocromo c a 550 nm (ϵ_{550} , 21 mM⁻¹.cm⁻¹); la tasa de reacción se midió como la constante de reacción de pseudo-primer orden (k') y se expresó como nmoles/min.mg de proteína (K'/min.mg de proteína para el complejo IV) (Carreras et al., 2004; Riobo et al., 2002).

Determinación de transaminasas hepáticas

Se obtuvo sangre de los animales a través del seno retro-orbital. Para obtener el suero la sangre se centrifugó por 10 min a 3000 rpm. Posteriormente, los sueros se guardaron a -20°C hasta su uso. Se midieron los niveles de las transaminasas hepáticas ALT y AST usando un autoanalizador ARCHITECT® (Abbott).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron expresados como promedios \pm SEM cuando fue apropiado. El análisis estadístico fue realizado usando test de Student o Mann-Whitney, de acuerdo a la distribución. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

Resultados

Parte I

Inducción de la expresión de SPARC durante el daño hepático agudo

Se analizaron mediante qPCR cambios en los niveles de expresión del ARNm de SPARC en modelos *in vivo* de falla hepática aguda en diversos modelos experimentales en ratones. Observamos sobre-expresión de SPARC a nivel hepático a las 24 horas en los modelos experimentales estudiados: Con A, Jo2 y D-galactosamina/LPS. La expresión de SPARC en el modelo de Con A se incrementó $2,6 \pm 0,2$ veces ($p < 0,05$), en el modelo de Jo2 aumentó $4,7 \pm 0,4$ veces ($p < 0,01$), y en el modelo de D-galactosamina/LPS el aumento fue de $4,1 \pm 0,3$ veces ($p < 0,05$, Figura 7A). Por el contrario, en los ratones no tratados (control, tratados con solución salina) la expresión de SPARC fue casi indetectable. Estos datos demuestran que la inducción de la expresión de SPARC no es modelo-dependiente y que se observa en todos los modelos experimentales estudiados.

Empleando un anticuerpo monoclonal anti-SPARC de ratón, y de manera consistente con los resultados obtenidos por qPCR, observamos mediante tinción inmunohistoquímica que SPARC se sobre-expresa en tejido hepático tras la injuria inducida por Con A, siendo esta expresión mayor luego de 24 horas de administrada la lectina. El patrón de localización de SPARC coincide con la localización de las LSEC, de reconocida capacidad para producir SPARC frente a diversos estímulos (Figura 7B) (Sage et al., 1984; Sage et al., 1981).

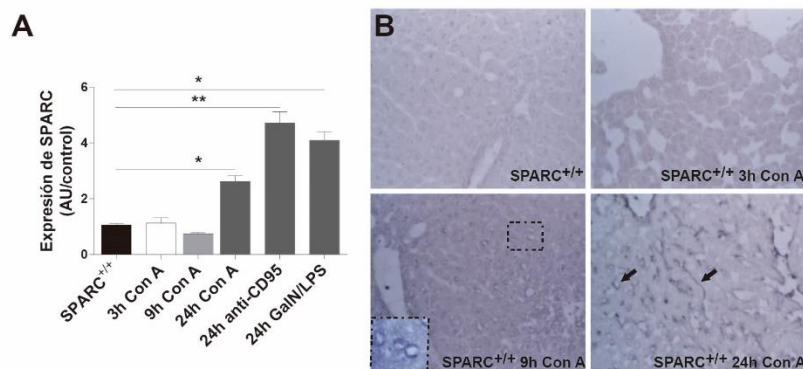


Figura 7 (A) qPCR en muestras de tejido hepático proveniente de ratones tratados con Con A, GalN/LPS o anti-CD95. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs SPARC^{+/+}, test de Dunn. (B) Inmunohistoquímica para SPARC en muestras de tejido hepático provenientes de ratones tratados con Con A a diferentes tiempos. Flechas: localización sinusoidal de SPARC (200x, n=3).

Posteriormente, nos preguntamos si la expresión de SPARC podría también inducirse en diferentes afecciones hepáticas en muestras provenientes de pacientes. Se realizó qPCR en muestras de hepatitis alcohólica (AH), hepatitis crónica por virus C (HCV) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Se observó así una elevación significativa de la expresión de SPARC únicamente en muestras de pacientes con diagnóstico de hepatitis alcohólica aguda y no hubo cambios significativos en la expresión de SPARC en otras patologías crónicas como HCV o NASH ($2,9 \pm 0,2$ en pacientes con AH, $0,6 \pm 0,05$ para HCV y $0,5 \pm 0,05$ para NASH, $p < 0.01$, Figura 8).

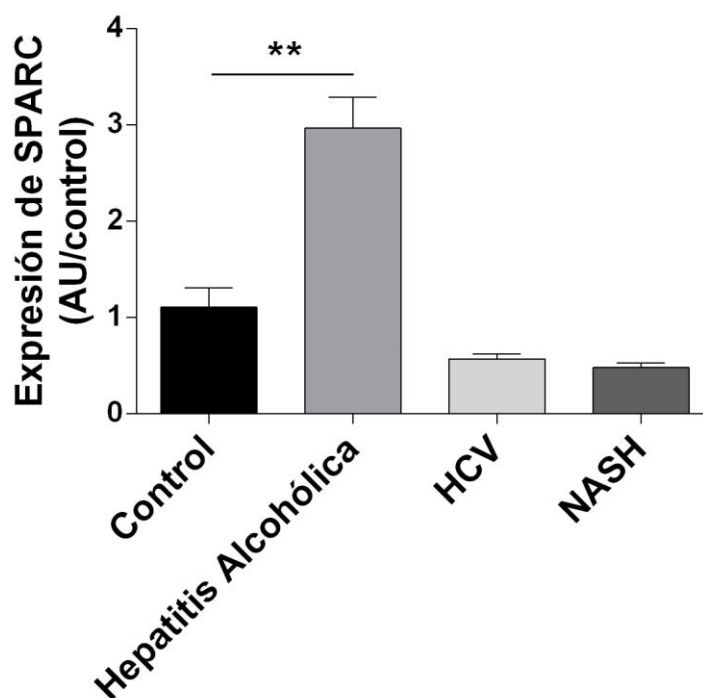


Figura 8 Expresión del ARNm de SPARC en muestras hepáticas de pacientes con diversas patologías. Expresión de ARNm de SPARC en humanos medido por qPCR. ** $p < 0.01$ (Hepatitis Alcohólica n=34, HCV n= 5, NASH n=10, Control n=6)

Disminución del daño hepático agudo en ratones deficientes de SPARC

Posteriormente, y dado que SPARC se induce bajo distintas condiciones patológicas experimentales, estudiamos si la ausencia de SPARC propia de los ratones SPARC^{-/-} afecta el proceso de muerte de hepatocitos que se desarrolla durante el daño agudo asociado a la inyección de Con A, anti-CD95 o GalN/LPS. A las 24 horas de inyectar Con A (Figura 9A), anti-CD95 (Figura 9B) o GalN/LPS (Figura 9C) se observó que los ratones SPARC^{+/+} presentaban extensas áreas de necrosis y distorsión de la histoarquitectura hepática. Además, en el modelo de Con A y GalN/LPS se observó un intenso infiltrado inflamatorio. Estos hallazgos patológicos se vieron notablemente reducidos en los hígados de los animales SPARC^{-/-} en los diferentes modelos experimentales estudiados. En concordancia con estas observaciones histopatológicas, se encontró un incremento de los niveles de las transaminasas hepáticas AST y ALT (que denotan necrosis de hepatocitos) en ratones SPARC^{+/+} en comparación con ratones SPARC^{-/-} cuyos valores fueron significativamente menores (ALT (UI/L): 8.710±484 SPARC^{+/+} 24h Con A vs. 693,3±385,0 SPARC^{-/-} 24h Con A, p<0.05; AST (UI/L): 12.310±1158 SPARC^{+/+} 24 h Con A vs. 1.020±287,9 SPARC^{-/-} 24h Con A, p<0,05). Este hallazgo fue también observado en los otros modelos de daño hepático agudo estudiados. Para el modelo de Jo2 los ratones SPARC^{+/+} alcanzaron niveles de ALT (UI/L) de 3.012±338,7 y los SPARC^{-/-} niveles de 1.384±383,8 (p<0,05) y para AST (UI/L) los ratones SPARC^{+/+} alcanzaron niveles de 2.047±272,4 y los SPARC^{-/-} 720,0±164,6 UI/L (p<0,01). Para el modelo de GalN/LPS los ratones SPARC^{+/+} alcanzaron niveles de ALT (UI/L) de 4.815±1449 mientras que los SPARC^{-/-} alcanzaron niveles de 663,3±494,2 (p<0,05). Estos resultados ponen de manifiesto que la ausencia de SPARC se asocia a una menor necrosis hepatocitaria inducida tanto por Con A como por anti-CD95 y GalN/LPS.

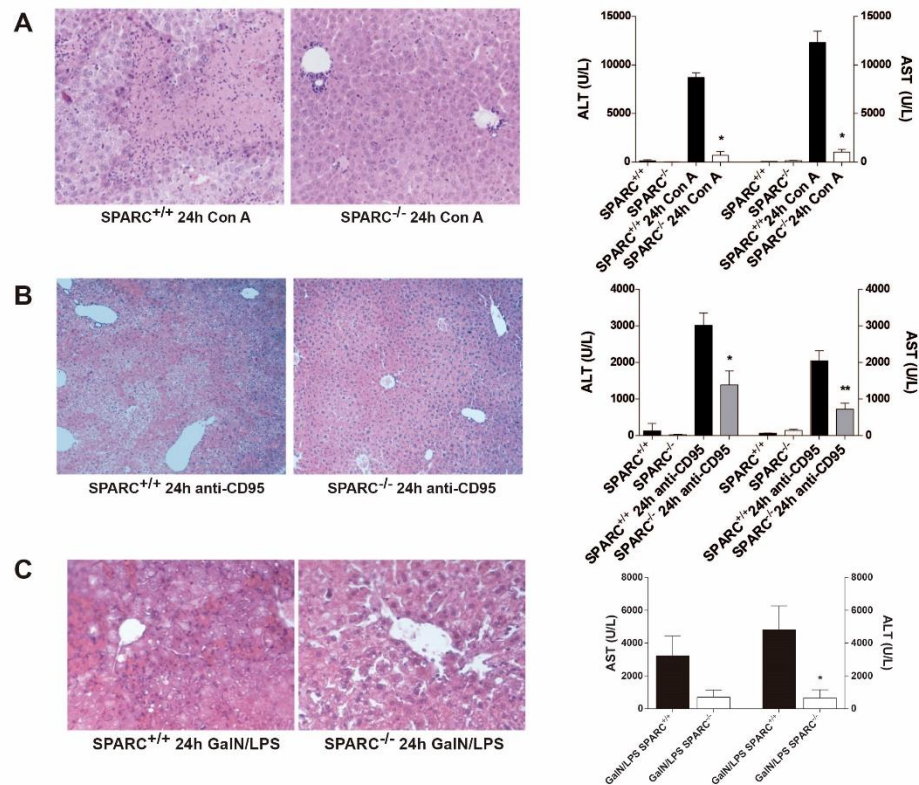


Figura 9 Protección en animales SPARC^{-/-} ante el daño hepático agudo

(A) H&E (400x). Niveles séricos de AST y ALT (UI/L); $p < 0.05$ SPARC^{-/-} 24 h con A vs. SPARC^{+/+} 24 h con A, Mann Whitney test. (B) H&E (200x). Niveles séricos de AST y ALT tras administración de anti-CD95. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ SPARC^{-/-} 24h con A vs. SPARC^{+/+} 24 h anti-CD95, Mann Whitney test (C) H&E (400X). Niveles séricos de AST y ALT tras administración i.p. de GalN/LPS vs. SPARC^{+/+} 24 h GalN/LPS, test de Mann Whitney.

Posteriormente, nos preguntamos si los animales heterocigotas para SPARC, con la mitad de la dotación genética para SPARC, podrían también estar protegidos frente al daño y en qué magnitud. Cuando los animales heterocigotas para SPARC (SPARC^{+/-}) fueron tratados con Con A (15 $\mu\text{g/g}$) se observó menor nivel de daño en comparación con los ratones SPARC^{+/+} tratados con Con A (Figura 10A-B). Asimismo, la inducción de SPARC fue menor en los ratones SPARC^{+/-} tratados con Con A que en los ratones SPARC^{+/+} ($4,8 \pm 0,3$ SPARC^{+/+} vs. $1,2 \pm 0,1$ SPARC^{+/-}, $p < 0,0001$) Posteriormente, decidimos estudiar si el restablecimiento de la expresión de SPARC en ratones SPARC^{-/-} empleando un vector adenoviral que expresa una secuencia sentido para SPARC (AdsSPARC) podía conferir una “re-sensibilización” al daño inducido por Con A. El análisis de PCR mostró que en los ratones SPARC^{-/-} que recibieron el vector AdsSPARC existió una restitución de la expresión de SPARC, en comparación

con los que recibieron el vector control Ad β Gal (Figura 10C). Como se puede observar en la figura 10D, la administración del vector AdSPARC en tejido hepático de los animales SPARC^{-/-} se asoció a un restablecimiento de la susceptibilidad al daño hepático, observándose la presencia de áreas de necrosis e infiltrado inflamatorio, aunque en una menor magnitud a la observada en los animales SPARC^{+/+}.

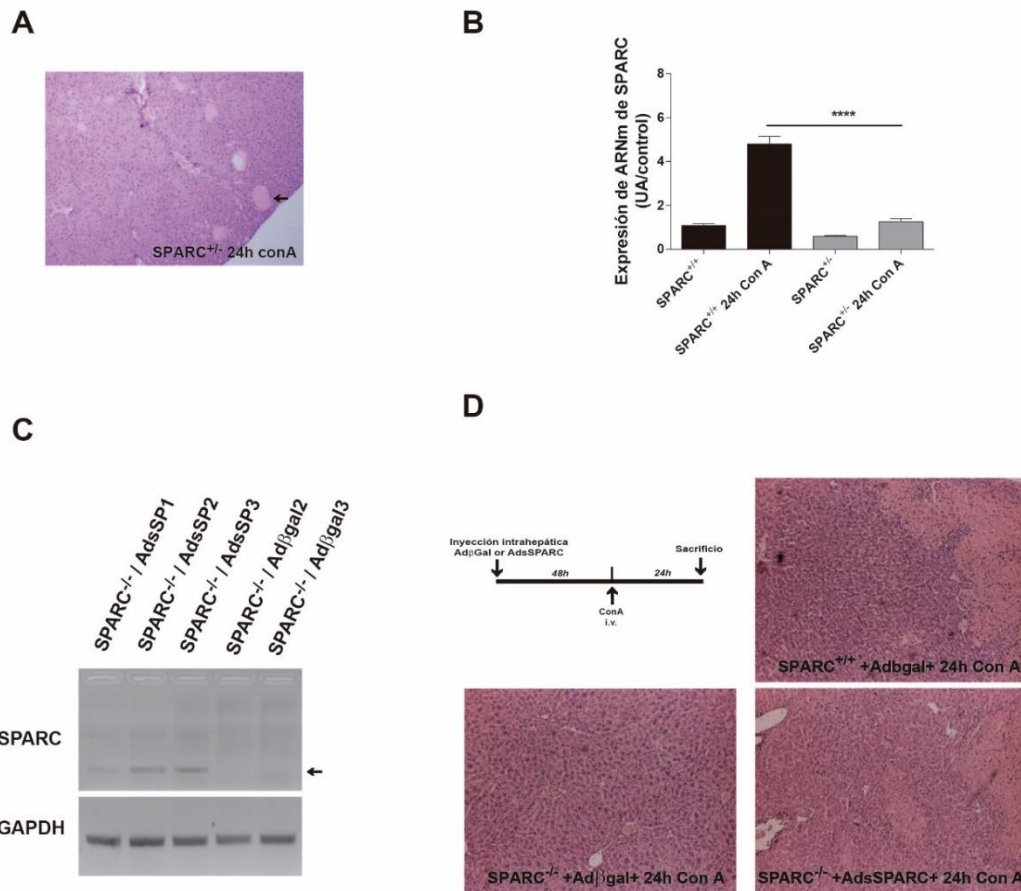


Figura 10 Daño en ratones heterocigotas para SPARC y restitución de la sensibilidad a la toxicidad por Con A en ratones SPARC^{-/-} que reciben un vector adenoviral que expresa SPARC. (A) Figuras representativas de H&E de secciones de hígados de ratones SPARC^{-/-} tratados 24 horas con Con A (X100) (B) Análisis de qPCR de muestras de hígado de animales no tratados, tratados con Con A SPARC^{+/+}, no tratados SPARC^{-/-} y tratados con Con A SPARC^{-/-} (C) PCR donde se confirma la inducción de la expresión de SPARC en ratones SPARC^{-/-} que reciben el adenovirus que expresa SPARC (D). Modelo experimental y tinción por H&E de ratones SPARC^{+/+} que reciben Con A y un vector adenoviral control, ratones SPARC^{-/-} que reciben Con A, y ratones SPARC^{-/-} que reciben Con A y el vector adenoviral que expresa SPARC. SPARC

A continuación estudiamos los mecanismos de protección que presentan los ratones SPARC^{-/-} y especialmente en el modelo de Con A. Para caracterizar el tipo de infiltrado inflamatorio que se genera tras la administración de Con A, se realizó una tinción inmunohistoquímica para linfocitos T CD4⁺, ya que esta subpoblación participa en el modelo fisiopatológico del daño por Con A. Como se observa en los animales SPARC^{-/-} existe una disminución significativa de la presencia de esta subpoblación linfocitaria en el infiltrado inflamatorio (21,3±2,6 SPARC^{+/+} 24h Con A vs. 12,4±1,3 SPARC^{-/-} 24h Con A; p<0,05, Figura 11A-C). Estos hallazgos se confirmaron mediante análisis por citometría de flujo al cuantificar las células CD4⁺ provenientes de células mononucleares intrahepáticas (9,5±0,5% SPARC^{+/+} 24h Con A vs. 3,4±0,6% SPARC^{-/-} 24h Con A; p<0,05, Figura 11D).

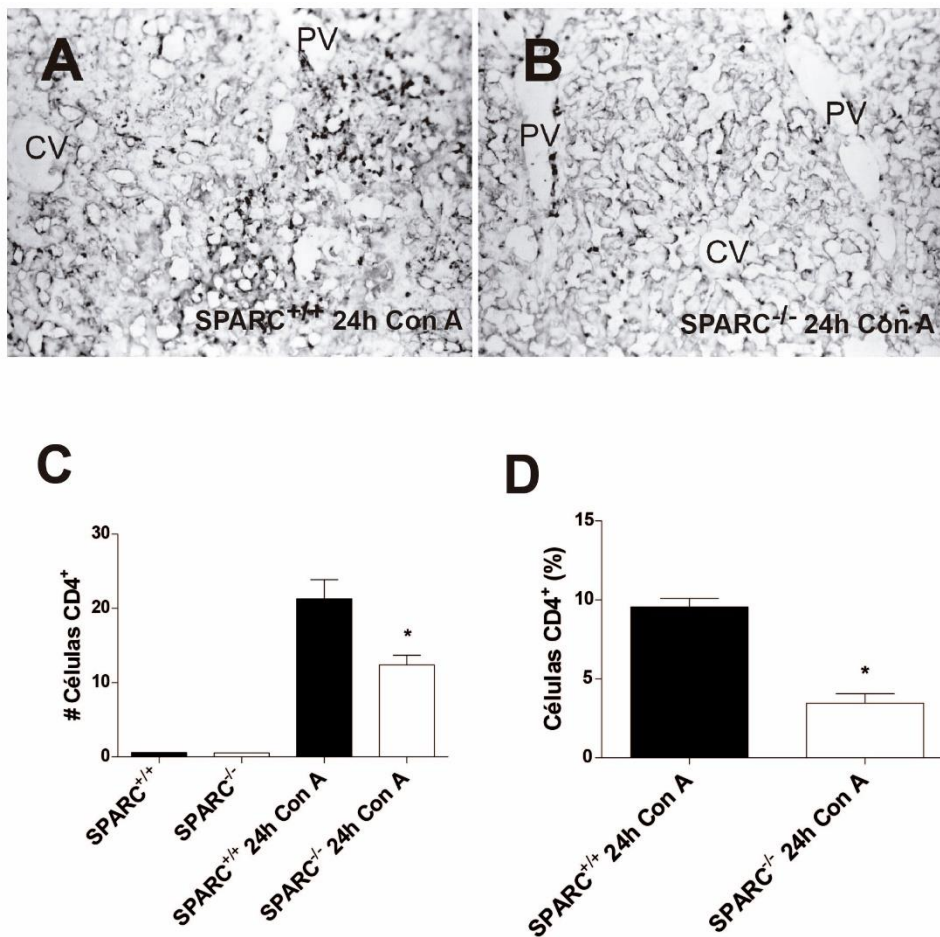


Figura 11 Reducción de la magnitud del infiltrado inflamatorio hepático en animales SPARC^{-/-}. (A, B) Inmunohistoquímica para células T CD4⁺ (100x). (C) Cuantificación del área positiva para células CD4⁺. *p<0.05 SPARC^{-/-} 24h Con A vs. SPARC^{+/+} 24h con A, test de Mann Whitney. (D) Citometría de flujo para células CD4⁺ provenientes del hígado. *p<0.05, test de Mann Whitney.

Debido al rol fundamental de diversas citoquinas en la fisiopatología del daño hepático agudo inducido por Con A, analizamos la presencia de citoquinas proinflamatorias tras la inyección de Con A. Los niveles de TNF- α e IL-6 medidos por ELISA en el suero de los animales fueron significativamente menores en ratones SPARC $^{-/-}$ en comparación con los animales SPARC $^{+/+}$, tanto a las 3 h ($168,8 \pm 12,4$ SPARC $^{+/+}$ vs. $103,9 \pm 10,1$ pg/ml TNF- α SPARC $^{-/-}$; $p < 0,05$) y las 9 h ($878,4 \pm 518,5$ SPARC $^{+/+}$ vs. $302,9 \pm 226,6$ pg/ml IL-6 SPARC $^{-/-}$; $p < 0,05$) post inyección, respectivamente (Figura 12A). Además, se observó una atenuación de la inducción de los niveles de ARNm de TGF- β 1 medidos por qPCR en los hígados de ratones SPARC $^{-/-}$ en comparación con el grupo de ratones SPARC $^{+/+}$ luego de 9 h ($2,2 \pm 0,3$ SPARC $^{+/+}$ vs. $0,7 \pm 0,07$ SPARC $^{-/-}$; $p < 0,0001$) y 24 h ($8,6 \pm 1,6$ SPARC $^{+/+}$ vs. $1,8 \pm 0,4$ SPARC $^{-/-}$; $p < 0,05$) post inyección de Con A. (Figura 12A). Estos efectos se acompañaron de una disminución significativa en la magnitud de los eventos apoptóticos evidenciados con la técnica de TUNEL en ratones SPARC $^{-/-}$ (Figura 12B).

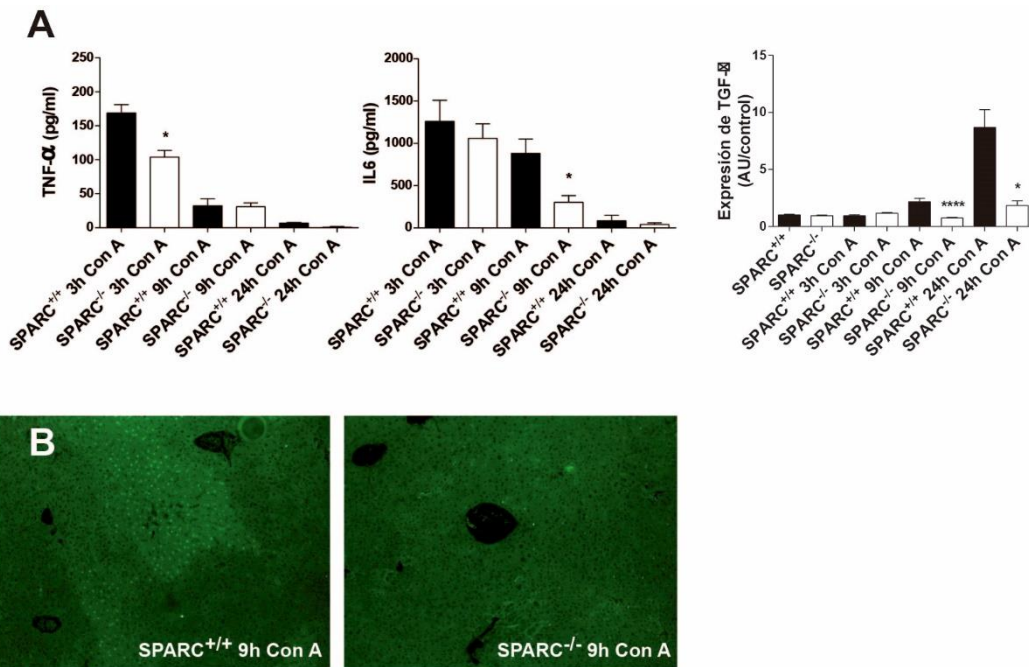


Figura 12 Reducción de los niveles de citoquinas proinflamatorias y de la apoptosis medida por TUNEL en ratones SPARC^{-/-}. (A) Niveles séricos de TNF α e IL-6. * $p < 0.05$ SPARC^{-/-} 3h con A vs. SPARC^{+/+} 3 h con A para TNF α y SPARC^{-/-} 9 h con A vs. SPARC^{+/+} 9 h con A para IL-6, test de Mann Whitney. qPCR para TGF- β ; **** $p < 0.0001$ SPARC^{-/-} 9 h con A vs. SPARC^{+/+} 9 h con A y * $p < 0.05$ SPARC^{-/-} 24 h con A vs. SPARC^{+/+} 24 h con A, test de Dunn. (B) Microfotografías representativas de secciones hepáticas tras 9 h de tratamiento con Con A en ratones SPARC^{+/+} o SPARC^{-/-} mediante TUNEL (40x, n=4).

La inhibición de la expresión de SPARC en células endoteliales se asocia a un menor daño inducido por Con A.

El daño de las LSEC es uno de los primeros eventos que ocurren en el proceso de injuria hepática mediada por Con A (Tiegs et al., 1992). Este proceso inflamatorio y de destrucción de las LSEC facilitarían la infiltración de células T activadas al parénquima hepático con la subsecuente inflamación e inducción posterior de la necrosis hepatocelular. Mediante análisis por microscopía electrónica observamos que la monocapa de LSEC se encontraba naturalmente dañada en animales SPARC^{+/+}, 9 h después de la inyección de Con A. Por el contrario, en animales SPARC^{-/-}, la monocapa de LSEC se encontraba indemne (Figura 13A). Posteriormente, para intentar reproducir experimentalmente *in vitro* diversos aspectos del proceso inflamatorio y necrótico que afecta a las células endoteliales, se realizaron estudios en la línea de células endoteliales denominada HMEC-1. En primer lugar estudiamos si la Con A modificaba la expresión de SPARC. Observamos que después de 1 h de incubación con Con A se indujo la expresión del ARNm de SPARC (1,00 \pm 0,03 sin Con A vs. 1,95 \pm 0,14 con Con A; $p < 0,05$, Figura 13B).

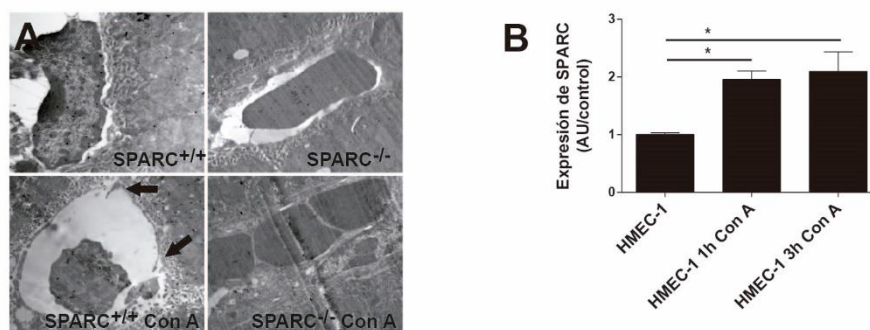


Figura 13 La ausencia de SPARC se asocia a una mejor preservación de las células LSEC sometidas a injuria. (A) Microscopía electrónica de tejido hepático proveniente de animales SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} tratados o no con Con A. Flechas: LSEC dañadas. (15000x). (B) qPCR para SPARC en células HMEC-1. *p<0.05, HMEC-1 1h y 3h de tratamiento con Con A vs. células no tratadas; test de Mann Whitney.

Para analizar los efectos de la inhibición de la expresión de SPARC en las células endoteliales, empleamos un vector basado en un lentivirus codificante de una secuencia siRNA específica anti-SPARC y exploramos su efecto inhibitorio de la expresión de SPARC mediante qPCR. Las células tratadas con un lentivirus control (siSCR) aumentaron la expresión de SPARC con respecto al control ($2,7 \pm 0,5$ UA), mientras que las células HMEC-1 tratadas con siSPARC bajaron la expresión de SPARC a niveles más bajos que las células en condición basal ($0,4 \pm 0,1$ UA) ($p < 0,01$, Figura 14A).

Con el objeto de evaluar los efectos de la inhibición de SPARC sobre la organización de los filamentos de actina se hizo una tinción con faloidina, que tiene la propiedad de unirse a la interfaz existente entre los monómeros de actina adyacentes del polímero de actina F. Como resultado de este ensayo, las células tratadas con el siRNA control mostraron reducción de la proporción de células adherentes con un patrón de fibras gruesas (*fiber stress*) y en la distribución de la tinción con faloidina, junto con un incremento de los espacios intercelulares en comparación con las células a las que se les inhibió SPARC mediante el siRNA específico (Figura 14B). Por otro lado, evaluamos el nivel de apoptosis de células HMEC-1 después del tratamiento con Con A. De manera interesante, la inhibición de SPARC resultó en una reducción significativa del porcentaje de apoptosis a las 3 h tras la incubación con Con A, de manera que el porcentaje de células apoptóticas para las células tratadas con Con A y siSCR fue del $36,8 \pm 6,6\%$ y las tratadas con siSPARC fue del $21,9 \pm 2,7\%$ (Figura 14C).

Posteriormente, intentamos simular *in vitro* el proceso de trans migración de linfocitos activados que ocurre en el modelo experimental en estudio. Para ello exploramos si la inhibición de SPARC afectaría el número de linfocitos que transmigraban atraídos por las quimiocinas CCL19 y CCL21 a través de una monocapa de células HMEC-1 tratadas con Con A. La inhibición de SPARC resultó en una reducción significativa ($p < 0,001$) del número de linfocitos que migraron a través de la monocapa de células endoteliales a las 3 h ($109,2 \pm 8,5$ siSCR Con A vs. $46,9 \pm 7,6$ si SPARC Con A; Figura 14D). Estos resultados sugieren que la inhibición de la expresión de SPARC protegería a las células endoteliales de la apoptosis inducida por Con A, preservando la conformación de monocapa e

impidiendo o dificultando el proceso de trans migración linfocitaria, evento crítico para inducir daño hepático en el modelo experimental.

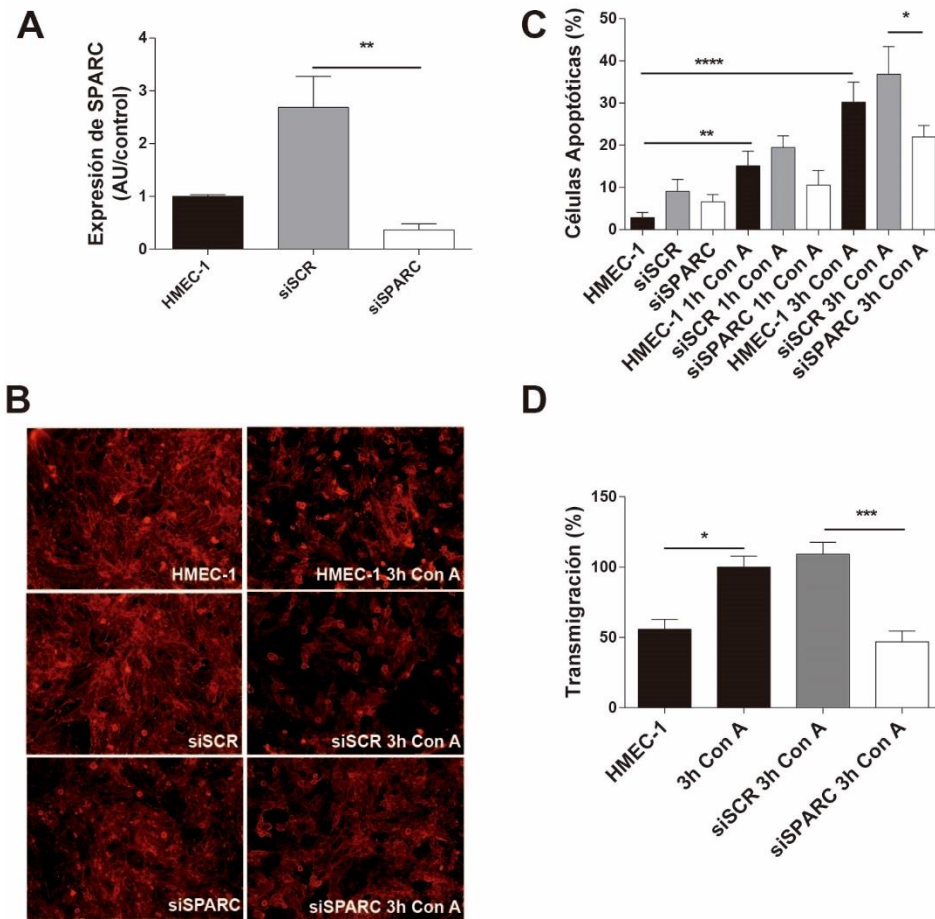


Figura 14 La inhibición de la expresión de SPARC se asocia a una mejor preservación de las células HMEC-1 sometidas a injuria por Con A. (A) qPCR para SPARC en células HMEC-1 tratadas con siControl o siSPARC. (B) Tinción con faloidina en células HMEC. (C) Cuantificación de la apoptosis en células HMEC-1 tras la incubación con Con A (ensayo con AO/EB). ** $p < 0.01$ HMEC-1 vs. HMEC-1 1h Con A; **** $p < 0.0001$ HMEC-1 vs. HMEC-1 3h Con A; $\sigma p < 0.05$, siSCR 3 h Con A vs. siSPARC 3 h Con A, Mann Whitney test, $n=4$. (D) Trans migración de esplenocitos a través de una monocapa de células HMEC-1. Media \pm SEM para grupos individuales. * $p < 0.05$ HMEC-1 vs. HMEC-1 3h Con A, *** $p < 0.01$ siSCR 3h Con A vs. siSPARC 3h Con A, test de Dunn multiple.

La expresión de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) en células LSEC es inducida durante el proceso inflamatorio en el hígado (Bacchi et al., 1993; Cybulsky et al., 1991; Kelly et al., 2007).

Decidimos analizar el patrón de expresión de VCAM-1 en el modelo de Con A. Se observó así una marcada inducción de la expresión de VCAM-1 en los hígados de ratones SPARC^{+/+} después de 7 h de tratamiento con Con A. Por el contrario, en animales SPARC^{-/-}, la expresión de VCAM-1 fue sustancialmente menor ($3,7 \pm 0,6\%$ SPARC^{+/+} Con A vs. $1,2 \pm 0,1\%$ SPARC^{-/-} de área positiva; Figura 15). Estos hallazgos sugieren que SPARC podría estar involucrada en eventos tempranos del proceso inflamatorio de las células LSEC en el daño hepático inducido por Con A.

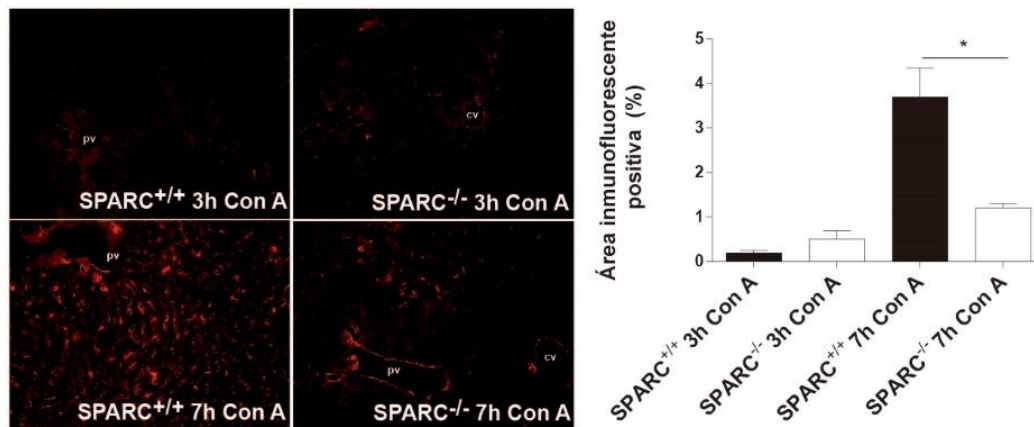


Figura 15 La ausencia de SPARC se asocia a una menor activación del endotelio sinusoidal hepático, de acuerdo a la inducción de VCAM-1. Inmunofluorescencia para VCAM-1 (200x).pv, vena porta; cv, vena central.

Para comprender con mayor detalle el mecanismo a través del cual el daño de las LSEC permite que se desarrolle el proceso de infiltración masiva de linfocitos T activados y el posterior daño hepatocelular, decidimos estudiar la presencia de autofagia en las células HMEC-1. Para ello, realizamos una tinción de las células HMEC-1 con el marcador de autofagia LC3, proteína necesaria y reclutada para la formación de las membranas de los autofagosomas (Bacchi et al., 1993). Como se muestra en la figura 16, el nivel de *dots* de LC3⁺ se incrementó en las células HMEC-1 tras la incubación por 3 h con Con A ($6,1 \pm 0,5$ *dots*/célula en HMEC-1 vs. $19,8 \pm 1,4$ en células tratadas con Con A; $p < 0,01$). Es interesante destacar que la inhibición de SPARC redujo sustancialmente la tinción positiva para LC3 a las 3 h ($17,5 \pm 1,4$ *dots*/célula siSCR vs. $5,2 \pm 0,7$ siSPARC; $p < 0,01$). Además, el

bloqueo del flujo autofágico mediante el uso de cloroquina confirmó que el descenso de la tinción de LC3 obtenido tras la inhibición de SPARC se debió a la inhibición de la autofagia, ya que los *dots* de LC3 permanecieron estables y no se acumularon cuando se inhibió el flujo de LC3. Estos resultados indican que Con A induce autofagia en las células endoteliales, y que este proceso se reduce significativamente tras la inhibición de SPARC.

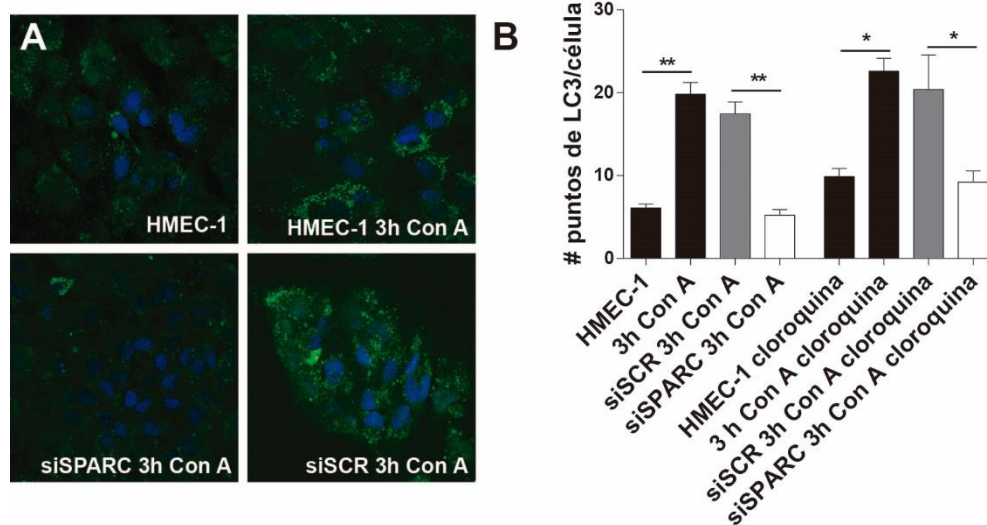


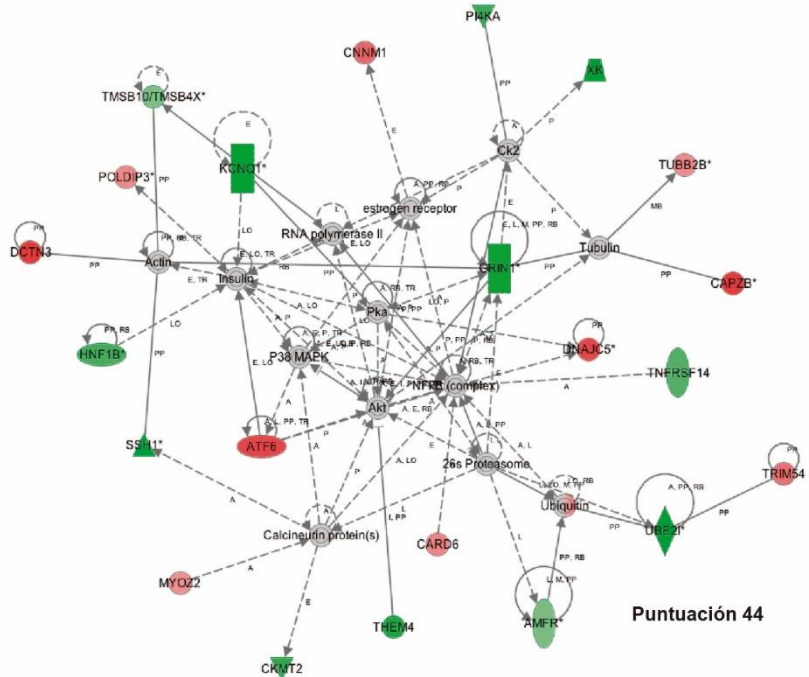
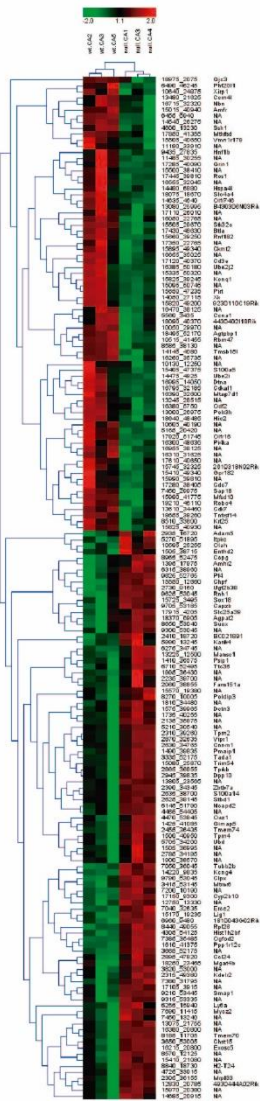
Figura 16 La inhibición de la expresión de SPARC en células HMEC-1 se asocia a una disminución en los niveles de autofagia inducida por Con A. (A) LC3 *dots* por célula HMEC-1 (600x); (B) Cuantificación de los *dots* de LC3 por célula; ** $p < 0.01$, HMEC-1 vs. 3h Con A, siSCR 3 h Con A vs. siSPARC 3 h Con A; * $p < 0.05$, HMEC-1 cloroquina vs. 3h Con A cloroquina, siSCR 3 h Con A cloroquina vs siSPARC 3 h Con A cloroquina; test de comparación múltiple de Dunn.

El análisis del transcriptoma revela mecanismos moleculares potencialmente relacionados con el rol de SPARC en el daño hepático inducido por Con A.

Posteriormente, y con el fin de profundizar en el estudio de los mecanismos que podrían estar involucrados en el efecto protector del daño hepático agudo inducido por Con A en animales SPARC^{-/-}, se realizó un análisis por microarreglos de cDNA (mediante una colaboración con la Universidad de Navarra) sobre muestras de tejido hepático proveniente de ratones SPARC^{-/-} y SPARC^{+/+} tras 9 h de la aplicación de Con A. El análisis por microarreglos arrojó un total de 169 genes que mostraron

cambios ($p < 0.01$; 94 sobre-expresados y 75 reprimidos) en ratones SPARC^{-/-} comparados con ratones SPARC^{+/+} (Tabla III). El análisis por IPA (*Ingenuity Pathways Analysis*) mostró diversos grupos/redes de genes modificados relacionados con adhesión celular, organización del citoesqueleto y el proceso de apoptosis (Figura 17), entre los que se incluyen la sobre-expresión de los genes *actin capping protein $\beta 2$* (CAPZB) y *tubulin β Class IIb* (TUBB2B), con represión de los genes *thymosin β* (TMSB10), *slingshot homolog 1* (SSH1), *thioesterase superfamily member 4* (THEM4), *tumor necrosis factor receptor superfamily member 14* (TNFRSF14) y *potassium voltage-gated channel, KQT-Like subfamily member 1* (KCNQ1).

A SPARC^{-/-} Con A 9h vs. SPARC^{+/+} Con A 9h **B**



Puntuación 44

Tipo de nodos y bordes IPA

- | | | |
|------------------------------|-----------------------------|--|
| □ Citoquina | ○ solo pegado | A Activación |
| ◇ Enzima | ○ actúa en | E Expresión (incluye metabolismo / síntesis de químicos) |
| ⊙ Grupo o Complejo | ○ inhibe y actúa en | I Inhibición |
| ⊖ Kinaasa | — interacción directa | L Proteólisis (incluye degradación de químicos) |
| ⊖ Regulator de Transcripción | - - - interacción indirecta | LO Localización |
| ⊖ Regulator de Traducción | | M Modificación Bioquímica |
| ⊖ Receptor Transmembrana | | MB Afiliación a grupo/complejo |
| ⊖ Transportador | | P Fosforilación/Defosforilación |
| ○ Otro | | PD Unión ADN-Proteína |
| | | PP Unión Proteína-Proteína |
| | | RB Regulación de unión |
| | | T Transcripción |
| | | TR Translocación |

C

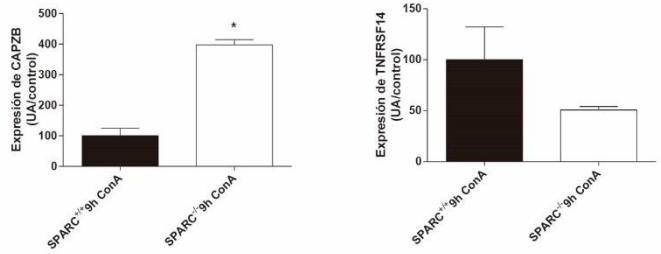


Figura 17 Heatmap y red de genes destacada donde se muestra la expresión diferencial de genes. (A) *Heatmap* de los genes expresados diferencialmente entre los diferentes grupos de animales tras 9 horas de administrada la Con A. (B) Red de genes destacada obtenida mediante el análisis de IPA de genes diferencialmente expresados en animales SPARC^{-/-} y SPARC^{+/+} después de 9 h de inyectada la Con A. Los genes sobre-expresados y reprimidos en animales SPARC^{-/-} se muestran en verde y rojo, respectivamente. La intensidad de los colores denota niveles de expresión génica. En gris los genes que tienen relación con los resaltados en rojo o verde pero que no han alcanzado criterios suficientes para considerarlos que han cambiado su expresión de manera significativa. (C) Niveles de expresión de ARNm de CAPZB y TNFRSF14 en muestras de hígado de ratones luego de 9 h de inyección de Con A. *p<0,05. Test de Mann Whitney.

Tabla III: IPA® Moléculas Top. 9 h de tratamiento con Con A

Genes sobre expresados

	ID del Gen	Valor exponencial
CLPX	NM_011802	2,519
PF4	NM_019932	2,455
RNH1	NM_145135	2,411
FAM151A	NM_146149	2,337
OLAH	NM_145921	2,310
GIMAP1-GIMAP5	NM_175035	2,224
CAPZB	NM_009798	2,153
Tpm4	NM_001001491	2,059
C8G	XM_130127	2,057
GYS1	NM_008195	2,055

Genes reprimidos

	Gene ID	Valor exponencial
STK32C	NM_021302	-3,318
CCRN4L	NM_009834	-2,747
PIRT	NM_178656	-2,485
C11orf70	NM_199017	-2,399
HIC2	NM_178922	-2,356
Scgb2b26/Scgb2b27	NM_194338	-2,338
RNF182	NM_183204	-2,309
GJC3	NM_080450	-2,281
BRD8	NM_144864	-2,222
9830107B12Rik	NM_177083	-2,068

Los resultados demuestran que la ausencia de SPARC se correlaciona con un efecto de protección frente al daño hepático producido por Con A. Con la finalidad de estudiar los alcances terapéuticos de este efecto, decidimos evaluar si la inhibición de la expresión de SPARC *in vivo* protege a los animales contra el daño hepático inducido con Con A. Para ello, empleamos el vector adenoviral AdasSPARC que expresa una secuencia antisentido para el ARNm de SPARC; como control se usó un vector adenoviral no terapéutico que expresa el gen reportero de la beta galactosidasa, Adβgal. Los

adenovirus fueron administrados por vía intravenosa 48 h antes de la aplicación de Con A en ratones SPARC^{+/+}. En primer lugar demostramos que el vector AdasSPARC atenuó la expresión hepática de SPARC inducida ce en ratones tratados con Con A a las 24 h, como mostramos por qPCR (2,9±0,6 Adβgal vs. 1,5±0,2 AdasSPARC; p<0,05, Figura 18A). Más importante aún fue que esta estrategia resultó eficaz en atenuar la magnitud de la injuria hepática como se pone en evidencia con los niveles de transaminasas séricas (ALT (UI/L): 9.610±2526 AdβGal Con A vs. 1.837±1712 AdasSPARC Con A; p<0,05; AST (UI/L): 17.403±4535 AdβGal Con A vs. 3.210±1831 AdasSPARC Con A; p<0,05) y ante la evaluación microscópica del tejido hepático (Figura 18B-C).

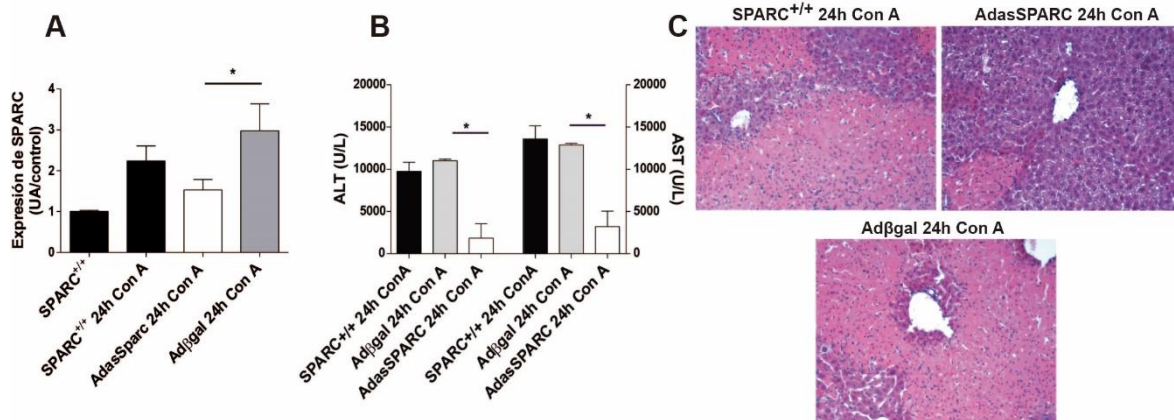


Figura 18 . El vector adenoviral AdasSPARC ejerce un efecto protector del daño hepático inducido tras la administración de Con A en un modelo preventivo (A) qPCR de tejido hepático proveniente de ratones tratados con Con A SPARC^{+/+} o AdasSPARC SPARC^{+/+}. *p<0.05 vs. SPARC^{+/+} 24h Con A; test de Mann Whitney. (B) Niveles séricos de AST y ALT después de 24 h de tratamiento con Con A en ratones SPARC^{+/+}, AdasSPARC SPARC^{+/+} y Adβgal SPARC^{+/+}. p<0.05 vs. SPARC^{+/+} 24h Con A; test de Dunn. (C) H&E de tejido hepático tratado con Con A en grupos SPARC^{+/+}, AdasSPARC SPARC^{+/+} y Adβgal SPARC^{+/+}; (200x).

Con el objetivo de ensayar el uso terapéutico de la inhibición *in vivo* del daño hepático inducido por Con A, estudiamos los efectos de un siRNA para uso *in vivo* anti-SPARC (siSPARC) con su respectivo siRNA control (siControl), administrado vía vena portal 2 h después de la inyección de Con A. Cuarenta y ocho horas luego de la inyección de siSPARC se evidenció una atenuación de la expresión hepática de SPARC como se muestra en la qPCR (2,2±0,2 siControl vs. 0,9±0,09 siSPARC; p<0,01, Figura 19A). Pero más importante fue la disminución en la magnitud del daño hepático en los ratones tratados con siSPARC en comparación con los animales del grupo siControl (AST (UI/L):

296,7±43,7 siControl Con A vs. 142,0±9,7 siSPARC Con A; Figura 19B). Más importante aún fue observar que esta estrategia terapéutica resultó en aumento de la supervivencia de los animales, como puede evidenciarse en la figura 19C.

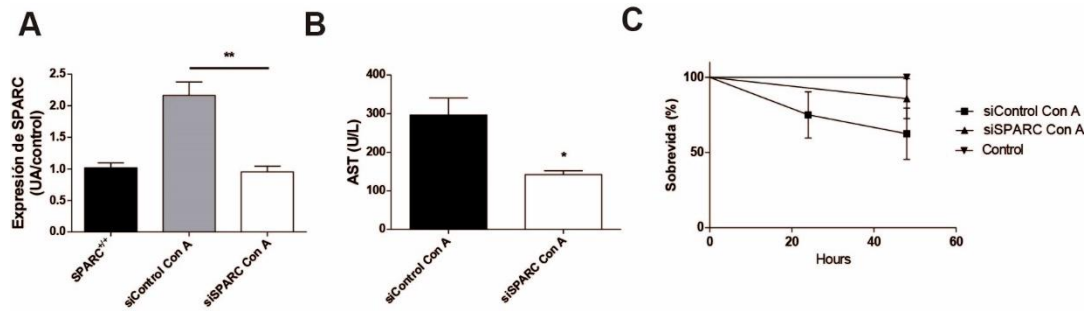


Figura 19 Efecto terapéutico de la inhibición de SPARC mediante la administración de siRNA anti-SPARC en el modelo de Con A. (A) Niveles de SPARC en ratones tratados con Con A siControl o siSPARC. (B) Niveles de la transaminasa AST (UI/L) en ratones tratados con Con A siControl o siSPARC. (C) Curva de supervivencia de ratones controles, siControl tratados con Con A SPARC^{+/+} o siSPARC tratados con Con A SPARC^{+/+}. p<0,05, test de Log-rank.

Parte II

Caracterización del perfil de expresión génica en ratones naïve SPARC^{-/-} mediante el análisis de microarreglos de ADNc.

Para explorar el efecto de la ausencia de SPARC sobre el perfil de expresión de genes a nivel hepático durante el proceso fibrogénico, se realizó un análisis de microarreglos de expresión de ADNc (Affymetrix Mouse Gene ST 1.0 array), en animales antes y después de la administración de TAA en ratones SPARC^{-/-} y SPARC^{+/+}. Con esta finalidad, en primer lugar realizamos una comparación del perfil de expresión génica entre muestras de animales no tratados con TAA, con la hipótesis de que los genes responsables del efecto basal podrían encontrarse sobre-expresados o reprimidos.

Como resultado de este análisis, 139 genes se encontraron sobre-expresados (124 genes conocidos y 15 desconocidos ADNc o ESTs) y 155 genes reprimidos (138 genes conocidos y 17 desconocidos ADNc o ESTs) (véase material complementario). Para analizar toda la información surgida de nuestro análisis por microarreglo se siguieron tres estrategias. En primer lugar, se expone la lista de los primeros 10 genes sobre-expresados o reprimidos (Tabla IV), luego los modelos de interacción de redes de genes (Figura 20) y, finalmente, el análisis de GO (véase material complementario). El análisis de los genes sobre-expresados y reprimidos mostró genes candidatos de participar en la protección del daño hepático en los ratones SPARC^{-/-}, al compararlos con los ratones SPARC^{+/+}. Es importante mencionar que LOXL4, una proteína importante relacionada con la regulación de los componentes de la MEC, fue encontrada sobre-expresada, mientras que USP2, relacionada con la inducción de apoptosis, y CCL19, relacionada con la inflamación y la fibrogénesis, se encontraban reguladas negativamente en hígados de ratones no tratados SPARC^{-/-} cuando fueron comparadas con ratones SPARC^{+/+}. Estos hallazgos sugieren que podría existir una condición inicial de las células del hígado, con susceptibilidad a la injuria y compatible con una subsiguiente reducción en la susceptibilidad para desarrollar fibrosis.

Los análisis de *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (con una rigurosidad de $p < 0,01$ de que la asociación de los genes no sea un producto del azar) destacaron varias redes de proteínas que incluyen mecanismos protectores en los ratones SPARC^{-/-} ante el estímulo fibrogénico. La red con el mejor puntaje y por ende la menor probabilidad de que los genes que componen la red sean un producto del azar, fue elegida para análisis (Figura 20B). En este modelo, la ausencia de la expresión de SPARC

se relacionó con la expresión de Sox9. Sox9 (*sex determining region Y-box 9*) y CDH1 (*Cadherin-1* o *E-cadherin*; con una actividad de expresión regulada y que se une a Sox9) se encontraron sobre-expresados en los hígados de ratones SPARC^{-/-}. Adicionalmente, otros genes mostraron aumento de expresión en los ratones SPARC^{-/-} dentro de la misma red de interacción como *cldn1* (*Claudin 1*), *secretasa gamma*, *aph1b* (*anterior pharynx defective 1b homolog*), *pag1* (*phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1*), *mpz11* (*myelin protein zero-like 1*) y *agk* (*acylglycerol kinase*). Además, la ausencia de expresión de SPARC se encontró relacionada con una inhibición en PCGF2 (*polycomb group ring finger*), un factor que mantiene la represión de genes relacionados a la tumorigenesis y al ciclo celular. PCGF2 interaccionaría con UBE2U (*ubiquitin-conjugating enzyme E2U*), proteína involucrada en la ubiquitinización que fue encontrada sobre-expresada en ratones SPARC^{-/-}. Consistentemente, otras proteínas con capacidad de interacción con UBE2U, como dos miembros de la familia de TRIM (*tripartite motif-containing*) y MID2 (*midline 2*), se encontraron sobre-expresadas en ratones con deficiencia de SPARC.

Por otro lado, un análisis de GO (véase material complementario) reveló categorías ontológicas enriquecidas estadísticamente, incluyendo vías relacionadas con la remodelación de la cromatina, la señalización de AMP cíclico o la regulación del ciclo celular. Nuestros datos sugieren que el hígado de animales deficientes de SPARC presenta un patrón de expresión de genes que los hace menos susceptibles al desarrollo de la fibrosis hepática.

Los análisis de microarreglos muestran cambios en el patrón de expresión de genes en la fibrosis avanzada en animales SPARC^{-/-}

Previamente hemos demostrado que los ratones SPARC^{-/-} muestran una reducción de los niveles de fibrosis hepática luego de 10 semanas de administración de TAA (Atorrasagasti et al., 2013). Para dilucidar los mecanismos protectores que podrían estar relacionados con la reducción de fibrosis hepática observados en los ratones SPARC^{-/-}, se realizó un estudio por microarreglos de expresión de ADNc, comparando el tejido hepático de ratones SPARC^{-/-} y SPARC^{+/+}, luego de 10 semanas de administración de TAA. Un total de 492 genes fueron modificados ($p < 0,01$), 281 genes sobre-expresados y 211 reprimidos en los ratones SPARC^{-/-}. Los genes con mayor sobre-expresión y mayor represión se muestran en la tabla V. Los genes con más sobre-expresión incluyen a CLDN4 (*Claudin*

4), un componente de las hebras de uniones estrechas, y la inhibición de CIDEC (*cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector C*), potente inductor de apoptosis. Las vías canónicas y las funciones biológicas identificadas mediante el análisis de IPA mostraron un importante grupo de genes sobre-expresados asociados a la reparación del DNA y la detoxificación. Notablemente, fue encontrado sobre expresado en los ratones SPARC^{-/-} un grupo numeroso de genes que forman una red de interacción relacionada con la reparación del ADN (Figura 20C), incluyendo en el centro de la red a ATM (*ataxia telangiectasia-mutated*) quinasa y el factor de transcripción BRCA1 (*breast cancer*), BRCA2 y BARD1 (*BRCA1-associated RING domain*) e incluyendo genes efectores como topbp1 (*topoisomerase (DNA) II binding protein 1*), rrm1 (*ribonucleotide reductase M1*), brip1 (*BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1*), pole1 (*polymerase (DNA directed), epsilon, catalytic subunit*) y 2 (*polymerase (DNA directed), epsilon 2, accessory subunit*), msh2 (*mutS homolog 2, colon cáncer, nonpolyposis type 1 (E. coli)*), mbd4 (*methyl-CpG binding domain protein 4*), blm (*Bloom síndrome, RecQ helicase-like*), fancb (*Fanconi anemia, complementation group B*), rfc4 (*replication factor C (activator 1) 4*), chaf1A (*chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)*) y B (*chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)*), Hist1H3A (*histone cluster 1, H3A*) y hat1 (*histone acetyltransferase 1*). Consistentemente, E2F, inductor de la expresión génica de muchos factores de transcripción y vías efectoras de reparación y estabilidad del ADN incluyendo algunos de los genes más relevantes mencionados anteriormente, fue encontrada sobre-expresada en el centro del segundo mapa de genes interactuantes IPA, así como también otras proteínas relacionadas funcionalmente en la proliferación celular como PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), MCM2 (*minichromosome maintenance deficient 2 mitotin*), MCM3, MCM4 (*minichromosome maintenance deficient 4 homolog*), MCM6, MCM7, RPA2 (*replication protein A2*), PRIM1 (*DNA primase, p49 subunit*), PRIM2 (*A primase, p58 subunit*), CDT1 (*chromatin licensing and DNA replication factor 1*) y ASF1B (*ASF1 anti-silencing function 1 homolog B*). Es importante mencionar que el primer y más significativo modelo de redes de genes mostró una sobre-expresión de ABCC4 (*ATP-binding cassette sub-family C member 4*), un transportador ABC clave involucrado en la remoción de químicos, xenobióticos y productos del estrés oxidativo y en la regulación negativa de TRIM25 (*tripartite motif-containing 25*) y CTSF (*cathepsin F*) involucrado en procesos de degradación de proteínas.

Tabla IV: IPA® Moléculas Top. *Background*

Genes sobre expresados

	ID del Gen	Valor exponencial
NIPAL1	NM_001081205	1,975
ACCN5	NM_021370	1,608
PIK3C2G	NM_207683	1,561
LOXL4	NM_001164311	1,514
SLC34A2	NM_011402	1,232
C17orf78	NM_001037932	1,230
UBE2U	NM_001033773	1,171
NDRG1	NM_008681	1,118
THEM5	NM_025416	1,117
FOXQ1	NM_008239	1,102

Genes reprimidos

	ID del Gen	Valor exponencial
SPARC	NM_009242	-4,051
C1orf51	BC132471	-2,245
USP2	NM_198092	-1,994
CCL19	NM_011888	-1,544
TSKU	NM_001168541	-1,508
CABYR	NM_027687	-1,338
PPIH	NM_001110130	-1,335
PER2	NM_011066	-1,120
P2RY2	NM_008773	-0,984
SYDE2	NM_001166064	-0,892

Tabla V: IPA® Moléculas Top. 10 semanas de tratamiento con TAA

Genes sobre expresados

	ID del Gen	Valor exponencial
NPY	NM_023456	2,092
CYP1A1	NM_009992	2,053
1600029D21Rik	NM_029639	2,028
Sprrr1a	NM_009264	1,615
SLC7A11	NM_011990	1,498
CLDN4	NM_009903	1,487
ARG2 (includes EG:11847)	NM_009705	1,471
MCM6	NM_008567	1,449
TMC5	NM_001105252	1,358
TMEM45A	NM_019631	1,287

Genes reprimidos

	ID del Gen	Valor exponencial
SPARC	NM_009242	-4,517
UBLCP1	NM_024475	-2,273
CIDEC	NM_178373	-1,723
AKR1C3	NM_134066	-1,659
ACOT2	NM_134188	-1,637
CHRNA2	NM_144803	-1,223
SLC22A5	NM_011396	-1,097
CYP8B1	NM_010012	-1,022
CPT1B	NM_009948	-1,002
LYVE1	NM_053247	-0,965

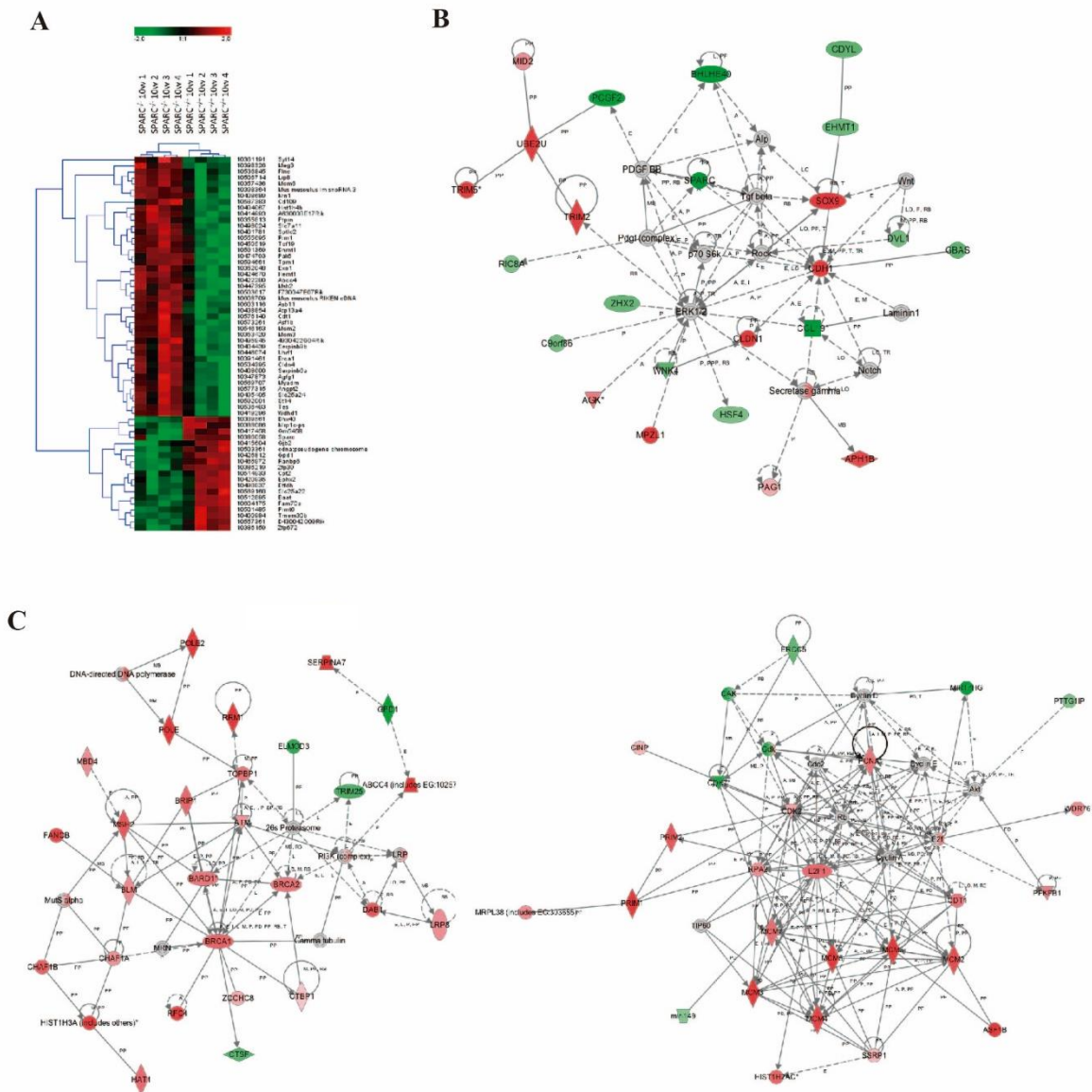


Figura 20
(A) Heatmap de ratones tratados 10 semanas con TAA. (B) Ingenuity Pathway Analysis de ratones background. (C) Ingenuity Pathway Analysis de ratones tratados con TAA por 10 semanas. Los nódulos verdes y rojos representan genes reprimidos o sobre-expresados en ratones SPARC^{-/-}, respectivamente. La intensidad de rojo o verde muestra el nivel de expresión génica. En gris están representados los genes relacionados con los otros, pero que no llegan al criterio de significancia.

Los ratones SPARC^{-/-} mostraron menor infiltrado inflamatorio mononuclear tras el tratamiento con TAA y menor poder migratorio de esplenocitos en ratones naïve

Los resultados de los microarreglos de los ratones SPARC^{-/-} naïve mostraron menor expresión de la quimiocina CCL19. Para caracterizar el perfil de las células que componen el infiltrado inflamatorio hepático de los animales tratados crónicamente con TAA, se realizó una tinción inmunohistoquímica para células CD4. Se observó así una reducción en la presencia de células CD4⁺ en los ratones SPARC^{-/-} (Figura 21A-D). Para complementar estos hallazgos, decidimos estudiar el proceso de migración de células inmunitarias; para ello, realizamos ensayos de migración *in vitro* empleando esplenocitos provenientes de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} hacia la quimiocina CCL19. Como resultado de este estudio se observó una migración reducida en los ratones SPARC^{-/-} en respuesta a CCL19 luego de 2 h de incubación (Figura 21E). Los esplenocitos SPARC^{+/+} aumentaron su migración en un 367,2±30,35% hacia la CCL19, mientras que los ratones SPARC^{-/-} solo aumentaron a un 114,1±10,74% (p<0,001). La expresión de CCL19 medida por qPCR está de acuerdo con la obtenida en los microarreglos hechos en tejido hepático que muestran una caída en la expresión de CCL19 en los ratones SPARC^{-/-} (Figura 21F).

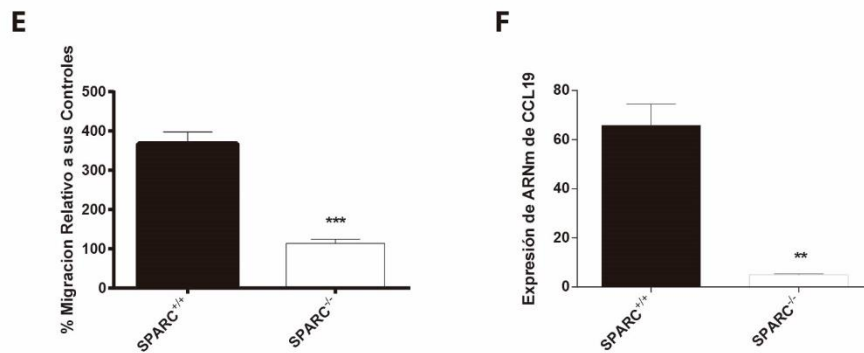
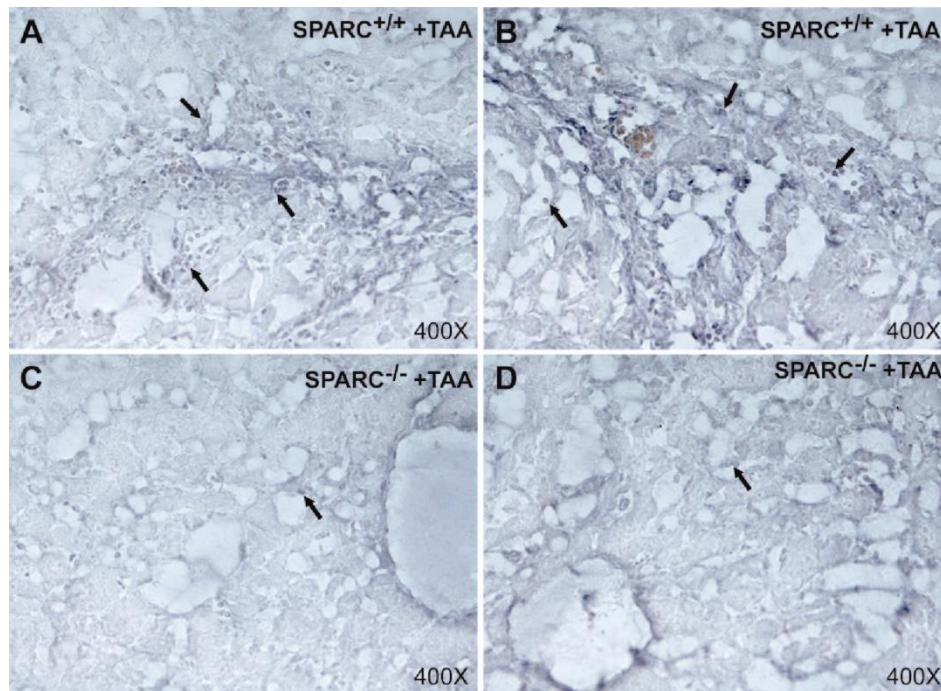


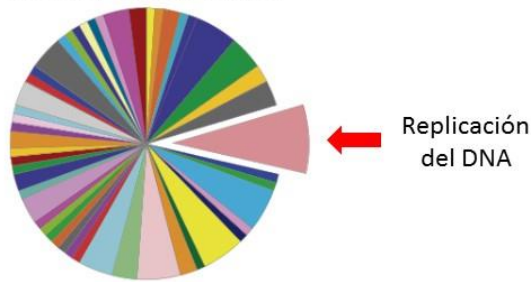
Figura 21 Infiltrado inflamatorio hepático. Análisis de la capacidad migratoria de esplenocitos.

Microfotografías de secciones representativas de hígado de ratones tratados con TAA. Los ratones SPARC^{+/+} mostraron un incremento en el infiltrado de células CD4⁺ alrededor de los tractos portaes (A,B); mientras que en los ratones SPARC^{-/-} tratados con TAA se observó una disminución del número de células CD4⁺, que se ubicaron cerca de los sinusoides (C,D). Las flechas indican células CD4⁺. Magnificación original 400X. (E) Respuesta migratoria de esplenocitos hacia la quimiocina CCL19. Porcentaje de células que migraron relativo a sus respectivos controles para esplenocitos de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} (n=3) en un sistema de cámara de tipo Boyden. Los esplenocitos fueron ubicados en un pocillo superior separado por una membrana con poros de 5 μ m de diámetro. El pocillo bajo contenía DMEM o DMEM con 10 ng/ μ l de CCL19 y se permitió migrar a las células durante 2 h. ***p<0,001, test de Mann Whitney. (F) Nivel de expresión de ARNm de CCL19 en muestras de hígado de ratones naïve. **p<0,01. Test de Mann Whitney.

Los ratones SPARC^{-/-} mostraron un incremento en la expresión de PCNA luego del daño por TAA

La proliferación celular fue altamente representada en el análisis de microarreglos de animales tratados 10 semanas con TAA. Como se muestra en la figura 22, dentro de las vías implicadas reveladas en un estudio de ontología genética, se observó que la replicación de ADN fue la categoría más afectada. Por lo tanto, decidimos evaluar la expresión de una proteína esencial para la replicación, PCNA, a nivel de ARNm por qPCR y a nivel de proteína por inmunohistoquímica. Como era esperado, los ratones SPARC^{-/-} tratados por 10 semanas con TAA mostraron niveles aumentados de ARNm de PCNA, comparados con los ratones SPARC^{+/+} (3,05±0,5 vs. 1,9±0,2, respectivamente; p<0,05). Con el fin de estudiar la cinética de este aumento de PCNA y para entender que sucede en los primeros momentos de contacto con el hepatotóxico, estudiamos la expresión de PCNA al principio de la injuria hepática y observamos que 24 h luego de la inyección de TAA los niveles de PCNA estaban incrementados en los ratones SPARC^{-/-}, en comparación con los ratones SPARC^{+/+} (2,3±0,4 vs. 1,1±0,2, respectivamente; p<0,01). Los mismos resultados fueron alcanzados en otros dos modelos de daño hepático agudo, el de Con A y el del anticuerpo agonista de CD95, Jo2, en ratones SPARC^{-/-} (Figura 23A). Estos resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica para PCNA. Los ratones SPARC^{-/-} mostraron el mayor número de núcleos positivos a las 24 h luego del tratamiento con TAA comparados a los ratones SPARC^{+/+} (25,4±3,7 vs. 11,4±2,3, respectivamente; p<0,05), mientras que los animales no tratados y los animales tratados por 10 semanas con TAA no alcanzaron diferencias significativas entre ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} (Figura 23B).

Vías PANTHER
Numero total de genes: 429
Numero total de vías: 98



IDs Mapeados	Nombre del Gen, Símbolo
NM_008922	ADN primasa, subunidad grande Prim2
NM_013550 NM_145073	Histona H3.1 Hist1h3a
NM_011131	ADN polimerasa subunidad catalítica delta Pold1
NM_008892	ADN polimerasa subunidad catalítica alfa Pola1
NM_008921	DNA primasa, subunidad pequeña 4 Rfc4
NM_145480	Factor de replicación, subunidad 4 Rfc4
NM_175653 NM_178205 NM_178215	Histona H3.2 Hist1h3b
NM_011045	Antígeno nuclear de proliferación celular, PcnA

- Pathways:
- Vía de enfermedad de Alzheimer-presenilín (P00004)
 - Degradación de aminobutirato (P02726)
 - Angiogénesis (P00006)
 - Dirección de axones mediada por semaforinas (P00007)
 - Coagulación sanguínea (P00011)
 - Mapa de señalización CCKR (P06959)
 - Vía de señalización de cadherina (P00012)
 - Ciclo celular (P00013)
 - Regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa (P00018)
 - Replicación del ADN (P00017)**
 - Biosíntesis de purinas de novo (P02738)
 - Biosíntesis de desoxirribonucleótidos primarios de novo (P02739)
 - Vía de señalización del receptor de EGF (P00018)
 - Vía de señalización de FGF (P00021)
 - Síntesis de ácido Gamma-aminobutírico (P04384)
 - Vía del receptor de liberación de la hormona gonadotrofina (P06664)
 - Vía de señalización de Hedgehog (P00025)
 - Vía de mediación de la vía de señalización de proteína-G heterodimérica Gi alfa Sa alfa (P00020)
 - Enfermedad de Huntington (P00029)
 - Vía de señalización mediada por la inflamación por quimioquinas y citocinas (P00031)
 - Vías de señalización de integrinas (P00034)
 - Vía del receptor ionotrópico de glutamato (P00037)
 - Biosíntesis de liposato (P02750)
 - Metabolismo de manosa (P02752)
 - Vía del receptor metabotrópico de glutamato grupo I (P00041)
 - Vía del receptor metabotrópico de glutamato grupo III (P00039)
 - Vía del metilmalonil (P02755)
 - Vía de señalización del receptor muscarínico de acetilcolina 1 y 3 (P00042)
 - Vía de señalización del receptor nicotínico de acetilcolina (P00044)
 - Degradación de omítina (P02758)
 - Vía de señalización de PDGF (P00047)
 - Vía de PI3 kinasa (P00048)
 - Biosíntesis de PLP (P02759)
 - Enfermedad de Parkinson (P00049)
 - Vía de las pentosas fosfato (P02762)
 - Cascada de activación del plasminógeno (P00050)

Figura 22 Gráfico de torta de vías de señalización obtenido por Panther destacando el término de replicación del ADN por GO, y su lista de genes implicados.

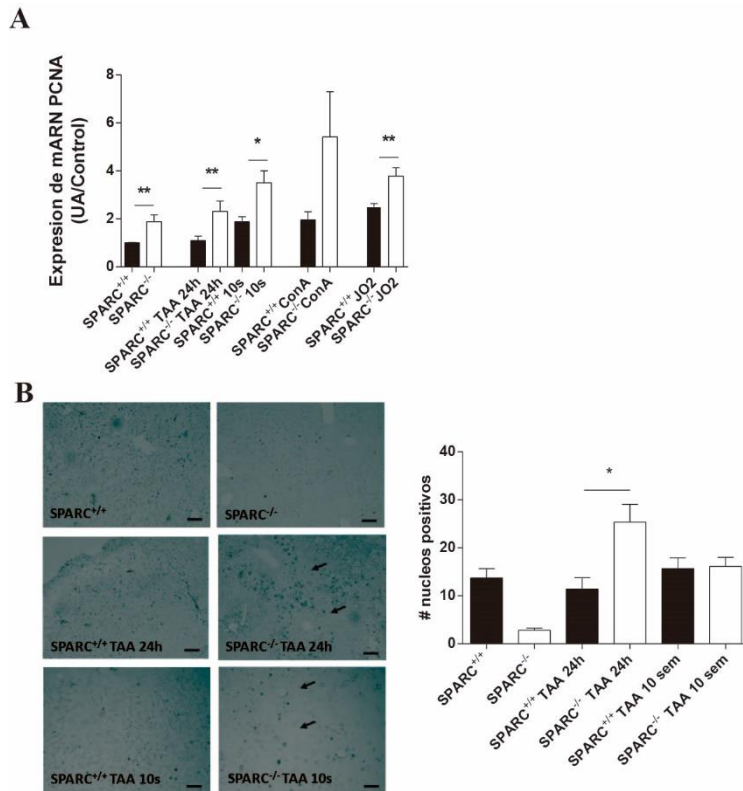


Figura 23 Los ratones SPARC^{-/-} muestran una elevación en los niveles de expresión de PCNA en tejido hepático. (A) Los niveles de expresión de los transcritos de PCNA de ratones inyectados con TAA por 24 h (n=3), TAA durante 10 semanas (n=5), Con A (n=4) o anti-CD95 Jo2 (n=3) fueron medidos por qPCR. *p<0.05, **p<0.01. Test de Mann-Whitney. (B) Inmunohistoquímica para PCNA de ratones SPARC^{+/+} y ratones SPARC^{-/-}, tratados o no con TAA por 24 h (modelo agudo) o 10 semanas (200X, barra 50 μm) y su cuantificación (panel de la izquierda); *p<0.05. Test de Kruskal Wallis, n=3.

Los ratones SPARC^{-/-} muestran un incremento de la expresión de factores relacionados con mecanismos de regeneración hepática tras la administración de TAA.

El incremento de la proliferación celular manifestada mediante la tinción de PCNA en los ratones SPARC^{-/-} nos llevó a estudiar si también se encontraban asociados cambios en la expresión de factores de crecimiento y citoquinas relacionadas a este proceso a nivel hepático. Efectivamente, observamos que los niveles del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) se encontraban incrementados en los hígados de ratones SPARC^{-/-}, comparados con ratones SPARC^{+/+} 24 h luego de la primera dosis de TAA (0,9±0,2 vs. 0,2±0,04, respectivamente; p<0,05). Sin embargo, estos

resultados no fueron significativamente superiores en los ratones SPARC^{-/-} en comparación a los SPARC^{+/+}, luego de 10 semanas de administración de TAA (Figura 24A). De manera importante, 24 h luego de una dosis de Con A los niveles de IGF-1 bajaron significativamente en los ratones SPARC^{+/+}, pero permanecieron sin cambios en los ratones SPARC^{-/-} (0,4±0,03 vs. 0,7±0,07, respectivamente; p<0,001). Además, los niveles de ARNm del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) fueron superiores en ratones SPARC^{-/-} luego de 24 h de administración de Con A (6,2±2,1 vs. 2,1±1,1 en SPARC^{+/+}; p<0,05) y luego de 10 semanas de tratamiento con TAA (5,8±0,8 vs. 3,5±0,6 en SPARC^{+/+}; p<0,01; Figura 24B). Junto con estos hallazgos, los niveles de RNAm de IL-6, citoquina con un papel clave en el proceso de proliferación hepatocitaria en diversos modelos de daño (Camargo et al., 1997; Cressman et al., 1996), fueron significativamente mayores en los ratones SPARC^{-/-} comparados a los ratones SPARC^{+/+}, luego de 10 semanas de administración de TAA (1,7±0,4 SPARC^{-/-} vs. 0,5±0,2 UA/control SPARC^{+/+}; p<0,05; Figura 24C).

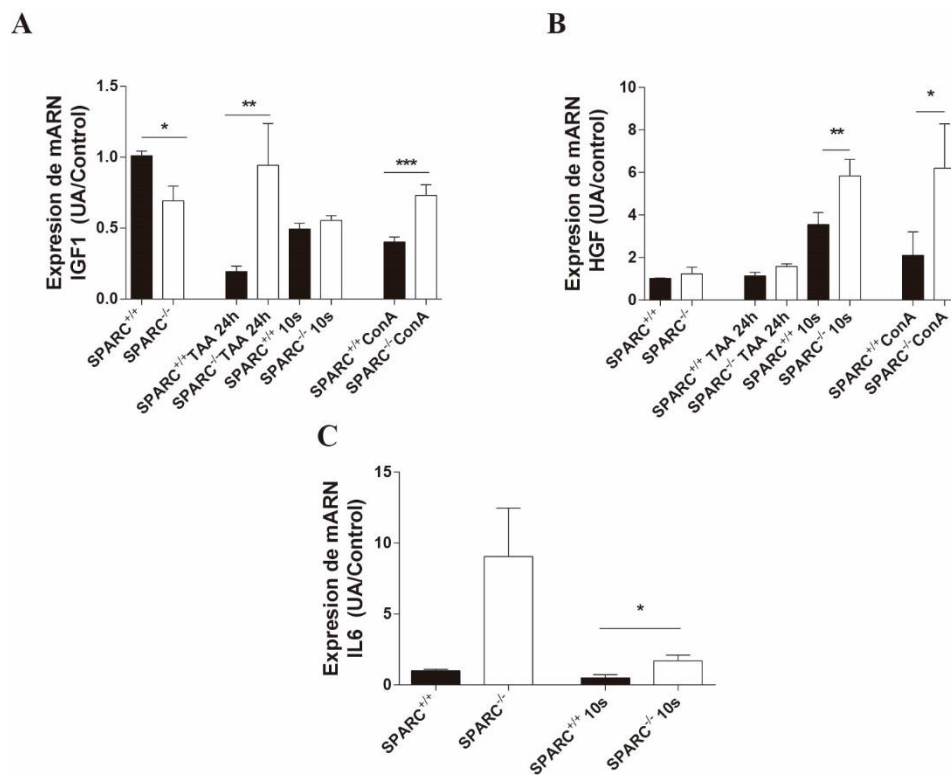


Figura 24 Los ratones SPARC^{-/-} muestran una elevación en los niveles de expresión de factores de regeneración hepática en comparación con los animales SPARC^{+/+}. Niveles de ARNm hepático de (A) IGF, (B) HGF e (C) IL-6, provenientes de ratones tratados con TAA o Con A. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Mann-Whitney test.

El análisis proteómico de los hígados de ratones SPARC^{-/-} tratados con TAA revelan un incremento en el perfil de proteínas relacionadas con la detoxificación de ROS.

Con el propósito de explorar mecanismos que pudieran explicar la protección ante la generación de fibrosis en ausencia de SPARC, se analizó el perfil proteómico de los hígados de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} tratados con TAA por 10 semanas. Como resultado, encontramos 4 proteínas relacionadas con la detoxificación de ROS que presentaron niveles significativamente mayores en los ratones SPARC^{-/-}: Catalasa (CAT), Peroxiredoxina-1 (PRDX1), Glutación S-transferasa P1 (GSTP1) y glutación S-transferasa Mu1 (GSTM1, Figura 25A). Otras proteínas relacionadas con el efecto protector de la ausencia de SPARC están relacionadas con la actividad metiltransferasa: S-adenosilmetionina sintasa isoforma tipo 1 (MAT1A) y glicina N-metiltransferasa (GNMT, Figura 25B), con la regulación del crecimiento celular: Anexina A3 (ANXA3, Figura 26A), y con el metabolismo: fructosa 1,6-bisfosfatase 1 (FBP1), 3-ketoacil-CoA tiolasa (ACAA2) y el factor de iniciación 4A-I (EIF4A1, Figura 26B).

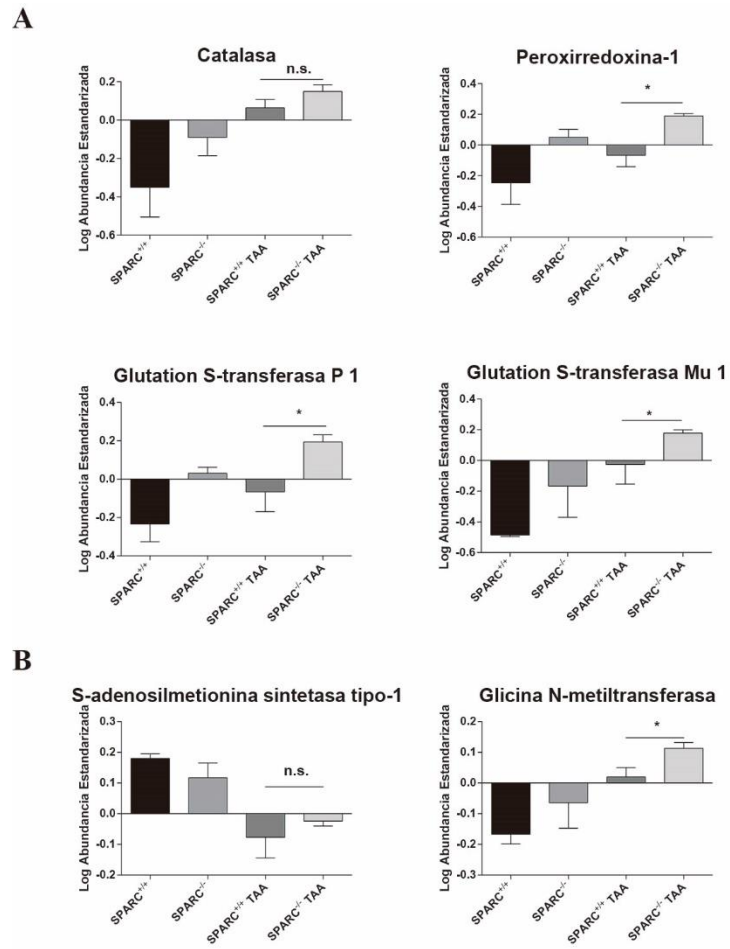


Figura 25 El perfil proteómico hepático revela la inducción de vías de detoxificación de ROS y vías de regeneración del hígado en animales expuestos a TAA por 10 semanas. (A) Proteínas involucradas en la detoxificación de ROS; (B) proteínas en reacciones de transferencias de grupos metilo, * $p < 0.05$; Test de Mann-Whitney, $n = 3$.

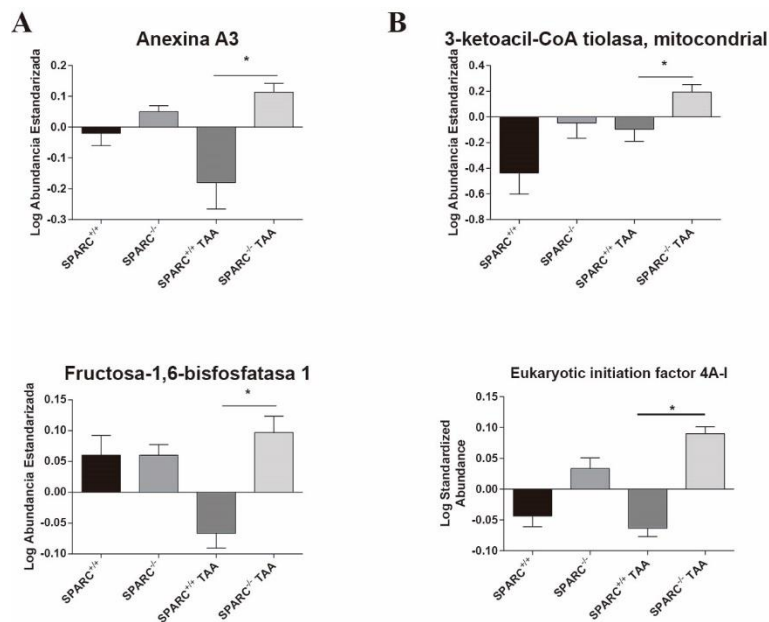


Figura 26 El perfil proteómico hepático revela la inducción de vías de regeneración del hígado y del metabolismo en animales expuestos a TAA por 10 semanas.

(A) Proteínas involucradas en el crecimiento celular; (B) proteínas del metabolismo; * $p < 0.05$; Test de Mann-Whitney, $n=3$.

Los animales SPARC^{-/-} presentan bajos niveles de actividad catalasa y de carbonilación de proteínas y el cultivo primario de hepatocitos presenta bajos niveles de producción de ROS

La producción descontrolada de ROS y la falla en los procesos de detoxificación tienen un efecto deletéreo en la función hepática. Debido a que el análisis proteómico mostró genes implicados en la detoxificación de ROS, nos propusimos estudiar este proceso en el hígado de ratones SPARC^{-/-} analizando la actividad catalasa. Así, observamos que la actividad hepática de la catalasa en ratones naïve fue superior en los ratones SPARC^{-/-}, comparada con los ratones SPARC^{+/+} ($100 \pm 3,7\%$ SPARC^{+/+} vs. $119,3 \pm 7,5\%$ SPARC^{-/-}; $p < 0,05$; Figura 27). También estudiamos la reacción de hepatocitos obtenidos de un cultivo primario ante el contacto con TAA midiendo los niveles de ROS utilizando 2'7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) que es convertido a un compuesto fluorescente cuando reacciona con intermediarios reactivos del oxígeno. Como resultado, el cultivo primario de los hepatocitos de ratones SPARC^{-/-} mostró una menor señal de fluorescencia, en comparación con los ratones SPARC^{+/+} a las 3 h del tratamiento con TAA, como fue confirmado por fluorescencia directa

y citometría de flujo ($17,6 \pm 3,8$ SPARC^{+/+} vs. $7,8 \pm 1,2$ SPARC^{-/-}; Figura 28A). Las microfotografías de hepatocitos de ratones SPARC^{-/-} revelaron una morfología celular mejor preservada cuando fueron incubados con TAA por 24 h y una tendencia a menores niveles de transaminasas que los ratones SPARC^{+/+} (Figura 28B).

Por otro lado, como los grupos carbonilados de proteína son biomarcadores de estrés oxidativo, evaluamos los niveles de carbonilación en homogenatos de hígado. Los datos muestran que los ratones SPARC^{-/-} presentan niveles más bajos de proteínas carboniladas cuando son comparados con ratones SPARC^{+/+} a las 10 semanas de tratamiento con TAA ($138,7 \pm 13,62$ SPARC^{+/+} vs. $96,6 \pm 14,5$ SPARC^{-/-}; $p < 0,05$; Figura 29).

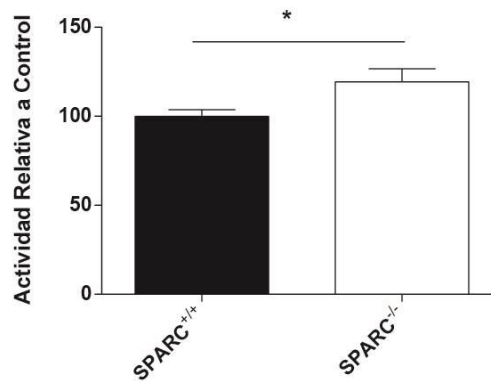
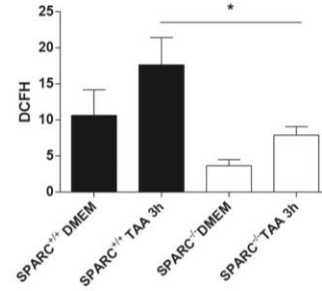
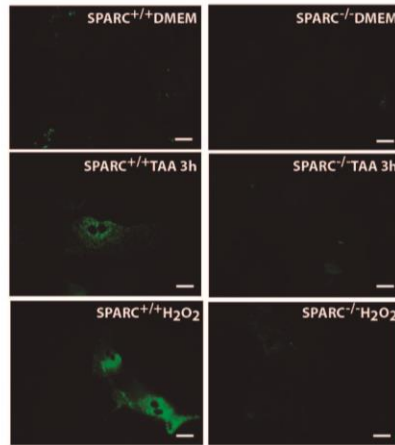


Figura 27 La actividad catalasa es superior en ratones SPARC^{-/-} naïve. Actividad catalasa relativa a controles de hígados de ratones SPARC^{-/-} (n=6) y SPARC^{+/+} (n=7). * $p < 0.05$. Test de Mann-Whitney.

A



B

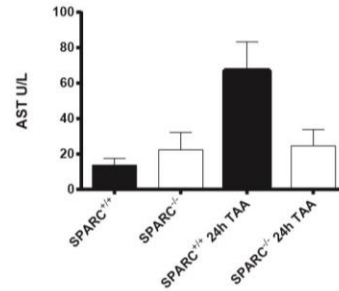
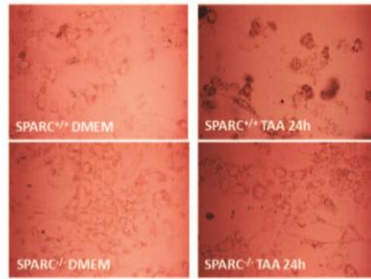
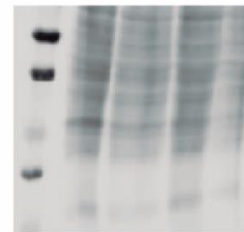
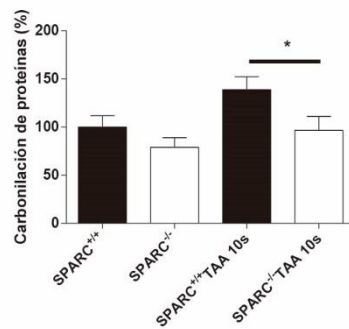


Figura 28 La producción de ROS endógenas en respuesta al tratamiento por TAA. (A) Micrografías representativas de hepatocitos tratados con TAA o H₂O₂ por 3 h (400X, barra 25 μm) (panel de la izquierda); ensayo de 2',7'-diclorofluorescín diacetato para mediciones de ROS por citometría de hepatocitos tratados con TAA por 3 h. *p<0.05. Test de Mann-Whitney, n=4; (B) Fotomicrografías de cultivo primario de hepatocitos tratados con TAA de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} (400X, recuadro) y niveles de AST (UI/L).



SPARC^{+/+}
 SPARC^{-/-}
 SPARC^{+/+}TAA 10 sem
 SPARC^{-/-}TAA 10 sem

Figura 29 Niveles de carbonilación de proteínas totales de hígado de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} tratados 10 semanas con TAA (n=4).

La deficiencia de SPARC se asocia a una disminución de la disfunción mitocondrial asociada al daño inducido por Con A

Dado que las diferencias en los niveles de inducción de ROS ocurren también al principio del daño hepático, decidimos analizar la funcionalidad mitocondrial en el modelo de daño hepático agudo con Con A. Los niveles de óxido nítrico (NO) en las mitocondrias hepáticas después de la administración de Con A fueron significativamente mayores en los ratones SPARC^{+/+}, en comparación con los ratones SPARC^{-/-} (33,9±3,9 SPARC^{+/+} vs. 4,7±0,2 SPARC^{-/-}; p<0,01; Figura 30A). La observación por microscopía electrónica mostró que las mitocondrias hepáticas de los ratones SPARC^{+/+} se encontraban envueltas en vesículas, sugiriendo la presencia de eventos de autofagia (Figura 30B). Considerando que la función mitocondrial está asociada con la generación de ROS, decidimos evaluar la actividad de los complejos mitocondriales en tejido hepático. Como resultado, observamos que la actividad de los complejos I (177,3±38,2 SPARC^{+/+} vs. 64,6±5,2 SPARC^{-/-}; p<0,05) y II-III (29,2±5,7 SPARC^{+/+} vs. 5,1±0,5 SPARC^{-/-}; p<0,0001) y IV (158,4±6,9 SPARC^{+/+} vs. 42,9±2,6 SPARC^{-/-}; p<0,001) fueron significativamente superiores en los ratones SPARC^{+/+} luego de la exposición a Con A que en los ratones SPARC^{-/-} (Figura 30C). Dado que la actividad mitocondrial es generadora de ROS, la mayor actividad en las mitocondrias de ratones SPARC^{+/+} sugiere, en parte, mayor generación de ROS por mayor fuga de electrones (Murphy, 2009; Quinlan et al., 2013) y por ende mayor daño, fenómeno que no ocurre en los ratones SPARC^{-/-} y que podría explicar en parte la protección en ausencia de SPARC.

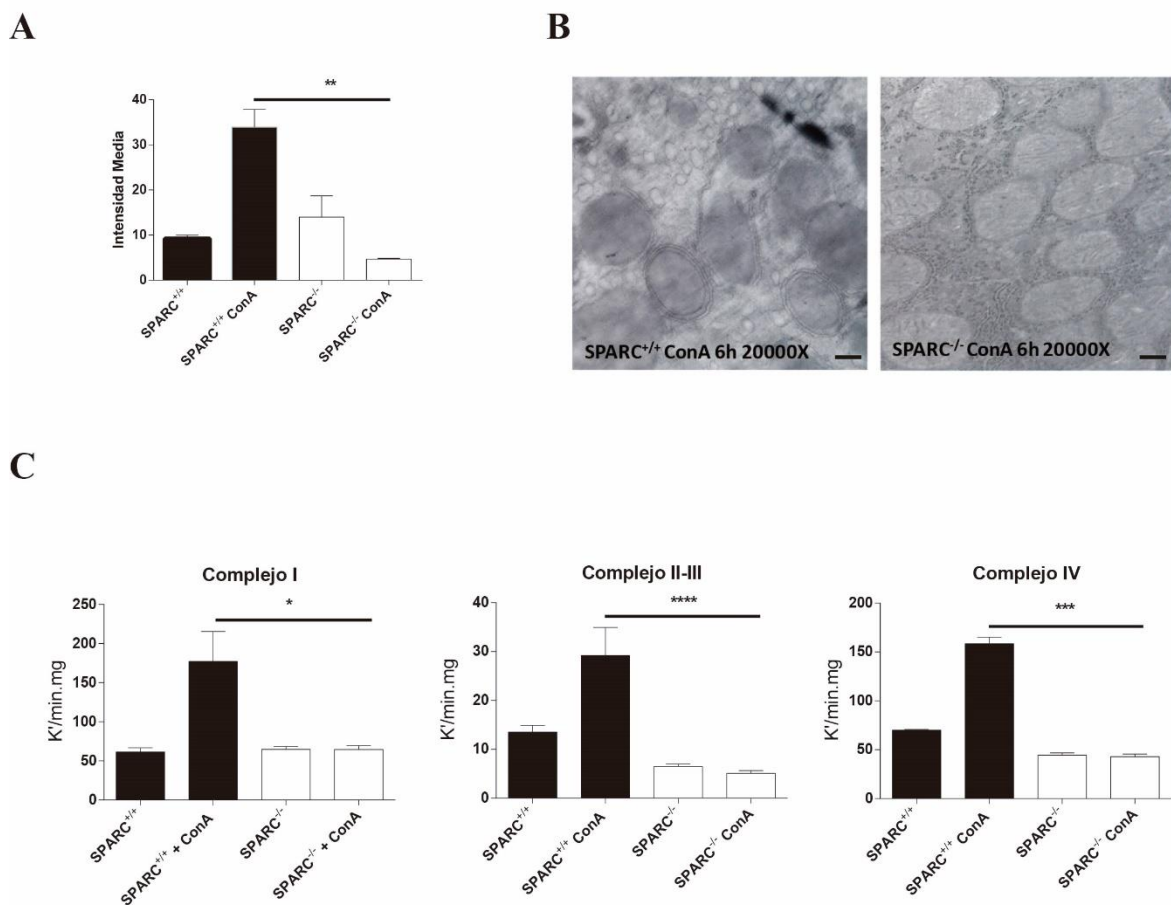


Figura 30 La ausencia de SPARC está asociada a una protección de la función mitocondrial tras la administración de Con A.

(A) Medición de los niveles de NO de mitocondrias hepáticas provenientes de ratones tratados con Con A utilizando citometría con mitotracker y DAF; ** $p < 0.01$, Kruskal-Wallis, $n = 3$; (B) Microfotografías electrónicas representativas de mitocondrias hepáticas de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} tratados con Con A (20000X, barra 0,4 μm); (C) Actividad del complejo mitocondrial I ($n = 4$), II-III ($n = 5$) y IV ($n = 5$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, test de Kruskal-Wallis.

Expresión de SPARC durante la fibrosis hepática en muestras de pacientes

Tras observar que durante el proceso de fibrogénesis hepática en los modelos animales estudiados la expresión de SPARC se encontraba incrementada, decidimos investigar la expresión de SPARC en muestras de hígados de pacientes con cirrosis. Para ello, se utilizaron biopsias tomadas de pacientes cirróticos y se compararon con muestras de pacientes sin cirrosis, para estudios de qPCR. Como

resultado, se observó un incremento de la expresión de los niveles de SPARC en las muestras de los pacientes cirróticos comparada con los no cirróticos (Figura 31). Estos datos corroboran un posible rol de SPARC en la fibrogénesis hepática, fenómeno que amerita futuros estudios.

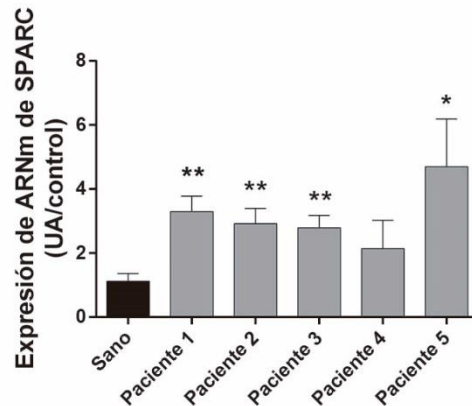


Figura 31 Expresión de SPARC en pacientes con cirrosis.

Datos cuantitativos mostrando las diferencias en los niveles de expresión de ARNm entre muestras de individuos sanos y cirróticos (Paciente del 1 al 5) medidos por qPCR. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Expresión de SPARC durante la fibrosis hepática en el modelo de ligadura del conducto colédoco

En trabajos previos se demostró que la ausencia de SPARC confiere protección ante la producción de fibrosis como la generada por TAA (Atorrasagasti et al., 2013). Para evaluar si esos resultados fueron modelo dependientes decidimos caracterizar la evolución de la fibrosis en ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} en un modelo diferente, el de la ligadura del conducto colédoco, modelo con diferente fisiopatología. Primero, para evaluar si la expresión de SPARC cambia durante la fibrogénesis hepática generada en este modelo, se procesaron muestras para evaluar por qPCR, observándose un incremento de la expresión de SPARC 7 días luego de ligarles el conducto colédoco a ratones SPARC^{+/+} (Figura 32A). Asimismo, SPARC se encontró expresada en células α -SMA⁺ así como también en células endoteliales vWF⁺, luego de mantener ligado el conducto colédoco durante 7 días (Figura 32B-M). Con estos resultados podemos concluir que SPARC se sobre-expresa en el hígado de ratones expuestos a BDL.

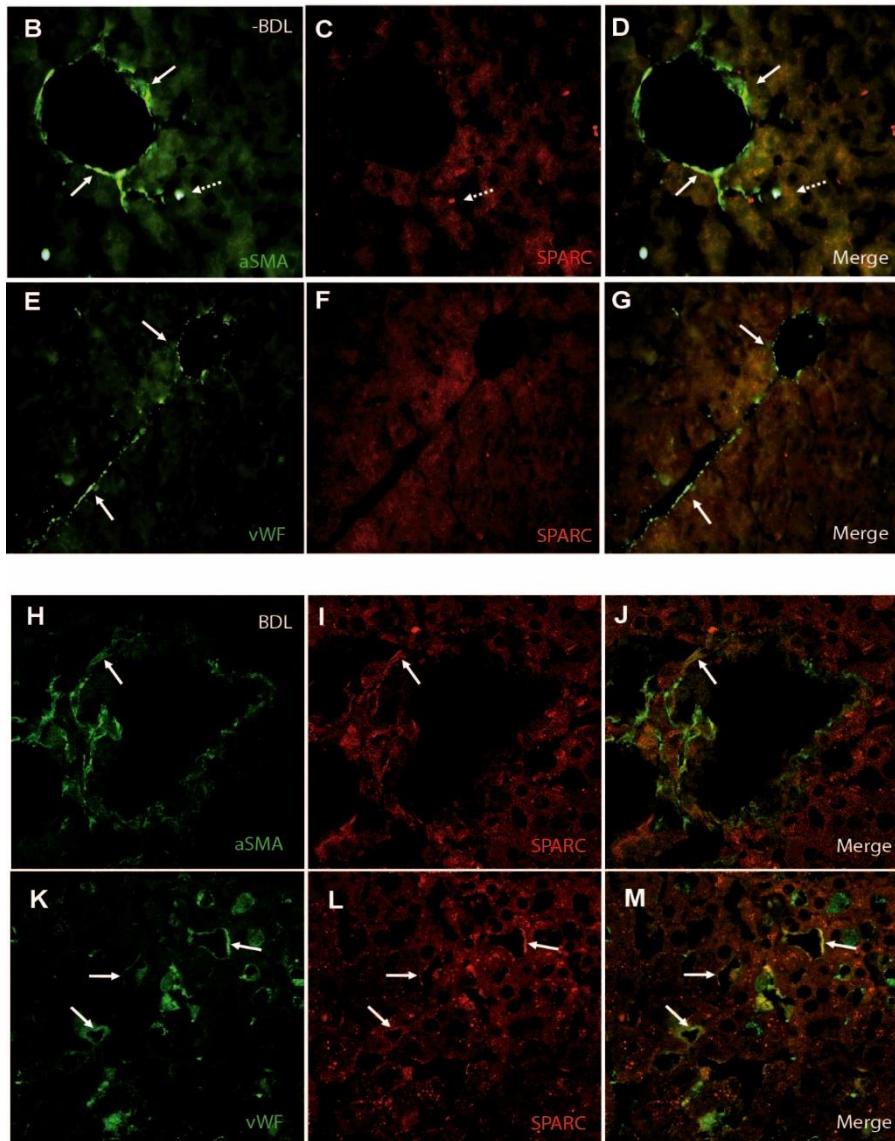
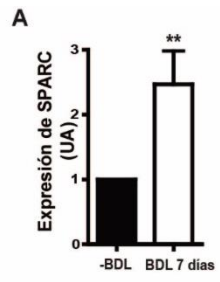


Figura 32 Inducción de la expresión de SPARC en el modelo de ligadura del conducto colédoco.

(A) Análisis de qPCR de muestras de hígado de ratones sometidos a BDL. El ADNc fue sintetizado y sometido a qPCR para evaluar la expresión de los transcritos de SPARC. La cantidad relativa de producto de PCR (UA, unidades arbitrarias) amplificado de muestras de hígados controles fue definida como 1. ****p<0,05 vs. Control (-BDL), test de Mann-Whitney.** (B-G) Imágenes representativas tomadas de secciones de ratones SPARC^{+/-} teñidos para SPARC (C, F; rojo) y SMA (B; verde) o vWF (E; verde) y la superposición de ambas imágenes (D, G). (H-M) Imágenes representativas tomadas a los 7 días de ratones SPARC^{+/-} con ligadura del conducto colédoco teñidos para SPARC (I, L; rojo) y SMA (H; verde) o vWF (K; verde). Flechas: co-expresión de dos marcadores; flechas punteadas: autofluorescencia debida a macrófagos. Magnificación original 400X (¿?) o 1000X (¿?).

Los ratones SPARC^{-/-} mostraron una disminución del daño fibrótico generado por BDL

Decidimos también investigar si deficiencia de SPARC puede influenciar la fibrogénesis hepática en el modelo de ligadura del colédoco. Como resultado, se observó que los ratones SPARC^{+/-} mostraron una distorsión de la arquitectura hepática con muerte celular y desarrollaron expansiones fibrosas prominentes en las áreas periportales, mientras que estos fenómenos se encontraban casi ausentes en los ratones SPARC^{-/-}, como se puede observar con la tinción de hematoxilina eosina y con el tricrómico de Masson (Figura 33A-D). También fue posible medir la magnitud del daño con los niveles de transaminas ALT y AST, que se mostraron elevados en los ratones SPARC^{+/-}, en comparación con los ratones SPARC^{-/-} (Figura 33E).

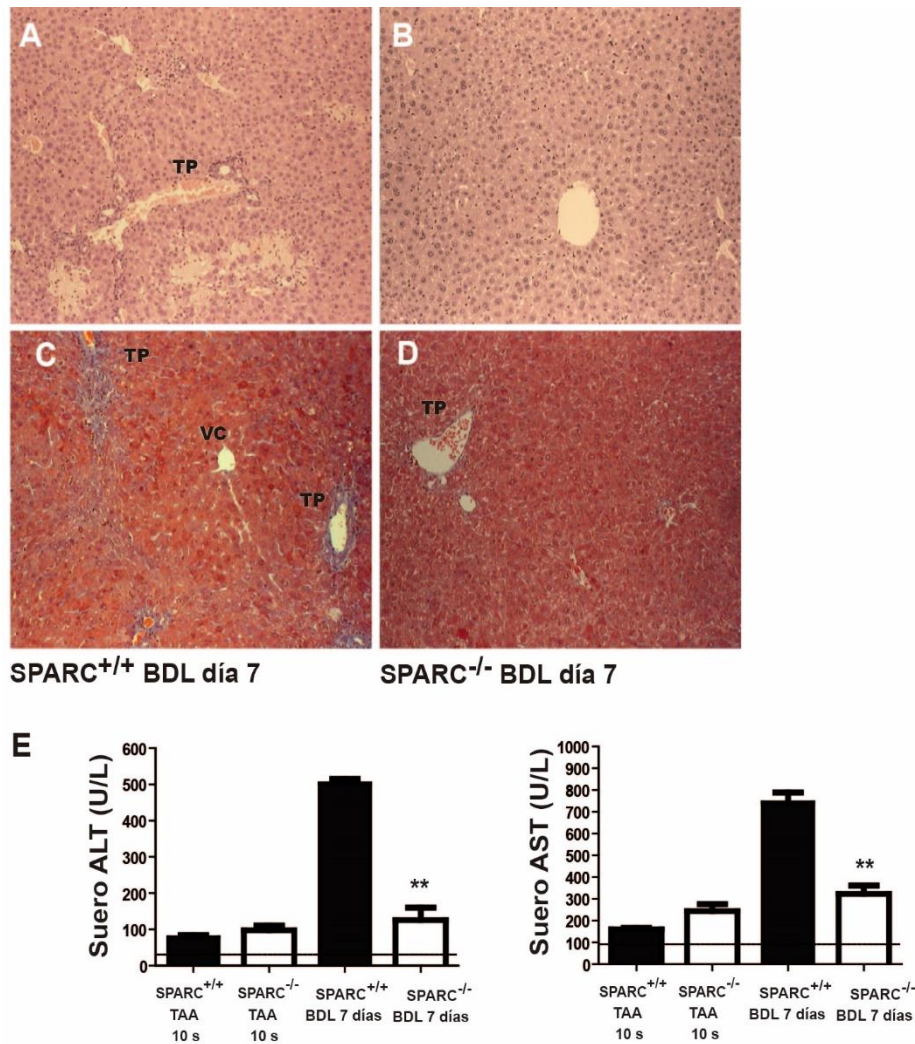


Figura 33 Reducción del daño hepático en ratones deficientes de SPARC en el modelo de 7 días de BDL. (A-D) Fotomicrografías representativas de secciones de hígado de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} sometidos a la ligadura del conducto colédoco y teñidos con H&E (A-B) o tetrómero de Masson (C-D). Magnificación original 200X. TP, tracto portal; VC: vena central. (E) Los niveles de ALT y AST en suero fueron medidos en el modelo del conducto colédoco y comparados con los de TAA. Línea punteada, límite normal. **p<0,05 vs. SPARC^{+/+} tratados

El daño crónico hepático y la fibrogénesis están íntimamente ligados a la muerte de los hepatocitos y la inflamación. Es por ello que se realizó un análisis histopatológico y se observó una reducción significativa en la necrosis focal y en el grado de fibrosis, que se tradujeron en una disminución del índice de Knodell, en ratones SPARC^{-/-} con ligadura del conducto colédoco en comparación con ratones SPARC^{+/+} (Tabla VI).

Tabla VI

	SPARC ^{+/+} BDL 7 Días	SPARC ^{-/-} BDL 7 Días
Hepatitis en la Interface Periportal o Periseptal	1,6±0,5	0,62±0,2
Inflamación focal, apoptosis, necrosis focal, necrosis lítica focal	3,5±0,3	0,75±0,25*
Inflamación portal	2±0,0	1,5±0,3
Fibrosis	2,6±0,2	0,5±0,0*
Puntaje de Knodell	9,75±0,5	3,25±0,3*

Por otro lado, se constató un aumento significativo en los niveles de AST y ALT en los ratones SPARC^{+/+} BDL, en comparación con los SPARC^{-/-} BDL. Consistente con los resultados con TAA, la tinción de rojo Sirio del tejido hepático de los ratones BDL SPARC^{-/-} mostraron niveles significativamente bajos de depósitos de colágeno, en comparación con los BDL SPARC^{+/+}. Mientras que la tinción fue muy tenue en los ratones deficientes para SPARC, se encontraron abundantes depósitos de colágeno dentro de las expansiones fibrosas en las áreas periportales y en el parénquima de los ratones SPARC^{+/+} (Figura 34A). Consistente con los niveles de tinción para rojo Sirio, el nivel de expresión de RNAm de colágeno $\alpha 2(I)$ se encontró significativamente reducido en los ratones deficientes de SPARC, cuando se los comparó con ratones SPARC^{+/+} (6,03±0,67 vs. 10,86±1,08; SPARC^{-/-} vs. SPARC^{+/+}, 34B-C).

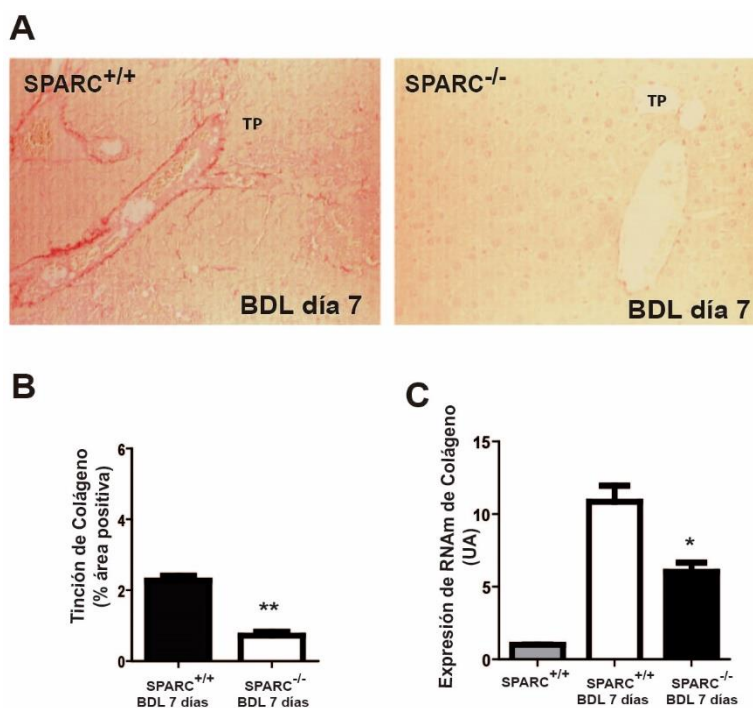


Figura 34 Reducción de la fibrosis en ratones deficientes de SPARC en el modelo de BDL (A) Figuras representativas de secciones hepáticas de ratones SPARC^{+/+} o SPARC^{-/-}, a los 7 días luego de la ligadura del conducto colédoco. Magnificación original: 200X. TP, tracto portal (B) Cuantificación morfométrica de tinción de rojo Sirio mostrando una significativa atenuación del proceso fibrótico en ratones SPARC^{-/-} luego de 7 días de BDL comparados con ratones SPARC^{+/+}. **p<0,01 test de Mann-Whitney. (C) Análisis de qPCR de la expresión de ARNm de colágeno en ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} sometidos a BDL. *p<0,05, vs. SPARC^{+/+} BDL, test de Mann-Whitney.

Los ratones deficientes de SPARC mostraron menor depósito de colágeno en el modelo de BDL

En los ratones SPARC^{-/-} con BDL no se pudieron observar las fibras teñidas con rojo Sirio debido a su espesor reducido y estado inmaduro; así, bajo estas condiciones se veían verdes y fue muy difícil distinguirlas del resto del tejido (Figura 35). Por otro lado, las fibras teñidas con rojo Sirio de los ratones SPARC^{+/+} con BDL se pudieron observar fácilmente con luz polarizada, debido al incremento en su espesor y al estado de maduración; en este caso se observaron verdes o rojas después de aplicar este procedimiento.

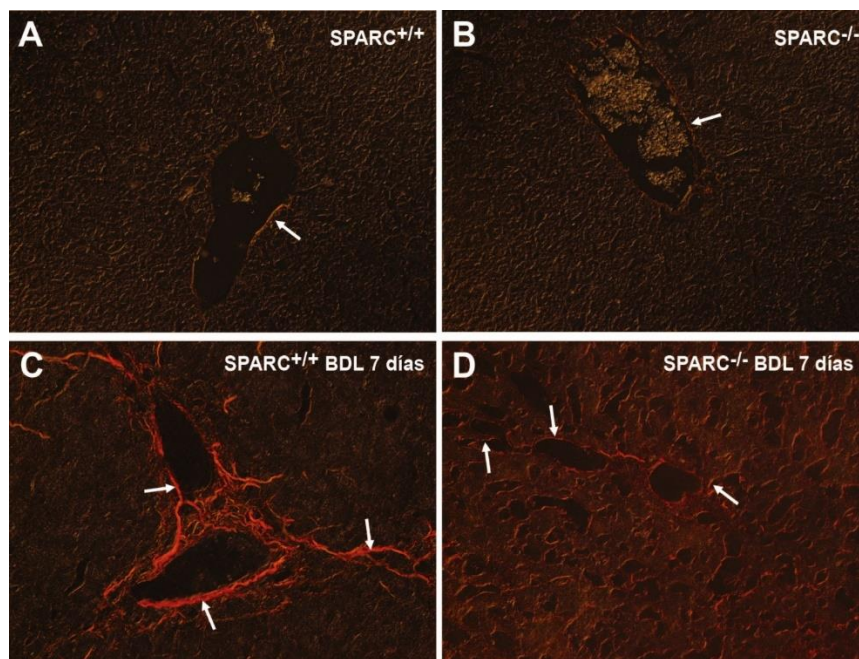


Figura 35 Estado de maduración de las fibras de colágeno en el modelo de BDL.

Figuras representativas mostrando secciones de hígados teñidas con rojo Sirio obtenidos de ratones SPARC^{+/+} (A, C) o SPARC^{-/-} (B, D) (n=6-8) observados bajo luz polarizada. Los animales fueron dejados sin tratar (A,B) o sometidos a BDL (C,D). Nótese la prominencia de fibras maduras y compactas en los ratones SPARC^{+/+} tratados y la apariencia inmadura y fina en los animales SPARC^{-/-}. Magnificación original 400X.

Reducción del número de miofibroblastos activados en hígados fibróticos de ratones SPARC^{-/-} en el modelo de BDL.

La fibrogénesis hepática se caracteriza por la inducción de un proceso de trans-diferenciación de CEH en miofibroblastos. Las CEH derivadas de los miofibroblastos sobre-expresan α -SMA durante su proceso de activación. Para estudiar los cambios en el número de miofibroblastos y/o el nivel de activación de los miofibroblastos, se realizó una tinción inmunohistoquímica para α -SMA en los hígados de ratones sometidos a BDL. Se observó una reducción significativa en los niveles de área inmunoreactiva de α -SMA⁺ en los ratones SPARC^{-/-} comparados con los ratones SPARC^{+/+} (Figura 36A-C). Estos resultados sugieren que la reducción en el número de miofibroblastos activados podría estar involucrado en la inhibición de la fibrogénesis hepática encontrada en los ratones con ausencia de SPARC.

Se sabe que SPARC está involucrado en una especie de retroalimentación positiva con TGF- β 1 (Ford et al., 1993; Reed et al., 1994; Shiba et al., 2001; Wrana et al., 1991), citoquina que cumple un rol crucial en la fibrosis hepática (Bataller and Brenner, 2005). Para analizar en nuestro modelo experimental si la deficiencia de SPARC se asocia a inhibición en la expresión de TGF- β 1, se midió la expresión de RNAm en hígados fibróticos provenientes de ratones con BDL por qPCR. Se observó una inhibición en la expresión de esta citoquina en los ratones SPARC^{-/-}, en comparación con los animales SPARC^{+/+} (Figura 36D). Este resultado sugiere que los efectos inhibitorios de la fibrosis hepática observados en los animales SPARC^{-/-} podrían estar parcialmente mediados por la inhibición de la expresión de TGF- β 1. Todos los datos obtenidos del modelo de BDL nos permiten corroborar los resultados observados anteriormente con el modelo de TAA.

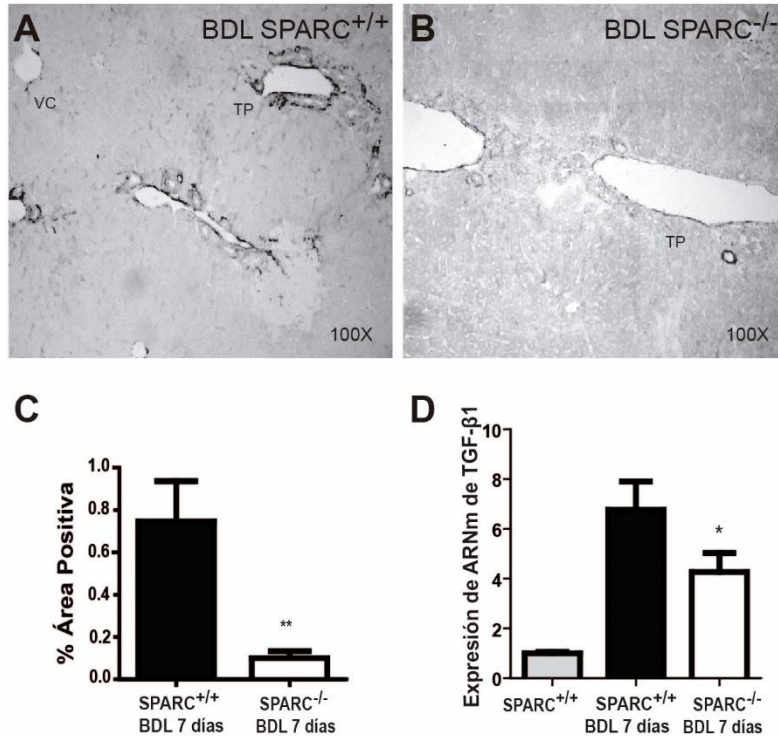


Figura 36 Reducción en el número de miofibroblastos activados y de los niveles de ARNm de TGF-β1 en los ratones deficientes de SPARC.

(A-B) Fotos representativas tomadas de secciones de hígado de ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} con ligadura del conducto colédoco inmunoteñidos con α-SMA. (C) Datos cuantitativos del análisis densitométrico del área de tinción con α-SMA para ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} con ligadura del conducto colédoco. **p<0,01, test de Mann-Whitney. (D) Niveles de ARNm de TGF-β1 obtenidos por análisis de qPCR para animales SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-} con ligadura del conducto colédoco (n=6-8). Los datos fueron expresados como valores relativos a los de ratones SPARC^{+/+} sin tratar. *<0,05, SPARC^{+/+} tratado vs. SPARC^{-/-} tratado, test de Mann-Whitney.

Discusión

Discusión

Parte I

En este trabajo de tesis doctoral demostramos que la expresión de SPARC es inducida a nivel hepático en tres modelos experimentales de daño agudo: el modelo de Con A, el del anticuerpo agonista de CD95 Jo2 y el de Galactosamina/LPS. El hecho de que la inducción sea reproducible en los tres modelos refuerza la importancia de los hallazgos y minimiza la posibilidad de un resultado dependiente del modelo experimental. La expresión de SPARC se encuentra también inducida en los hígados de pacientes con hepatitis alcohólica (típicamente un agudo sobre crónico), pero no en pacientes no cirróticos con hepatitis C crónica o esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Nuestros hallazgos son consistentes con los obtenidos por Bykov *et al.* (Bykov et al., 2007), que observaron que SPARC fue inducida en un modelo animal de hepatitis alcohólica mediante análisis de microarreglos. Además, observamos que la magnitud del daño hepático agudo inducido tanto por Con A como por el anticuerpo agonista de CD95 Jo2 y por GalN/LPS se encontró reducida en ratones SPARC^{-/-}. En consonancia con estos resultados, la atenuación *in vivo* de la expresión de SPARC mediante la utilización de un vector adenoviral que expresa una secuencia antisentido para el ARNm de SPARC fue eficiente para aminorar el daño inducido por Con A, subrayando la contribución de SPARC en este modelo experimental. Incluso los ratones SPARC^{+/-} tratados con Con A mostraron un menor daño que los ratones SPARC^{+/+} y mostrando correlación entre los niveles de SPARC y el daño inducido por Con A. De hecho, se pudo recuperar la susceptibilidad al daño inducido por Con A de ratones SPARC^{-/-} al administrarles AdSPARC, un vector que expresa SPARC. Asimismo, la inhibición *in vivo* de SPARC, usando un siSPARC administrado luego del inicio del daño hepático con Con A mostró un efecto terapéutico, disminuyendo la magnitud de la injuria hepática y aumentando significativamente la supervivencia de los animales tratados.

La migración de linfocitos activados a través de endotelio sinusoidal es un proceso observado comúnmente en las enfermedades hepáticas inflamatorias humanas como por ejemplo la hepatitis autoinmune, patología que es en cierta forma imitada en el modelo de Con A, que es capaz de generar hepatitis aguda a través de una activación potente del sistema inmunitario. En este sentido, hemos observado una reducción significativa en la magnitud del infiltrado inflamatorio hepático compuesto por linfocitos T CD4⁺ luego de la inyección de Con A en ratones SPARC^{-/-}. Esta observación es congruente con lo que observamos en la segunda parte de este trabajo de Tesis Doctoral donde

observamos que las células T CD4⁺ de ratones SPARC^{-/-} presentan una capacidad migratoria disminuida (Atorrasagasti et al., 2013); y es consistente, además, con los resultados de Rempel *et al.* que comunicó que los ratones SPARC^{-/-} presentan un sistema inmunitario comprometido (Rempel et al., 2007a).

El modelo experimental de Con A se caracteriza por la producción excesiva de citoquinas pro-inflamatorias y por la llegada de un masivo infiltrado de células inflamatorias, que deriva en una marcada necrosis hepatocelular y una elevada mortalidad de los animales. El análisis de las concentraciones de las citoquinas IL-6 y TNF- α en suero luego de la inyección de Con A demostró que los animales SPARC^{-/-} presentaron niveles significativamente inferiores, comparados con los obtenidos en los ratones SPARC^{+/+}. Esta observación sugiere que el efecto protector de la inhibición de SPARC podría estar relacionado, al menos en parte, con una atenuación del estado inflamatorio. En este contexto, TGF- β es una citoquina pleiotrópica que desempeña un rol crucial en la injuria hepática aguda y en la inducción de muerte celular por apoptosis en hepatocitos. Si bien los mecanismos de inducción de apoptosis mediados por TGF- β son diversos y no están completamente caracterizados (Cain and Freathy, 2001), se ha observado cooperación con FasL o TNF- α para inducir la apoptosis en hepatocitos. Consistente con el conocido *feedback* positivo entre SPARC y TGF- β 1 (Francki et al., 1999; Wrana et al., 1991; Zhou et al., 2005), los ratones SPARC^{-/-} tratados con Con A mostraron una caída significativa en la expresión de TGF- β 1, comparados con los ratones SPARC^{+/+}, lo que refleja la modulación de la inducción de TGF- β 1 mediada por SPARC y se podría relacionar con la caída en los niveles de apoptosis hepatocitaria en los ratones SPARC^{-/-} tratados con Con A.

Por otro lado, la inflamación y el daño de las LSEC preceden a la infiltración de linfocitos activados y a la injuria de hepatocitos mediada por citoquinas (Yang et al., 2010). Luego de la administración de Con A se indujo una marcada expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 en los hígados de ratones SPARC^{+/+}. Por el contrario, en los ratones SPARC^{-/-}, se encontró una notable disminución de la inflamación sinusoidal puesta en evidencia por la expresión de VCAM-1 mediante inmunofluorescencia. La Con A interacciona en un primer momento, luego de su administración *in vivo*, con los residuos de manosa de las células LSEC al llegar al hígado (Knolle et al., 1996), así como también participa de la activación de células T que muestran citotoxicidad hacia las LSEC. Dado que el daño de las LSEC precede a la infiltración y al daño de los hepatocitos, decidimos analizar el estado de la monocapa de LSEC mediante microscopía electrónica. Como resultado de este análisis se

encontró que la estructura de las LSEC se hallaba desorganizada en los ratones SPARC^{+/+} (propio de este modelo experimental)(Knolle et al., 1996), pero permanecía bien preservada en los ratones SPARC^{-/-}. Estos hallazgos nos permitieron enfocar una parte de nuestras investigaciones sobre los mecanismos de protección del daño que se observa ante la disminución o ausencia de SPARC en las LSEC.

Parte de las propiedades adhesivas de las células se mantienen por una adecuada interacción con componentes de la MEC y cualquier modificación de esta interacción dinámica está usualmente acompañada de cambios en el citoesqueleto de filamentos de actina. Considerando que SPARC es protagonista del proceso de adhesión celular y que participa del desmontaje de las adhesiones focales en células endoteliales de aorta (Murphy-Ullrich et al., 1995), procedimos a analizar los efectos de la Con A sobre el citoesqueleto de células HMEC-1, en las que pudimos confirmar la expresión de SPARC e inhibirla eficientemente con siSPARC. En concordancia con otros autores, la inhibición de SPARC resultó en un incremento del número de células adheridas (Murphy-Ullrich et al., 1995), en una mejor organización del citoesqueleto y en una reducción del proceso de trans migración de linfocitos activados a través de una capa de células HMEC-1 tratadas con Con A. Estos resultados sugieren que la ausencia de SPARC se asocia a una barrera endotelial sinusoidal mas preservada que aminora la magnitud del daño hepático en el modelo de Con A.

La Con A puede inducir daño endotelial independiente de células T a través de apoptosis mediada por autofagia, como se demostró previamente en ratones SCID/NOD y en células HMEC-1 (Chang and Lei, 2008; Yang et al., 2010). Bhoopathi *et al.* mostraron que al aumentar los niveles de SPARC en células de tumores neuroectodermales primitivos, PNET, ocurría inducción de autofagia seguida de apoptosis (Bhoopathi et al., 2010). Por otro lado, también se ha reportado que SPARC potencia la apoptosis a través de la caspasa 8 en células de cáncer de colon (Tang and Tai, 2007b) e induce apoptosis en células de cáncer de ovario (Yiu et al., 2001). En concordancia con los trabajos expuestos, la inhibición de la expresión de SPARC en células HMEC-1 descrita en este trabajo fue exitosa en disminuir las tasas de autofagia y apoptosis inducidas por Con A. Estas observaciones sobre la disminución de la autofagia en nuestro modelo experimental debe tomarse con precaución, ya que el proceso autofágico en el hígado es complejo y existe evidencia que soporta el concepto de que la inducción de la autofagia es considerada protectora frente a diferentes agentes que ocasionan injuria de los hepatocitos (Mizushima and Komatsu, 2011).

Por otro lado, nuestros resultados de microarreglos de cDNA sugieren que la reducción en el daño hepático observado en ratones deficientes de SPARC se debe a la suma de diferentes mecanismos más que al efecto del cambio de expresión en un grupo reducido de genes específicos. Consistente con los resultados del ensayo de faloidina, observamos en los ratones SPARC^{-/-} la inducción de CAPZB y tropomiosina 4 (Tpm4), que estabilizan los filamentos de actina y juegan un rol en la regulación de la morfología celular y la organización del citoesqueleto. Este resultado coincide con los de Bhoopathi *et al.* (Bhoopathi et al., 2011), que describen a SPARC como un efector de la desorganización del citoesqueleto inducida por Scr en células de meduloblastoma. Asimismo, nuestro mejor modelo de red de interacción de genes generado por IPA mostró que la reducción de SPARC estaría asociada con la inducción del gen CAPZB, involucrado en la regulación de la morfología celular y la organización del citoesqueleto (Bai et al., 2011), y TUBB2B, que es un componente de los microtúbulos. Los resultados también mostraron la inhibición de TMSB10 que regula la dinámica de actina secuestrando G-actina, guiando a la desestabilización de actina y a la apoptosis en células tumorales (Kim et al., 2012). Además, en los ratones SPARC^{-/-} hay una represión de la expresión del gen SSH1 que desfosforila y activa cofilina, que es un factor de ligado/despolarización de actina y cuya función es estimular el desensamblaje de estos filamentos (Kaji et al., 2003). Otro gen importante que se encontró reprimido es TNFRSF14, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, que podría mediar las vías de transducción de señales activadores de la respuesta inmunitaria gatillada por la administración de Con A (Ware and Sedy, 2011).

Para este trabajo de tesis se han empleado diferentes modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* en los que se demostró el papel de SPARC como una proteína clave en el daño hepático agudo. En los modelos *in vivo* de Con A, anti-CD95 y GalN/LPS observamos que la ausencia de SPARC se asocia a una marcada inhibición del daño hepático manifestado por una menor actividad necro-inflamatoria hepática. Asimismo, en el modelo de Con A también observamos menor infiltrado de células T CD4⁺, disminución de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6, así como también una disminución de los eventos apoptóticos en el hígado. El análisis por microscopía electrónica puso en evidencia que los animales SPARC^{-/-} tratados con Con A presentaban una monocapa de células endoteliales bien preservada en comparación con los animales con expresión normal de SPARC. Además, pudo observarse que existe una menor expresión de VCAM-1 en las células del endotelio vascular sinusoidal hepático, lo que refleja una menor activación/inflamación

endotelial. Los estudios realizados *in vitro* con la línea de células endoteliales vasculares HMEC-1 a las que se les inhibió la expresión de SPARC mediante un vector lentiviral que expresaba un siRNA anti-SPARC, mostraron menor nivel de apoptosis y una resistencia al efecto estimulador de la autofagia inducido por Con A. En estudios de transmigración linfocitaria se pudo mostrar que la inhibición de SPARC en una monocapa de células endoteliales vasculares disminuye sustancialmente el paso de linfocitos activados a través de ella. Un estudio por microarreglos de cDNA realizado con muestras de tejido hepático reveló la presencia de distintas redes de genes que podrían desempeñar un rol importante en el efecto hepatoprotector de la ausencia de SPARC. Estos genes se relacionaron con procesos tales como apoptosis, adhesión y organización del citoesqueleto. Los efectos de protección del daño hepático, asociados a la ausencia o disminución de la expresión de SPARC, podrían estar relacionados con un efecto directo sobre el endotelio sinusoidal hepático, que es primer blanco del efecto tóxico de la Con A, preservándolo del daño, disminuyendo su activación inflamatoria y preservando su citoarquitectura. En suma, todos estos cambios disminuirían la llegada de células del sistema inmunitario activadas y los efectos que estas ejercen sobre el tejido hepático en lo que respecta a inflamación, apoptosis y necrosis hepatocitaria.

Parte II

Al estudiar los efectos de SPARC en el daño crónico hemos observado previamente que los ratones SPARC^{-/-} muestran una reducción en el daño y el grado de fibrosis inducida por TAA al compararlo con ratones SPARC^{+/+} (Atorrasagasti et al., 2013). Además, los ratones SPARC^{-/-} mostraron menor daño hepático agudo luego del tratamiento con Con A, anticuerpo agonista de CD95, o GalN/LPS como se vio en el capítulo anterior (Peixoto et al., 2015). En esta parte del trabajo de tesis se exploró el rol mecánico de SPARC en el daño agudo y crónico.

Con el fin de encontrar mecanismos a partir de los cambios en el perfil de expresión de genes que pudieran explicar el efecto protector de la ausencia de SPARC ante el daño inducido por TAA se realizó un experimento de microarreglos de ADNc. Se encontró un grupo de genes que mostraron una expresión diferencial entre los ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-}, los cuales podrían ser candidatos para explicar la protección. Nuestros resultados sugieren nuevamente que la reducción en la fibrosis observada en los ratones SPARC^{-/-} parecen ser más el resultado de una suma de varios mecanismos más que el efecto de cambios en un grupo pequeño de genes específicos. Dado el número de genes

diferencialmente expresados encontrados, tomamos el camino de comparar redes de interacción de genes en vez de analizar la expresión de cada gen en particular.

Dentro de la lista de genes que mayor expresión diferencial presentaron en los ratones SPARC^{-/-} con respecto a los ratones SPARC^{+/+} encontramos genes candidatos para explicar la protección ante un insulto a la función hepática. Un gen candidato a la protección podría ser LOXL4, un blanco de TGF-β1 y a la vez descrito como un regulador negativo de TGF-β1, que se encuentra sobre-expresado en ratones SPARC^{-/-}, y que causa una reducción en la movilidad de las células de HCC mediada por TGF-β (Kim et al., 2008). Además USP2 se encontró reprimido en los ratones SPARC^{-/-}, y esta caída en la expresión podría ejercer un efecto protector ya ha sido comunicado que la represión de este gen deja a los hepatocitos menos susceptibles a la apoptosis mediada por TNF (Haimerl et al., 2009). Otro de los genes reprimidos fue CCL19, una quimiocina conocida por atraer células dendríticas y linfocitos (Bromley et al., 2005; Reif et al., 2002; Robbani et al., 2000), que podría estar relacionado con la reducción de la inflamación observada en los ratones SPARC^{-/-} luego del tratamiento con TAA. Sin embargo, no se observa una diferencia significativa en la expresión de CCL19 luego de 10 semanas de tratamiento con TAA, lo que nos permite especular que la baja expresión de los niveles de CCL19 en los ratones SPARC^{-/-} al principio de la injuria inducida con TAA podría ser crítica para la subsiguiente generación de inflamación, y posterior fibrogénesis. Asimismo, la cantidad de infiltrado inflamatorio de células CD4⁺ fue marcadamente reducida en los ratones SPARC^{-/-} y también lo fue la capacidad migratoria de sus esplenocitos hacia la quimiocina CCL19, que lleva a especular que la menor fibrosis en estos animales podría ser mediada, por lo menos en parte, por una reducción del efecto inflamatorio. Estos resultados son consistentes con los de Rempel *et al.*, que reportaron que los ratones SPARC^{-/-} presentan un sistema inmunitario dañado (Rempel et al., 2007a). Además, el receptor de CCL19 se expresa en CEH y se demostró que su activación induce la capacidad de migración de estas células (Sahin et al., 2010), siendo esta una característica relevante en la fibrosis hepática (Atorrasagasti et al., 2011). Con el tratamiento prolongado con TAA, se encontró que CIDEC, un potente inductor de apoptosis (Tang et al., 2011; Yonezawa et al., 2011), está entre los genes más reprimidos en los ratones SPARC^{-/-}.

Estudiando las redes de interacción de genes diferencialmente expresados mediante IPA, pudimos comprobar vías de interacción de genes involucradas en el fenotipo de los ratones SPARC^{-/-} funcionalmente descrito. De hecho, los ratones SPARC^{-/-} y SPARC^{+/+} naïve parecen diferenciarse

significativamente en su perfil de expresión de genes. Como se discutió previamente (Atorrasagasti et al., 2013), hay una retroalimentación positiva entre SPARC y TGF- β 1 (Francki et al., 2004). Nuestro modelo de IPA con mayor score mostró que la ausencia de SPARC está asociada con un incremento en los niveles de SOX9, que podría estar mediado por la vía de señalización de TGF- β 1. SOX9 es un factor de transcripción involucrado en el desarrollo del hígado, y contribuye a la preservación de la fisiología hepática (Furuyama et al., 2011). Sin embargo, un estudio previo sugiere que SOX9 cumple un rol como factor transcripcional regulador de la fibrogénesis, promoviendo el depósito de MEC (Hanley et al., 2008). Además, la red expuesta establece una relación con los genes CDYL y EHMT1 que codifican para metilasas de histonas y acetilasas que podrían estar relacionadas con la función reguladora del gen SOX9. Además, en nuestro modelo se observa una interacción e inducción entre SOX9 y cadherina E, que también se encuentra sobre-expresada en el hígado de ratones naïve deficientes en SPARC. La cadherina E es una importante proteína de adhesión célula-célula y es considerada, entre otras funciones, como un marcador de CEH no activadas (Lim et al., 2007). La claudina I, una proteína de las uniones estrechas, es otra proteína de adhesión que también se encontró sobre-expresada en los ratones SPARC^{-/-} y en la red se visualiza que interacciona y se activa mutuamente con cadherina E. Estas observaciones adquieren importancia en nuestro modelo, ya que las uniones estrechas se confinan a las células epiteliales, formando cinturones continuos a su alrededor y sirviendo como una barrera física para regular el transporte a través del espacio paracelular. Otro importante evento mostrado en la red de interacción de genes es la disminución de CCL19 en los ratones SPARC^{-/-}, que podría estar relacionado en la observación de la reducción de reclutamiento de linfocitos y en el proceso inflamatorio en los ratones SPARC^{-/-}, como describimos previamente. La disminución de actividad de CCL19 está también relacionada con varios represores transcripcionales, con los factores de respuesta a estrés (como HSF4, ZHX2), y con la vía de ERK1/2, que también se encontró inhibida. Los ratones SPARC^{-/-} presentan un incremento en los niveles de expresión de secretasa gamma (complejo proteasa) y su proteína asociada al complejo, APH1B, como así también PAG1 (una proteína que se fosforilaría por la secretasa gamma), pudiendo también incluir cambios en la vía de señalización de Notch. La secretasa gamma y PAG1 podrían estar también involucradas en la regulación de la activación de células T. En síntesis, nuestros resultados apoyan el concepto de que las condiciones basales en el contexto de la ausencia de SPARC hacen al hígado menos susceptible a insultos externos, como por ejemplo los causantes de la fibrosis hepática.

Además de que el fenotipo de los ratones SPARC^{-/-} pueden estar influenciados por las condiciones basales, los resultados aportados por los análisis de redes de interacción provenientes de muestras obtenidas de animales tratados con TAA sugieren que los ratones SPARC^{-/-} presentan una maquinaria más intacta o mejor preparada para reparar el ADN o detoxificación como lo sugiere la sobre-expresión de genes como ATM, BRCA1, BRCA2 y BARD1. ATM es un sensor del daño al DNA y fosforila a p53 (un supresor tumoral, que puede activar la apoptosis y detener el ciclo celular si el daño del ADN no es resuelto) (May and May, 1999). Además, el *knockout* de ATM afecta la supervivencia celular y la regeneración del hígado (Lu et al., 2005). Asimismo, BRCA1 en complejo con BARD1 presenta propiedades supresoras tumorales y está implicado en la ubiquitinación de proteínas para la degradación. Además, necesita formar un complejo con BRCA2, también sobre-expresado, para reparar el ADN. Ha sido comunicado que TGF-β1/Smad3 contrarrestan la reparación del ADN mediada por BRCA1 (Dubrovskaya et al., 2005) y su expresión (Satterwhite et al., 2000). Nuestros resultados, que muestran la sobre-expresión de BRCA1 y proteínas relacionadas efectoras de la reparación del DNA, son consistentes con la reducción observada en los niveles de TGF-β1 encontrados en nuestro estudio. ATM podría aumentar, vía PI3K, la sobre-expresión del gen de ABCC4 que se constata sobre-expresado en ratones SPARC^{-/-} y es un transportador ABC involucrado en la remoción de químicos, xenobioticos y productos del estrés oxidativo, así como también en el eflujo de GSH y sales biliares a través de la membrana basolateral de los hepatocitos (Rius et al., 2003). El GSH exportado podría estar mediando protección contra el daño oxidativo en el tejido. Ha sido publicado que la expresión de este transportador en los hepatocitos centrilobulares se incrementó en ratones que recibieron dosis hepatotóxicas de acetaminofeno o CCl₄ (Aleksunes et al., 2006), y que su inducción con un pretratamiento con acetaminofeno se correlacionó con la protección al daño ante mayores dosis de este fármaco (Aleksunes et al., 2008). Por lo tanto, la sobre-expresión de ATM o de algún componente de su factor transcripcional relacionado, el complejo BRCA, como así también el cambio de expresión en sus efectores específicos sugiere el establecimiento de una maquinaria más eficiente para reparar defectos en el ADN que resulta en una mayor protección de las células hepáticas. Estos mecanismos, junto con la actividad mediada por ABCC4 podría explicar la reducción en el daño hepático y fibrosis subsecuente observada en los ratones SPARC^{-/-}.

Los hepatocitos se hallan normalmente en una fase G₀, en estado quiescente. La proliferación celular es un paso crítico para superar el daño hepático inducido por diferentes causas como la exposición

a tóxicos, hepatectomía parcial o infección viral, recuperando su masa y función rápidamente (Mangipudy et al., 1995; Mangipudy et al., 1996; Michalopoulos and DeFrances, 1997). En este sentido, nuestro análisis de microarreglos también reveló que un número de genes relacionados con la proliferación y el ciclo celular se encontraron significativamente sobre-expresados en los ratones SPARC^{-/-}, en comparación con los ratones SPARC^{+/+}. Los genes sobre-expresados en los ratones SPARC^{-/-} incluyeron a PCNA, una proteína auxiliar de la DNA polimerasa delta, que se utiliza como indicador de un incremento de la transición G₁/S luego de la injuria (Theocharis et al., 1994); a E2F1, un gen que puede mediar tanto la proliferación y la apoptosis dependiente o independiente de p53; a CDT1, involucrado en la formación del complejo de pre replicación y necesario para la replicación de ADN; a CDK2, esencial para la transición de fase de ciclo G₁/S; a PRIM1 y PRIM2, las polimerasas que sintetizan pequeños primers de RNA, necesarios para generar los fragmentos de Okazaki durante la replicación discontinua de ADN, y MCM2 a MCM7 involucrados en la iniciación de la replicación del genoma eucariótico. La observación de que los ratones SPARC^{-/-} presentan una expresión alta en el hígado de un número de genes relacionados con la división celular luego de la injuria podría explicar parcialmente el efecto protector de la ausencia de SPARC. Estos resultados están de acuerdo con el rol anti-proliferativo de SPARC, arretando células en la fase de la división celular G₀, en diferentes tipos celulares y patologías, incluidas células tumorales (Framson and Sage, 2004; Motamed et al., 2003; Motamed and Sage, 1998). El mecanismo por el cual SPARC inhibe la proliferación se relacionó con la alteración de vías de señalización por diversos mecanismos, incluyendo la interacción con los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Motamed et al., 2002), la inhibición de la ciclina quinasa dependiente E-ciclina (CDK2), la inhibición de la ciclina A, y la inhibición de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Raines et al., 1992). Nuestros resultados sugieren que los ratones SPARC^{-/-} tienen un fenotipo que favorece una respuesta potente de proliferación de los hepatocitos a la injuria tóxica como se ve con el aumento de niveles de expresión PCNA.

No hay estudios publicados en relación con los efectos de la ausencia de SPARC sobre factores de regeneración hepática. Nuestros análisis por RT-PCR en tiempo real mostraron que los niveles de expresión de HGF en el daño agudo y crónico, los niveles de IGF-1 en el daño agudo, y los niveles de IL-6 en el daño crónico se encontraban significativamente sobre-expresados en los ratones SPARC^{-/-}, comparados con los SPARC^{+/+}. La IL-6 es una citoquina crítica para la regeneración de los hepatocitos luego de la injuria (Cressman et al., 1996; Kovalovich et al., 2000). Previamente, Francki

et al. observaron que las células mesangiales SPARC^{-/-} presentaban un aumento de IGF-1 y 2 en comparación con las células SPARC^{+/+} (Francki et al., 2003). Además, la señalización de HGF/c-met es esencial para la regeneración hepática (Borowiak et al., 2004; Huh et al., 2004; Ogura et al., 2001) y juega un rol clave activando las vías de señalización de MEK/Erk que controlan la progresión del ciclo celular y los mecanismos regenerativos (Talarmin et al., 1999). En línea con estos trabajos, se comunicó que SPARC es inhibido durante la fase de remodelación en la regeneración hepática (Nygard et al., 2015). Estas observaciones contribuyen a comprender el incremento en factores de crecimiento observada en los ratones SPARC^{-/-} luego de las diferentes injurias. Estos efectos deben tomarse con precaución ante una eventual estimulación del crecimiento del HCC. Sin embargo, observamos anteriormente que la inhibición de SPARC no modifica el crecimiento de HCC *in vitro* (Atorrasagasti et al., 2010). Además, demostramos que la inhibición de SPARC en células HepG2 no influye en el crecimiento tumoral *in vivo* (Atorrasagasti et al., 2010). Por otro lado, si quisiese explorarse desde el punto de vista terapéutico la inhibición de SPARC a nivel hepático en el contexto de una falla hepática aguda, la corta duración de la estrategia inhibitoria minimizaría cualquier evento hipotético de estímulo del crecimiento maligno.

Se demostró previamente que el efecto pro oxidativo de la TAA es el resultado de la generación de ROS (Andres et al., 2003; Chilakapati et al., 2007; Stankova et al., 2010), y que la detoxificación de ROS mediante antioxidantes previenen la hepatitis luego del tratamiento con Con A (Shirin et al., 2010). Los resultados de nuestro análisis proteómico mostraron que los ratones SPARC^{-/-} sobre-expresan proteínas relacionadas con la detoxificación de ROS como la catalasa, la peroxirredoxina-1, y la glutatión S-transferasa Mu1. Es importante mencionar que la actividad *in vivo* de la catalasa se reduce luego de administrar CCl₄ en ratones, y la sobre-expresión *in vitro* de catalasa en CEH inhibió el estado de activación de estas (Dong et al., 2014); la catalasa tiene la habilidad de convertir peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno, bajando los niveles de ROS. Otra proteína hepática que fue identificada en el estudio proteómico es la peroxirredoxina-1, que juega un rol crítico en mantener la homeostasis redox celular (Bae et al., 2011). En concordancia con estas observaciones, la glutatión S-transferasa Mu1, una proteína responsable para la detoxificación de toxinas y productos del estrés oxidativo, se vio también incrementada en ratones SPARC^{-/-} en comparación con ratones SPARC^{+/+}, y probablemente tiene un efecto sinérgico con la S-adenosil metionina para detoxificar el hígado de los ratones crónicamente intoxicados con TAA (Mesa et al., 1996; Murray et al., 2015). Además, la isoforma tipo-1 de la S-adenosilmetionina sintasa, una importante fuente

de grupos metilo para diversas metilaciones biológicas, es sobre-expresada en los ratones SPARC^{-/-}. La ausencia de metionina adenosiltransferasas (MATs) en los ratones predisponen para la injuria del hígado (Lu et al., 2001). Previamente se observó que los ratones N-metiltransferasa^{-/-} desarrollaron hepatitis crónica (Lu et al., 2001). Entonces, el repertorio de proteínas sobre-expresadas en los ratones SPARC^{-/-} está en consonancia con una reducción en la inducción de ROS luego de la injuria.

Otras proteínas detectadas en el análisis proteómico y sobre-expresadas en los ratones SPARC^{-/-} en comparación con los ratones SPARC^{+/+} importantes de mencionar son la 3-ketoacil-CoA tiasa, una enzima que participa en la beta-oxidación de ácidos grasos de cadena larga; el factor de iniciación eucariótico 4A-I, que es una helicasa de ARN ATP-dependiente y que es una subunidad del complejo eIF4F requerida para el pegado a ARNm, y la AnexinaA3, que también fue altamente expresada en los ratones SPARC^{-/-}. Se comunicó previamente que la Anexina A3 es expresada en hígados en regeneración y estimulada por HGF (Harashima et al., 2008). Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar su rol en nuestros modelos animales. La fructosa 1,6 bifosfatasa 1 que cataliza la hidrólisis de la fructosa está sobre-expresada en ratones SPARC^{-/-}. Se ha observado que la fructosa 1,6 bifosfato protege a los hepatocitos aislados de ratas contra la toxicidad de D-galactosamina (Roig et al., 1994).

Por otro lado, la actividad de la catalasa hepática está elevada en los ratones *naïve* SPARC^{-/-}. Considerando que la TAA tiene la capacidad de producir metabolitos reactivos como el óxido de S-tioacetamida, inducir ROS, y llevar a la necrosis y apoptosis de hepatocitos, la alta actividad de catalasa observada en los ratones SPARC^{-/-} podría explicar en parte el efecto protector contra la inducción de ROS por TAA. El perfil antioxidante observado en ratones SPARC^{-/-} a nivel proteómico fue corroborado por cambios en los niveles de ROS con ensayos de diclorofluoresceína y por estudios de carbonilación.

La enzima superóxido dismutasa, NADH, glutatión, y catalasa citosólica normalmente detoxifican el ROS mitocondrial. La producción de ROS y la incapacidad celular para detoxificar ante la injuria, podría favorecer su acumulación en la mitocondria y en un incremento del estrés oxidativo a nivel celular. ROS tiene la habilidad de causar una variedad de respuestas celulares desde una interrupción transitoria o permanente en el crecimiento celular, hasta apoptosis o necrosis, dependiendo de sus niveles. Nuestros resultados muestran un incremento en la actividad del complejo I, II, III y IV en los ratones SPARC^{+/+}. Dado que la actividad mitocondrial también es

generadora de ROS, estas observaciones podrían explicar el incremento de ROS y el daño mitocondrial que fue detectado en microfotografías electrónicas de los hígados de ratones SPARC^{+/+}. Estos resultados son consistentes con los de Socha *et al.* que comunicaron una caída en la producción de ROS en riñones de ratones SPARC^{-/-} (Socha et al., 2007). También están en línea con las observaciones de que SPARC podría ser requerido para la producción de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en fibroblastos tratados con TGF-β (Shibata and Ishiyama, 2013).

En resumen, en la presente tesis se muestra evidencia de un rol esencial de SPARC en la proliferación de hepatocitos, en la inducción de ROS y en la regeneración del hígado luego del daño. Además, este estudio sugiere que la inhibición de SPARC podría ser un importante blanco terapéutico para la protección hepática en el daño hepático agudo y crónico.

Conclusiones

Conclusiones

Parte I

- 1) SPARC se sobre-expresa a nivel hepático en los 3 modelos experimentales de daño hepático agudo estudiados en este trabajo y en pacientes con hepatitis alcohólica.
- 2) La ausencia de SPARC protege del daño hepatocelular inducido por Jo2, GalN/LPS y Con A, y se traduce en una significativa disminución de la necro-inflamación hepática.
- 3) Los animales SPARC^{-/+}, al presentar menores niveles de SPARC que un ratón SPARC^{+/+} experimentan también menor daño, mientras que en ratones SPARC^{-/-} la restitución parcial de la expresión de SPARC (mediante el empleo del vector AdsSPARC) vuelven a ser susceptibles al daño.
- 4) La protección ante el daño inducido por Con A en ausencia de SPARC se pone de manifiesto por: menor actividad necro-inflamatoria hepática, menor infiltrado de células T CD4⁺, disminución de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6 y TGF- β , y disminución de la apoptosis.
- 5) La monocapa de células endoteliales sinusoidales se encuentra preservada en los animales SPARC^{-/-}.
- 6) La inhibición de SPARC *in vitro* sobre células endoteliales vasculares disminuye el grado apoptosis y de autofagia inducidos por Con A.
- 7) El nivel de trans migración de esplenocitos a través de una capa de células HMEC con inhibición de la expresión de SPARC (mediante el empleo del vector lentiviral siSPARC) se reduce significativamente.
- 8) La activación de la molécula de adhesión VCAM-1 es menor en los ratones SPARC^{-/-} que la observada en los animales SPARC^{+/+} cuando son sometidos a la acción de Con A.
- 9) El estudio de microarreglos de cDNA pone en evidencia la existencia de cambios en la expresión de genes que se relacionan con apoptosis, adhesión y organización del citoesqueleto.
- 10) La inhibición *in vivo* de la expresión de SPARC mediante herramientas de terapia génica disminuye la magnitud del daño inducido por Con A, tanto preventiva como terapéuticamente.

La información generada en este trabajo de tesis doctoral en relación con el estado del endotelio sinusoidal hepático nos permitirían generar un modelo que explicaría, en parte, la protección al daño de Con A en ausencia de SPARC:

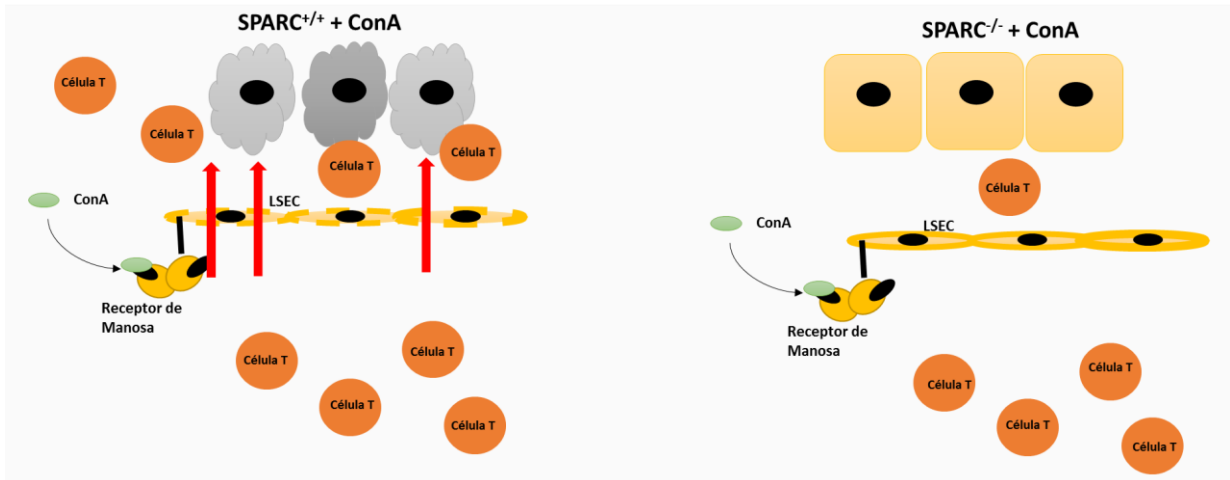


Figura 37 Modelo

La nueva evidencia que aporta este trabajo implica la reducción en el daño por necroinflamación hepática en ausencia de SPARC. Esta reducción podría explicarse en parte por una capa celular endotelial intacta con niveles bajos de autofagia y apoptosis y un mejor estado de la citoarquitectura que podría prevenir la trans migración de infiltrado inflamatorio.

Parte II

- 1) El estudio de genómica funcional de ratones *background* pone en evidencia la existencia de cambios en la expresión de genes que se relacionan con procesos inflamatorios y con proteínas de la unión célula-célula y célula-matriz extracelular.
- 2) El estudio de genómica funcional de ratones tratados durante 10 semanas con TAA pone en evidencia la existencia de un aumento en la expresión de genes implicados en la reparación del DNA y la proliferación celular en los ratones SPARC^{-/-}.
- 3) Los ratones SPARC^{-/-} muestran una disminución en el grado de infiltración inflamatoria en el hígado con daño crónico, tanto por una caída en los niveles de CD4⁺, como por una menor migración de esplenocitos hacia la quimiocina CCL19

- 3) Los ratones SPARC^{-/-} revelaron un incremento en la expresión de genes relacionados con la proliferación celular (PCNA, IGF-1, HGF, IL-6).
- 4) El perfil del proteoma hepático reveló la inducción de proteínas de la vía de detoxificación de especies reactivas del oxígeno, proteínas relacionadas con la transferencia de grupos metilo, proteínas involucradas con la regulación del ciclo celular y con el metabolismo.
- 5) Los ratones SPARC^{-/-} presentan mayor actividad catalasa que los SPARC^{+/+}.
- 6) Los hepatocitos SPARC^{-/-} presentan menores niveles de especies reactivas del oxígeno que los ratones SPARC^{+/+} tratados con TAA.
- 7) Los ratones SPARC^{-/-} presentan menor nivel de proteínas carboniladas que los ratones SPARC^{+/+}.
- 8) La ausencia de SPARC está asociada con una menor producción de óxido nítrico y mayor protección de la arquitectura y la función de las mitocondrias de ratones tratados con Con A.
- 9) SPARC se sobre-expresa a nivel hepático en pacientes con fibrosis y en el modelo de ligadura del conducto colédoco en ratones.
- 10) La ausencia de SPARC protege del daño fibrogénico inducido por la ligadura del conducto colédoco y se traduce en menores áreas de fibrosis, necrosis y una disminución en los niveles de transaminasas.
- 11) La protección ante la ligadura del conducto colédoco en ausencia de SPARC se pone de manifiesto por una menor fibrosis, menor expresión de colágeno, menor madurez de las fibras de colágeno presentes, menor número de miofibroblastos activos y menores niveles de TGF-β1.

Los resultados alcanzados en este trabajo de tesis nos permiten proponer a SPARC como una potencial nueva diana terapéutica para disminuir la magnitud del daño hepático agudo y el proceso fibrogénico hepático.

Bibliografía

Bibliografía

- Adler, V., Yin, Z., Tew, K.D., and Ronai, Z. (1999). Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18, 6104-6111.
- Aleksunes, L.M., Campion, S.N., Goedken, M.J., and Manautou, J.E. (2008). Acquired resistance to acetaminophen hepatotoxicity is associated with induction of multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4) in proliferating hepatocytes. *Toxicological sciences* 104, 261-273.
- Aleksunes, L.M., Scheffer, G.L., Jakowski, A.B., Pruijboom-Brees, I.M., and Manautou, J.E. (2006). Coordinated expression of multidrug resistance-associated proteins (Mrps) in mouse liver during toxicant-induced injury. *Toxicological Sciences* 89, 370-379.
- Anderson, W.F. (2000). Gene therapy scores against cancer. *Nature medicine* 6, 862-863.
- Ando, K., Moriyama, T., Guidotti, L.G., Wirth, S., Schreiber, R.D., Schlicht, H.J., Huang, S.N., and Chisari, F.V. (1993). Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *The Journal of experimental medicine* 178, 1541-1554.
- Andres, D., Sanchez-Reus, I., Bautista, M., and Cascales, M. (2003). Depletion of Kupffer cell function by gadolinium chloride attenuates thioacetamide-induced hepatotoxicity. Expression of metallothionein and HSP70. *Biochemical pharmacology* 66, 917-926.
- Antoniades, C.G., Berry, P.A., Wendon, J.A., and Vergani, D. (2008). The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *Journal of hepatology* 49, 845-861.
- Arias, M., Sauer-Lehnen, S., Treptau, J., Janoschek, N., Theuerkauf, I., Buettner, R., Gressner, A.M., and Weiskirchen, R. (2003). Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC gastroenterology* 3, 29.
- Atorrasagasti, C., Aquino, J.B., Hofman, L., Alaniz, L., Malvicini, M., Garcia, M., Benedetti, L., Friedman, S.L., Podhajcer, O., and Mazzolini, G. (2011). SPARC downregulation attenuates the profibrogenic response of hepatic stellate cells induced by TGF-beta1 and PDGF. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 300, G739-748.
- Atorrasagasti, C., Malvicini, M., Aquino, J.B., Alaniz, L., Garcia, M., Bolontrade, M., Rizzo, M., Podhajcer, O.L., and Mazzolini, G. (2010). Overexpression of SPARC obliterates the in vivo tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 126, 2726-2740.
- Atorrasagasti, C., Peixoto, E., Aquino, J.B., Kippes, N., Malvicini, M., Alaniz, L., Garcia, M., Piccioni, F., Fiore, E.J., Bayo, J., et al. (2013). Lack of the matricellular protein SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) attenuates liver fibrogenesis in mice. *PLoS one* 8, e54962.
- Bacchi, C.E., Marsh, C.L., Perkins, J.D., Carithers, R.L., Jr., McVicar, J.P., Hudkins, K.L., Benjamin, C.D., Harlan, J.M., Lobb, R., and Alpers, C.E. (1993). Expression of vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) in liver and pancreas allograft rejection. *The American journal of pathology* 142, 579-591.
- Bae, S.H., Sung, S.H., Cho, E.J., Lee, S.K., Lee, H.E., Woo, H.A., Yu, D.Y., Kil, I.S., and Rhee, S.G. (2011). Concerted action of sulfiredoxin and peroxiredoxin I protects against alcohol-induced oxidative injury in mouse liver. *Hepatology* 53, 945-953.

- Bai, S.W., Herrera-Abreu, M.T., Rohn, J.L., Racine, V., Tajadura, V., Suryavanshi, N., Bechtel, S., Wiemann, S., Baum, B., and Ridley, A.J. (2011). Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization, cell morphology and migration. *BMC Biol* 9, 54.
- Basu, A., Kligman, L.H., Samulewicz, S.J., and Howe, C.C. (2001). Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). *BMC cell biology* 2, 15.
- Bataller, R., and Brenner, D.A. (2005). Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 115, 209-218.
- Beers, R.F., Jr., and Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of biological chemistry* 195, 133-140.
- Belanger, M., Cote, J., and Butterworth, R.F. (2006). Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure. *Neurochemistry international* 48, 434-440.
- Bernardi, R.J., Trump, D.L., Yu, W.D., McGuire, T.F., Hershberger, P.A., and Johnson, C.S. (2001). Combination of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) with dexamethasone enhances cell cycle arrest and apoptosis: role of nuclear receptor cross-talk and Erk/Akt signaling. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7, 4164-4173.
- Bernuau, J., Rueff, B., and Benhamou, J.P. (1986). Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. *Seminars in liver disease* 6, 97-106.
- Bhoopathi, P., Chetty, C., Gujrati, M., Dinh, D.H., Rao, J.S., and Lakka, S. (2010). Cathepsin B facilitates autophagy-mediated apoptosis in SPARC overexpressed primitive neuroectodermal tumor cells. *Cell death and differentiation* 17, 1529-1539.
- Bhoopathi, P., Gondi, C.S., Gujrati, M., Dinh, D.H., and Lakka, S.S. (2011). SPARC mediates Src-induced disruption of actin cytoskeleton via inactivation of small GTPases Rho-Rac-Cdc42. *Cellular signalling* 23, 1978-1987.
- Blazejewski, S., Le Bail, B., Boussarie, L., Blanc, J.F., Malaval, L., Okubo, K., Saric, J., Bioulac-Sage, P., and Rosenbaum, J. (1997). Osteonectin (SPARC) expression in human liver and in cultured human liver myofibroblasts. *The American journal of pathology* 151, 651-657.
- Boonstra, J., and Post, J.A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337, 1-13.
- Bornstein, P. (2000). Matricellular proteins: an overview. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 19, 555-556.
- Borowiak, M., Garratt, A.N., Wustefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., and Birchmeier, C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10608-10613.
- Bradshaw, A.D., Baicu, C.F., Rentz, T.J., Van Laer, A.O., Boggs, J., Lacy, J.M., and Zile, M.R. (2009). Pressure overload-induced alterations in fibrillar collagen content and myocardial diastolic function: role of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in post-synthetic procollagen processing. *Circulation* 119, 269-280.
- Bradshaw, A.D., Francki, A., Motamed, K., Howe, C., and Sage, E.H. (1999). Primary mesenchymal cells isolated from SPARC-null mice exhibit altered morphology and rates of proliferation. *Mol Biol Cell* 10, 1569-1579.
- Bradshaw, A.D., Puolakkainen, P., Dasgupta, J., Davidson, J.M., Wight, T.N., and Sage, E.H. (2003). SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. *Journal of Investigative Dermatology* 120, 949-955.

- Bradshaw, A.D., Reed, M.J., and Sage, E.H. (2002). SPARC-null mice exhibit accelerated cutaneous wound closure. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 50, 1-10.
- Bradshaw, A.D., and Sage, E.H. (2001). SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *Journal of Clinical Investigation* 107, 1049-1054.
- Brattin, W.J., Glende, E.A., Jr., and Recknagel, R.O. (1985). Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Journal of free radicals in biology & medicine* 1, 27-38.
- Brekken, R.A., and Sage, E.H. (2000). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol* 19, 569-580.
- Brekken, R.A., and Sage, E.H. (2001). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 19, 816-827.
- Bromley, S.K., Thomas, S.Y., and Luster, A.D. (2005). Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nature immunology* 6, 895-901.
- Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., and Sheu, S.S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C817-833.
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8033-8037.
- Bykov, I., Junnikkala, S., Pekna, M., Lindros, K.O., and Meri, S. (2007). Effect of chronic ethanol consumption on the expression of complement components and acute-phase proteins in liver. *Clinical immunology* 124, 213-220.
- Cain, K., and Freathy, C. (2001). Liver toxicity and apoptosis: role of TGF-beta1, cytochrome c and the apoptosome. *Toxicol Lett* 120, 307-315.
- Camargo, C.A., Jr., Madden, J.F., Gao, W., Selvan, R.S., and Clavien, P.A. (1997). Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 26, 1513-1520.
- Camino, A.M., Atorrasagasti, C., Maccio, D., Prada, F., Salvatierra, E., Rizzo, M., Alaniz, L., Aquino, J.B., Podhajcer, O.L., Silva, M., et al. (2008). Adenovirus-mediated inhibition of SPARC attenuates liver fibrosis in rats. *The journal of gene medicine* 10, 993-1004.
- Canbay, A., Guicciardi, M.E., Higuchi, H., Feldstein, A., Bronk, S.F., Rydzewski, R., Tanai, M., and Gores, G.J. (2003). Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *The Journal of clinical investigation* 112, 152-159.
- Canbay, A., Higuchi, H., Bronk, S.F., Tanai, M., Sebo, T.J., and Gores, G.J. (2002). Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 123, 1323-1330.
- Cardier, J.E., Schulte, T., Kammer, H., Kwak, J., and Cardier, M. (1999). Fas (CD95, APO-1) antigen expression and function in murine liver endothelial cells: implications for the regulation of apoptosis in liver endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13, 1950-1960.
- Carreras, M.C., Converso, D.P., Lorenti, A.S., Barbich, M., Levisman, D.M., Jaitovich, A., Antico Arciuch, V.G., Galli, S., and Poderoso, J.J. (2004). Mitochondrial nitric oxide

- synthase drives redox signals for proliferation and quiescence in rat liver development. *Hepatology* 40, 157-166.
- Clawson, G.A. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pathology and immunopathology research* 8, 104-112.
- Constandinou, C., Henderson, N., and Iredale, J.P. (2005). Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods in molecular medicine* 117, 237-250.
- Cotran, R., Kumar, V., and Tucker, C. (2014). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th Ed. Anil Aggrawal's Internet Journal of Book Reviews 13, 1-1.
- Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., DeAngelis, R.A., Ciliberto, G., Furth, E.E., Poli, V., and Taub, R. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274, 1379-1383.
- Crooke, S.T. (1998). Basic principles of antisense therapeutics. In *Antisense Research and Application* (Springer), pp. 1-50.
- Cybulsky, M.I., Fries, J.W., Williams, A.J., Sultan, P., Davis, V.M., Gimbrone, M.A., Jr., and Collins, T. (1991). Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. *The American journal of pathology* 138, 815-820.
- Chang, C.P., and Lei, H.Y. (2008). Autophagy induction in T cell-independent acute hepatitis induced by concanavalin A in SCID/NOD mice. *International journal of immunopathology and pharmacology* 21, 817-826.
- Chieli, E., and Malvaldi, G. (1984). Role of the microsomal FAD-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxide. *Toxicology* 31, 41-52.
- Chilakapati, J., Korrapati, M.C., Hill, R.A., Warbritton, A., Latendresse, J.R., and Mehendale, H.M. (2007). Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology* 230, 105-116.
- Delany, A.M., Kalajzic, I., Bradshaw, A.D., Sage, E.H., and Canalis, E. (2003). Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology* 144, 2588-2596.
- Dias, N., and Stein, C.A. (2002). Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Molecular cancer therapeutics* 1, 347-355.
- Ding, J.W., Ning, Q., Liu, M.F., Lai, A., Leibowitz, J., Peltekian, K.M., Cole, E.H., Fung, L.S., Holloway, C., Marsden, P.A., et al. (1997). Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: tissue-specific expression of a novel fgl2 prothrombinase. *Journal of virology* 71, 9223-9230.
- Ding, W.X., Ni, H.M., Gao, W., Hou, Y.F., Melan, M.A., Chen, X., Stolz, D.B., Shao, Z.M., and Yin, X.M. (2007). Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *The Journal of biological chemistry* 282, 4702-4710.
- Domenicali, M., Caraceni, P., Giannone, F., Baldassarre, M., Lucchetti, G., Quarta, C., Patti, C., Catani, L., Nanni, C., Lemoli, R.M., et al. (2009). A novel model of CCl₄-induced cirrhosis with ascites in the mouse. *Journal of hepatology* 51, 991-999.
- Dong, Y., Qu, Y., Xu, M., Wang, X., and Lu, L. (2014). Catalase ameliorates hepatic fibrosis by inhibition of hepatic stellate cells activation. *Front Biosci (Landmark Ed)* 19, 535-541.
- Draghici, S. (2003). *Data analysis tools for DNA microarrays* (Boca Raton, Fla.: Chapman & Hall/CRC).
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 82, 47-95.
- Dubrovskaya, A., Kanamoto, T., Lomnytska, M., Heldin, C.-H., Volodko, N., and Souchelnytskyi, S. (2005). TGF β 1/Smad3 counteracts BRCA1-dependent repair of DNA damage. *Oncogene* 24, 2289-2297.

- Eguchi, Y., Itoh, T., and Tomizawa, J. (1991). Antisense Rna. *Annu Rev Biochem* 60, 631-652.
- Elpek, G.O. (2014). Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol* 20, 7260-7276.
- Emi, N., Friedmann, T., and Yee, J.K. (1991). Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *Journal of virology* 65, 1202-1207.
- Faouzi, S., Burckhardt, B.E., Hanson, J.C., Campe, C.B., Schrum, L.W., Rippe, R.A., and Maher, J.J. (2001). Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-kappa B-independent, caspase-3-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 276, 49077-49082.
- Fawcett, D.W., and Jensch, R.P. (1997). *Bloom & Fawcett : concise histology* (New York: Chapman and Hall : International Thomson Pub.).
- Folio, C., Mora, M.I., Zalacain, M., Corrales, F.J., Segura, V., Sierrasesumaga, L., Toledo, G., San-Julian, M., and Patino-Garcia, A. (2009). Proteomic analysis of chemo-naive pediatric osteosarcomas and corresponding normal bone reveals multiple altered molecular targets. *J Proteome Res* 8, 3882-3888.
- Ford, R., Wang, G., Jannati, P., Adler, D., Racanelli, P., Higgins, P.J., and Staiano-Coico, L. (1993). Modulation of SPARC expression during butyrate-induced terminal differentiation of cultured human keratinocytes: regulation via a TGF-beta-dependent pathway. *Experimental cell research* 206, 261-275.
- Framson, P.E., and Sage, E.H. (2004). SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *Journal of cellular biochemistry* 92, 679-690.
- Francki, A., Bradshaw, A.D., Bassuk, J.A., Howe, C.C., Couser, W.G., and Sage, E.H. (1999). SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 32145-32152.
- Francki, A., McClure, T.D., Brekken, R.A., Motamed, K., Murri, C., Wang, T., and Sage, E.H. (2004). SPARC regulates TGF - beta1 - dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *Journal of cellular biochemistry* 91, 915-925.
- Francki, A., Motamed, K., McClure, T.D., Kaya, M., Murri, C., Blake, D.J., Carbon, J.G., and Sage, E.H. (2003). SPARC regulates cell cycle progression in mesangial cells via its inhibition of IGF-dependent signaling. *Journal of cellular biochemistry* 88, 802-811.
- Franco, M.C., Antico Arciuch, V.G., Peralta, J.G., Galli, S., Levisman, D., Lopez, L.M., Romorini, L., Poderoso, J.J., and Carreras, M.C. (2006). Hypothyroid phenotype is contributed by mitochondrial complex I inactivation due to translocated neuronal nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 281, 4779-4786.
- Frezza, E.E., Gerunda, G.E., Farinati, F., DeMaria, N., Galligioni, A., Plebani, F., Giacomini, A., and Van Thiel, D.H. (1994). CCL4-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in rats: relationship to plasma zinc, copper and estradiol levels. *Hepatology* 41, 367-369.
- Friedman, S.L. (2003). Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of hepatology* 38 Suppl 1, S38-53.
- Frizell, E., Liu, S.L., Abraham, A., Ozaki, I., Eghbali, M., Sage, E.H., and Zern, M.A. (1995). Expression of SPARC in normal and fibrotic livers. *Hepatology* 21, 847-854.
- Fruhauf, N.R., Oldhafer, K.J., Westermann, S., Sotiropoulos, G.C., and Kaiser, G.M. (2004). Acute hepatic failure in swine: hepatectomy versus vascular occlusion. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research* 17, 163-171.

- Funk, S.E., and Sage, E.H. (1991). The Ca²⁺(+)-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2648-2652.
- Funk, S.E., and Sage, E.H. (1993). Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *Journal of cellular physiology* 154, 53-63.
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., and Koizumi, M. (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nature genetics* 43, 34-41.
- Gabele, E., Froh, M., Arteel, G.E., Uesugi, T., Hellerbrand, C., Scholmerich, J., Brenner, D.A., Thurman, R.G., and Rippe, R.A. (2009). TNFalpha is required for cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse. *Biochemical and biophysical research communications* 378, 348-353.
- Gantner, F., Leist, M., Lohse, A.W., Germann, P.G., and Tiegs, G. (1995). Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 21, 190-198.
- Garcia-Banuelos, J., Siller-Lopez, F., Miranda, A., Aguilar, L.K., Aguilar-Cordova, E., and Armendariz-Borunda, J. (2002). Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene therapy* 9, 127-134.
- Geerts, A.M., Vanheule, E., Praet, M., Van Vlierberghe, H., De Vos, M., and Colle, I. (2008). Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *International journal of experimental pathology* 89, 251-263.
- Gentleman, R. (2005). Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor. In *Statistics for biology and health* (New York: Springer Science+Business Media), pp. 1 online resource (xix, 473 p.).
- George, J., Roulot, D., Koteliansky, V.E., and Bissell, D.M. (1999). In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12719-12724.
- Gilmour, D.T., Lyon, G.J., Carlton, M.B., Sanes, J.R., Cunningham, J.M., Anderson, J.R., Hogan, B.L., Evans, M.J., and Colledge, W.H. (1998). Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *The EMBO journal* 17, 1860-1870.
- Goldblum, S.E., Ding, X., Funk, S.E., and Sage, E.H. (1994). SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) regulates endothelial cell shape and barrier function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3448-3452.
- Goldenberg, D., Ayesh, S., Schneider, T., Pappo, O., Jurim, O., Eid, A., Fellig, Y., Dadon, T., Ariel, I., de Groot, N., et al. (2002). Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays. *Molecular carcinogenesis* 33, 113-124.
- Gooden, M.D., Vernon, R.B., Bassuk, J.A., and Sage, E.H. (1999). Cell cycle-dependent nuclear location of the matricellular protein SPARC: association with the nuclear matrix. *Journal of cellular biochemistry* 74, 152-167.

- Gorantla, B., Bhoopathi, P., Chetty, C., Gogineni, V.R., Sailaja, G., Gondi, C.S., and Rao, J.S. (2013). Notch signaling regulates tumor-induced angiogenesis in SPARC-overexpressed neuroblastoma. *Angiogenesis* 16, 85-100.
- Gordon, E.M., and Anderson, W.F. (1994). Gene therapy using retroviral vectors. *Current opinion in biotechnology* 5, 611-616.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36, 59-74.
- Gressner, A.M., and Weiskirchen, R. (2006). Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *Journal of cellular and molecular medicine* 10, 76-99.
- Grossman, M., Rader, D.J., Muller, D.W., Kolansky, D.M., Kozarsky, K., Clark, B.J., 3rd, Stein, E.A., Lupien, P.J., Brewer, H.B., Jr., Raper, S.E., et al. (1995). A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nature medicine* 1, 1148-1154.
- Gunawan, B.K., Liu, Z.X., Han, D., Hanawa, N., Gaarde, W.A., and Kaplowitz, N. (2006). c-Jun N-terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 131, 165-178.
- Haimerl, F., Erhardt, A., Sass, G., and Tiegs, G. (2009). Down-regulation of the de-ubiquitinating enzyme ubiquitin-specific protease 2 contributes to tumor necrosis factor- α -induced hepatocyte survival. *Journal of Biological Chemistry* 284, 495-504.
- Hall, K., Blair Zajdel, M.E., and Blair, G.E. (2010). Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. *The Biochemical journal* 431, 321-336.
- Hanley, K.P., Oakley, F., Sugden, S., Wilson, D.I., Mann, D.A., and Hanley, N.A. (2008). Ectopic SOX9 mediates extracellular matrix deposition characteristic of organ fibrosis. *Journal of Biological Chemistry* 283, 14063-14071.
- Harashima, M., Harada, K., Ito, Y., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Yamaguchi, T., and Niimi, S. (2008). Annexin A3 expression increases in hepatocytes and is regulated by hepatocyte growth factor in rat liver regeneration. *J Biochem* 143, 537-545.
- Hasselaar, P., and Sage, E.H. (1992). SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biochem* 49, 272-283.
- Hayashi, H., and Sakai, T. (2011). Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 300, G729-738.
- He, C., and Levine, B. (2010). The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol* 22, 140-149.
- He, Y., Zhou, J., Dou, K.F., and Chen, Y. (2003). A rat model for acute hepatic failure. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* 2, 423-425.
- Herskowitz, I. (1987). Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329, 219-222.
- Hohenester, E., Maurer, P., Hohenadl, C., Timpl, R., Jansonius, J.N., and Engel, J. (1996). Structure of a novel extracellular Ca(2+)-binding module in BM-40. *Nature structural biology* 3, 67-73.
- Hoyer-Hansen, M., and Jaattela, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell death and differentiation* 14, 1576-1582.
- Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 4, 44-57.

- Huh, C.G., Factor, V.M., Sanchez, A., Uchida, K., Conner, E.A., and Thorgeirsson, S.S. (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4477-4482.
- Iorns, E., Lord, C.J., Turner, N., and Ashworth, A. (2007). Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* 6, 556-568.
- Iredale, J.P., Benyon, R.C., Pickering, J., McCullen, M., Northrop, M., Pawley, S., Hovell, C., and Arthur, M.J. (1998). Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *The Journal of clinical investigation* 102, 538-549.
- Irizarry, R.A., Bolstad, B.M., Collin, F., Cope, L.M., Hobbs, B., and Speed, T.P. (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31, e15.
- Issa, R., Williams, E., Trim, N., Kendall, T., Arthur, M.J., Reichen, J., Benyon, R.C., and Iredale, J.P. (2001). Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 48, 548-557.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S.-I., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243.
- Jaeschke, H. (2002). Inflammation in response to hepatocellular apoptosis. *Hepatology* 35, 964-966.
- Jenkins, S.A., Grandison, A., Baxter, J.N., Day, D.W., Taylor, I., and Shields, R. (1985). A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. *Journal of hepatology* 1, 489-499.
- Jungermann, K., and Kietzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annual review of nutrition* 16, 179-203.
- Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D.A., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1997). Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nature genetics* 17, 314-317.
- Kaji, N., Ohashi, K., Shuin, M., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. (2003). Cell cycle-associated changes in Slingshot phosphatase activity and roles in cytokinesis in animal cells. *J Biol Chem* 278, 33450-33455.
- Kalpana, G.V. (1999). Retroviral vectors for liver-directed gene therapy. *Seminars in liver disease* 19, 27-37.
- Kaneko, Y., Harada, M., Kawano, T., Yamashita, M., Shibata, Y., Gejyo, F., Nakayama, T., and Taniguchi, M. (2000). Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *The Journal of experimental medicine* 191, 105-114.
- Kaufman, R.J. (1999). Advances toward gene therapy for hemophilia at the millennium. *Human gene therapy* 10, 2091-2107.
- Kelm, R.J., Jr., and Mann, K.G. (1991). The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation. *The Journal of biological chemistry* 266, 9632-9639.
- Kelly, K.A., Allport, J.R., Yu, A.M., Sinh, S., Sage, E.H., Gerszten, R.E., and Weissleder, R. (2007). SPARC is a VCAM-1 counter-ligand that mediates leukocyte transmigration. *Journal of leukocyte biology* 81, 748-756.
- Keppler, D., Lesch, R., Reutter, W., and Decker, K. (1968). Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Experimental and molecular pathology* 9, 279-290.
- Kim, D.J., Lee, D.C., Yang, S.-J., Lee, J.J., Bae, E.M., Kim, D.M., Min, S.H., Kim, S.J., Kang, D.C., and Sang, B.C. (2008). Lysyl oxidase like 4, a novel target gene of TGF- β 1

- signaling, can negatively regulate TGF- β 1-induced cell motility in PLC/PRF/5 hepatoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 373, 521-527.
- Kim, Y.C., Kim, B.G., and Lee, J.H. (2012). Thymosin beta10 expression driven by the human TERT promoter induces ovarian cancer-specific apoptosis through ROS production. *PLoS One* 7, e35399.
- Kisseleva, T., and Brenner, D.A. (2008). Mechanisms of fibrogenesis. *Experimental biology and medicine* 233, 109-122.
- Knodell, R.G., Ishak, K.G., Black, W.C., Chen, T.S., Craig, R., Kaplowitz, N., Kiernan, T.W., and Wollman, J. (1981). Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1, 431-435.
- Knolle, P.A., Gerken, G., Loser, E., Dienes, H.P., Gantner, F., Tiegs, G., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Lohse, A.W. (1996). Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology* 24, 824-829.
- Koen, Y.M., Sarma, D., Hajovsky, H., Galeva, N.A., Williams, T.D., Staudinger, J.L., and Hanzlik, R.P. (2013). Protein targets of thioacetamide metabolites in rat hepatocytes. *Chemical research in toxicology* 26, 564-574.
- Kountouras, J., Billing, B.H., and Scheuer, P.J. (1984). Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *British journal of experimental pathology* 65, 305-311.
- Kovalovich, K., DeAngelis, R.A., Li, W., Furth, E.E., Ciliberto, G., and Taub, R. (2000). Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology* 31, 149-159.
- Kristensen, D.B., Kawada, N., Imamura, K., Miyamoto, Y., Tateno, C., Seki, S., Kuroki, T., and Yoshizato, K. (2000). Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 32, 268-277.
- Kroeger-Koepke, M.B., Koepke, S.R., McClusky, G.A., Magee, P.N., and Michejda, C.J. (1981). alpha-Hydroxylation pathway in the in vitro metabolism of carcinogenic nitrosamines: N-nitrosodimethylamine and N-nitroso-N-methylaniline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 6489-6493.
- Ksontini, R., Colagiovanni, D.B., Josephs, M.D., Edwards, C.K., 3rd, Tannahill, C.L., Solorzano, C.C., Norman, J., Denham, W., Clare-Salzler, M., MacKay, S.L., et al. (1998). Disparate roles for TNF-alpha and Fas ligand in concanavalin A-induced hepatitis. *Journal of immunology* 160, 4082-4089.
- Kuhla, A., Eipel, C., Siebert, N., Abshagen, K., Menger, M.D., and Vollmar, B. (2008). Hepatocellular apoptosis is mediated by TNFalpha-dependent Fas/FasLigand cytotoxicity in a murine model of acute liver failure. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 13, 1427-1438.
- Kuhn, C., and Mason, R.J. (1995). Immunolocalization of SPARC, tenascin, and thrombospondin in pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology* 147, 1759-1769.
- Kupprion, C., Motamed, K., and Sage, E.H. (1998). SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 273, 29635-29640.
- Kusters, S., Gantner, F., Kunstle, G., and Tiegs, G. (1996). Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology* 111, 462-471.
- Lamireau, T., Le Bail, B., Boussarie, L., Fabre, M., Vergnes, P., Bernard, O., Gautier, F., Bioulac-Sage, P., and Rosenbaum, J. (1999). Expression of collagens type I and IV,

- osteonectin and transforming growth factor beta-1 (TGFbeta1) in biliary atresia and paucity of intrahepatic bile ducts during infancy. *Journal of hepatology* 31, 248-255.
- Lane, T.F., and Sage, E.H. (1994). The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8, 163-173.
- Lange, P.A., and Stoller, J.K. (1996). The hepatopulmonary syndrome. Effect of liver transplantation. *Clinics in chest medicine* 17, 115-123.
- Lau, C.P., Poon, R.T., Cheung, S.T., Yu, W.C., and Fan, S.T. (2006). SPARC and Hevin expression correlate with tumour angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *The Journal of pathology* 210, 459-468.
- Lazarus, D.D., Kambayashi, T., Yato-Kioka, M., Baumann, H., Jacob, C.O., and Strassmann, G. (1997). Vesnarinone inhibits immune-mediated but not Fas (CD95) agonist-mediated hepatic injury. *International journal of immunopharmacology* 19, 49-58.
- Le Bail, B., Faouzi, S., Boussarie, L., Guirouilh, J., Blanc, J.F., Carles, J., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., and Rosenbaum, J. (1999). Osteonectin/SPARC is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *The Journal of pathology* 189, 46-52.
- Le Minh, K., Kuhla, A., Abshagen, K., Minor, T., Stegemann, J., Ibrahim, S., Eipel, C., and Vollmar, B. (2009). Uncoupling protein-2 deficiency provides protection in a murine model of endotoxemic acute liver failure. *Critical care medicine* 37, 215-222.
- Ledley, F.D. (1995). Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Human gene therapy* 6, 1129-1144.
- Lee, W.M. (2008). Etiologies of acute liver failure. *Seminars in liver disease* 28, 142-152.
- Lee, Y.A., Wallace, M.C., and Friedman, S.L. (2015). Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* 64, 830-841.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.
- Levy, M.N., Berne, R.M., Koeppen, B.M., and Stanton, B.A. (2006). *Berne & Levy principles of physiology*, 4th edn (St. Louis, Mo.: Elsevier Mosby).
- Lim, Y.-S., Lee, H.C., and Lee, H.-S. (2007). Switch of cadherin expression from E-to N-type during the activation of rat hepatic stellate cells. *Histochemistry and cell biology* 127, 149-160.
- Liu, Y., Meyer, C., Xu, C., Weng, H., Hellerbrand, C., ten Dijke, P., and Dooley, S. (2013). Animal models of chronic liver diseases. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 304, G449-468.
- Lopez-Figueroa, M.O., Caamano, C., Morano, M.I., Ronn, L.C., Akil, H., and Watson, S.J. (2000). Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications* 272, 129-133.
- Lotkova, H., Cervinkova, Z., Kucera, O., Rousar, T., and Krivakova, P. (2007). S-adenosylmethionine exerts a protective effect against thioacetamide-induced injury in primary cultures of rat hepatocytes. *Altern Lab Anim* 35, 363-371.
- Louis, H., Le Moine, O., Peny, M.O., Quertinmont, E., Fokan, D., Goldman, M., and Deviere, J. (1997). Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 25, 1382-1389.
- Lu, S., Shen, K.C., Wang, Y., Brooks, S., and Wang, Y.A. (2005). Impaired hepatocyte survival and liver regeneration in Atm-deficient mice. *Human molecular genetics* 14, 3019-3025.
- Lu, S.C., Alvarez, L., Huang, Z.Z., Chen, L., An, W., Corrales, F.J., Avila, M.A., Kanel, G., and Mato, J.M. (2001). Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in

- proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5560-5565.
- Ma, K.F., Yang, H.Y., Chen, Z., Qi, L.Y., Zhu, D.Y., and Lou, Y.J. (2008). Enhanced expressions and activations of leukotriene C4 synthesis enzymes in D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced rat fulminant hepatic failure model. *World journal of gastroenterology* 14, 2748-2756.
- Makino, H., Togo, S., Kubota, T., Morioka, D., Morita, T., Kobayashi, T., Tanaka, K., Shimizu, T., Matsuo, K., Nagashima, Y., et al. (2005). A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice. *The Journal of surgical research* 127, 171-176.
- Mangipudy, R.S., Chanda, S., and Mehendale, H.M. (1995). Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environ Health Perspect* 103, 260-267.
- Mangipudy, R.S., Rao, P.S., and Mehendale, H.M. (1996). Effect of an antimetabolic agent colchicine on thioacetamide hepatotoxicity. *Environ Health Perspect* 104, 744-749.
- Mann, F.C. (1921). *STUDIES IN THE PHYSIOLOGY OF THE LIVER: I. TECHNIC AND GENERAL EFFECTS OF REMOVAL*. *The American Journal of the Medical Sciences* 161, 37-42.
- Mann, K., Deutzmann, R., Paulsson, M., and Timpl, R. (1987). Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC. *FEBS letters* 218, 167-172.
- Manns, M.P., Czaja, A.J., Gorham, J.D., Krawitt, E.L., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., Vierling, J.M., and American Association for the Study of Liver, D. (2010). Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 51, 2193-2213.
- Marco, R.D., Xiang, M., Zaccone, P., Leonardi, C., Franco, S., Meroni, P., and Nicoletti, F. (1999). Concanavalin A-induced hepatitis in mice is prevented by interleukin (IL)-10 and exacerbated by endogenous IL-10 deficiency. *Autoimmunity* 31, 75-83.
- Margeli, A.P., Papadimitriou, L., Ninos, S., Manolis, E., Mykoniatis, M.G., and Theocharis, S.E. (2003). Hepatic stimulator substance administration ameliorates liver regeneration in an animal model of fulminant hepatic failure and encephalopathy. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 23, 171-178.
- Mason, I.J., Murphy, D., Munke, M., Francke, U., Elliott, R.W., and Hogan, B.L. (1986). Developmental and transformation-sensitive expression of the Sparc gene on mouse chromosome 11. *EMBO J* 5, 1831-1837.
- Matkowskyj, K.A., Marrero, J.A., Carroll, R.E., Danilkovich, A.V., Green, R.M., and Benya, R.V. (1999). Azoxymethane-induced fulminant hepatic failure in C57BL/6J mice: characterization of a new animal model. *The American journal of physiology* 277, G455-462.
- May, P., and May, E. (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18, 7621-7636.
- McCurdy, S., Baicu, C.F., Heymans, S., and Bradshaw, A.D. (2010). Cardiac extracellular matrix remodeling: fibrillar collagens and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC). *Journal of molecular and cellular cardiology* 48, 544-549.
- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., and Codogno, P. (2010). Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C776-785.
- Mesa, M.L., Carrizosa, R., Martinez-Honduvilla, C., Benito, M., and Fabregat, I. (1996). Changes in rat liver gene expression induced by thioacetamide: protective role of S-adenosyl-L-methionine by a glutathione-dependent mechanism. *Hepatology* 23, 600-606.

- Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. *Science* 276, 60-66.
- Miller, A.D. (1992). Human gene therapy comes of age. *Nature* 357, 455-460.
- Miranda-Diaz, A., Rincon, A.R., Salgado, S., Vera-Cruz, J., Galvez, J., Islas, M.C., Berumen, J., Aguilar-Cordova, E., and Armendariz-Borunda, J. (2004). Improved effects of viral gene delivery of human uPA plus biliodigestive anastomosis induce recovery from experimental biliary cirrhosis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 9, 30-37.
- Mizuhara, H., O'Neill, E., Seki, N., Ogawa, T., Kusunoki, C., Otsuka, K., Satoh, S., Niwa, M., Senoh, H., and Fujiwara, H. (1994). T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *The Journal of experimental medicine* 179, 1529-1537.
- Mizuhara, H., Uno, M., Seki, N., Yamashita, M., Yamaoka, M., Ogawa, T., Kaneda, K., Fujii, T., Senoh, H., and Fujiwara, H. (1996). Critical involvement of interferon gamma in the pathogenesis of T-cell activation-associated hepatitis and regulatory mechanisms of interleukin-6 for the manifestations of hepatitis. *Hepatology* 23, 1608-1615.
- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728-741.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.
- Morita, T., Togo, S., Kubota, T., Kamimukai, N., Nishizuka, I., Kobayashi, T., Ichikawa, Y., Ishikawa, T., Takahashi, S., Matsuo, K., et al. (2002). Mechanism of postoperative liver failure after excessive hepatectomy investigated using a cDNA microarray. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* 9, 352-359.
- Motamed, K., Blake, D.J., Angello, J.C., Allen, B.L., Rapraeger, A.C., Hauschka, S.D., and Sage, E.H. (2003). Fibroblast growth factor receptor-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation and the promotion of skeletal myoblast differentiation by SPARC: a role for protein kinase A. *Journal of cellular biochemistry* 90, 408-423.
- Motamed, K., Funk, S.E., Koyama, H., Ross, R., Raines, E.W., and Sage, E.H. (2002). Inhibition of PDGF-stimulated and matrix-mediated proliferation of human vascular smooth muscle cells by SPARC is independent of changes in cell shape or cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of cellular biochemistry* 84, 759-771.
- Motamed, K., and Sage, E.H. (1998). SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway. *Journal of cellular biochemistry* 70, 543-552.
- Mulhbachter, J., St-Pierre, P., and Lafontaine, D.A. (2010). Therapeutic applications of ribozymes and riboswitches. *Current opinion in pharmacology* 10, 551-556.
- Muller, A., Machnik, F., Zimmermann, T., and Schubert, H. (1988). Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats--usefulness and reliability of this animal model. *Exp Pathol* 34, 229-236.
- Mulligan, R.C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* 260, 926-932.
- Mundlos, S., Schwahn, B., Reichert, T., and Zabel, B. (1992). Distribution of osteonectin mRNA and protein during human embryonic and fetal development. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 40, 283-291.
- Murphy-Ullrich, J.E., Lane, T.F., Pallero, M.A., and Sage, E.H. (1995). SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca(2+)-binding EF-hand. *Journal of cellular biochemistry* 57, 341-350.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 417, 1-13.

- Murray, T.V., Dong, X., Sawyer, G.J., Caldwell, A., Halket, J., Sherwood, R., Quaglia, A., Dew, T., Anilkumar, N., Burr, S., et al. (2015). NADPH oxidase 4 regulates homocysteine metabolism and protects against acetaminophen-induced liver damage in mice. *Free radical biology & medicine* 89, 918-930.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Nakagawa, H., Maeda, S., Hikiba, Y., Ohmae, T., Shibata, W., Yanai, A., Sakamoto, K., Ogura, K., Noguchi, T., Karin, M., et al. (2008). Deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates acetaminophen-induced liver injury by inhibiting c-Jun N-terminal kinase activation. *Gastroenterology* 135, 1311-1321.
- Nakatani, K., Seki, S., Kawada, N., Kitada, T., Yamada, T., Sakaguchi, H., Kadoya, H., Ikeda, K., and Kaneda, K. (2002). Expression of SPARC by activated hepatic stellate cells and its correlation with the stages of fibrogenesis in human chronic hepatitis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 441, 466-474.
- Nakazawa, K., Ijima, H., Fukuda, J., Sakiyama, R., Yamashita, Y., Shimada, M., Shirabe, K., Tsujita, E., Sugimachi, K., and Funatsu, K. (2002). Development of a hybrid artificial liver using polyurethane foam/hepatocyte spheroid culture in a preclinical pig experiment. *The International journal of artificial organs* 25, 51-60.
- Namisaki, T., Yoshiji, H., Kojima, H., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Sakurai, S., Yanase, K., Kitade, M., Yamazaki, M., et al. (2006). Salvage effect of the vascular endothelial growth factor on chemically induced acute severe liver injury in rats. *Journal of hepatology* 44, 568-575.
- Newell, P., Villanueva, A., Friedman, S.L., Koike, K., and Llovet, J.M. (2008). Experimental models of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 48, 858-879.
- Newsome, P.N., Plevris, J.N., Nelson, L.J., and Hayes, P.C. (2000). Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 6, 21-31.
- Nygaard, I.E., Mortensen, K.E., Hedegaard, J., Conley, L.N., Bendixen, C., Sveinbjornsson, B., and Revhaug, A. (2015). Tissue Remodelling following Resection of Porcine Liver. *BioMed research international* 2015, 248920.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364, 806-809.
- Ogura, Y., Hamanoue, M., Tanabe, G., Mitsue, S., Yoshidome, S., Nuruki, K., and Aikou, T. (2001). Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration and protein synthesis after hepatectomy in cirrhotic rats. *Hepatogastroenterology* 48, 545-549.
- Otsuka, K., Yao, K.L., Wasi, S., Tung, P.S., Aubin, J.E., Sodek, J., and Termine, J.D. (1984). Biosynthesis of osteonectin by fetal porcine calvarial cells in vitro. *The Journal of biological chemistry* 259, 9805-9812.
- Palacios, R.S., Roderfeld, M., Hemmann, S., Rath, T., Atanasova, S., Tschuschner, A., Gressner, O.A., Weiskirchen, R., Graf, J., and Roeb, E. (2008). Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Laboratory investigation* 88, 1192-1203.
- Pallottini, V., Martini, C., Bassi, A.M., Romano, P., Nanni, G., and Trentalance, A. (2006). Rat HMGCoA reductase activation in thioacetamide-induced liver injury is related to an increased reactive oxygen species content. *Journal of hepatology* 44, 368-374.
- Park, S.Y., Shin, H.W., Lee, K.B., Lee, M.J., and Jang, J.J. (2010). Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in thioacetamide-induced chronic liver injury. *Journal of Korean medical science* 25, 570-576.

- Peixoto, E., Atorrasagasti, C., Aquino, J.B., Militello, R., Bayo, J., Fiore, E., Piccioni, F., Salvatierra, E., Alaniz, L., Garcia, M.G., et al. (2015). SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) knockdown protects mice from acute liver injury by reducing vascular endothelial cell damage. *Gene therapy* 22, 9-19.
- Pichler, R.H., Bassuk, J.A., Hugo, C., Reed, M.J., Eng, E., Gordon, K.L., Pippin, J., Alpers, C.E., Couser, W.G., Sage, E.H., et al. (1996). SPARC is expressed by mesangial cells in experimental mesangial proliferative nephritis and inhibits platelet-derived-growth-factor-mediated mesangial cell proliferation in vitro. *The American journal of pathology* 148, 1153-1167.
- Pinzani, M., Rosselli, M., and Zuckermann, M. (2011). Liver cirrhosis. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 25, 281-290.
- Poirier, L.A. (1975). Hepatocarcinogenesis by diethylnitrosamine in rats fed high dietary levels of lipotropes. *Journal of the National Cancer Institute* 54, 137-140.
- Ponnazhagan, S., Mukherjee, P., Yoder, M.C., Wang, X.S., Zhou, S.Z., Kaplan, J., Wadsworth, S., and Srivastava, A. (1997). Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in vivo: organ-tropism and expression of transduced sequences in mice. *Gene* 190, 203-210.
- Popov, Y., Sverdlov, D.Y., Bhaskar, K.R., Sharma, A.K., Millonig, G., Patsenker, E., Krahenbuhl, S., Krahenbuhl, L., and Schuppan, D. (2010). Macrophage-mediated phagocytosis of apoptotic cholangiocytes contributes to reversal of experimental biliary fibrosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 298, G323-334.
- Porth, ed. (2009). *Fisiopatología. Salud-enfermedad: un enfoque conceptual*. , 7 edición edn (Editorial Panamericana).
- Prieto, J., Qian, C., Hernandez-Alcoceba, R., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Mazzolini, G., Sangro, B., and Kramer, M.G. (2004). Gene therapy of liver diseases. *Expert opinion on biological therapy* 4, 1073-1091.
- Prince, H.M. (1998). Gene transfer: a review of methods and applications. *Pathology* 30, 335-347.
- Pritchard, M.T., Roychowdhury, S., McMullen, M.R., Guo, L., Arteel, G.E., and Nagy, L.E. (2007). Early growth response-1 contributes to galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 293, G1124-1133.
- Qi, Z., Atsuchi, N., Ooshima, A., Takeshita, A., and Ueno, H. (1999). Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2345-2349.
- Quinlan, C.L., Perevoshchikova, I.V., Hey-Mogensen, M., Orr, A.L., and Brand, M.D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox biology* 1, 304-312.
- Rahman, T.M., and Hodgson, H.J. (2000). Animal models of acute hepatic failure. *International journal of experimental pathology* 81, 145-157.
- Raines, E.W., Lane, T.F., Iruela-Arispe, M.L., Ross, R., and Sage, E.H. (1992). The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1281-1285.
- Rao, D.D., Vorhies, J.S., Senzer, N., and Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Advanced drug delivery reviews* 61, 746-759.
- Rappaport, A., and Wilson, W. (1958). The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *The Anatomical Record* 130, 673-689.

- Rautou, P.E., Mansouri, A., Lebrec, D., Durand, F., Valla, D., and Moreau, R. (2010). Autophagy in liver diseases. *Journal of hepatology* 53, 1123-1134.
- Reed, M.J., Vernon, R.B., Abrass, I.B., and Sage, E.H. (1994). TGF-beta 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *Journal of cellular physiology* 158, 169-179.
- Reif, K., Ekland, E.H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Förster, R., and Cyster, J.G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416, 94-99.
- Rempel, S., Hawley, R., Gutierrez, J., Mouzon, E., Bobbitt, K., Lemke, N., Schultz, C., Schultz, L., Golembieski, W., and Koblinski, J. (2007a). Splenic and immune alterations of the Sparc-null mouse accompany a lack of immune response. *Genes and immunity* 8, 262-274.
- Rempel, S.A., Hawley, R.C., Gutierrez, J.A., Mouzon, E., Bobbitt, K.R., Lemke, N., Schultz, C.R., Schultz, L.R., Golembieski, W., Koblinski, J., et al. (2007b). Splenic and immune alterations of the Sparc-null mouse accompany a lack of immune response. *Genes and immunity* 8, 262-274.
- Riobo, N.A., Melani, M., Sanjuan, N., Fiszman, M.L., Gravielle, M.C., Carreras, M.C., Cadenas, E., and Poderoso, J.J. (2002). The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. *The Journal of biological chemistry* 277, 42447-42455.
- Ritchie, M.E., Silver, J., Oshlack, A., Holmes, M., Diyagama, D., Holloway, A., and Smyth, G.K. (2007). A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 23, 2700-2707.
- Rius, M., Nies, A.T., Hummel - Eisenbeiss, J., Jedlitschky, G., and Keppler, D. (2003). Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 38, 374-384.
- Robbiani, D.F., Finch, R.A., Jäger, D., Muller, W.A., Sartorelli, A.C., and Randolph, G.J. (2000). The Leukotriene C 4 Transporter MRP1 Regulates CCL19 (MIP-3 β , ELC)-Dependent Mobilization of Dendritic Cells to Lymph Nodes. *Cell* 103, 757-768.
- Roig, T., De Oliveira, J.R., Bartrons, R., and Bermudez, J. (1994). Fructose 1,6-bisphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes. *The American journal of physiology* 266, C1722-1728.
- Romberg, R.W., Werness, P.G., Lollar, P., Riggs, B.L., and Mann, K.G. (1985). Isolation and characterization of native adult osteonectin. *The Journal of biological chemistry* 260, 2728-2736.
- Saeed, A.I., Bhagabati, N.K., Braisted, J.C., Liang, W., Sharov, V., Howe, E.A., Li, J., Thiagarajan, M., White, J.A., and Quackenbush, J. (2006). TM4 microarray software suite. *Methods in enzymology* 411, 134-193.
- Sage, E.H., Bassuk, J.A., Yost, J.C., Folkman, M.J., and Lane, T.F. (1995). Inhibition of endothelial cell proliferation by SPARC is mediated through a Ca(2+)-binding EF-hand sequence. *J Cell Biochem* 57, 127-140.
- Sage, H., Johnson, C., and Bornstein, P. (1984). Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *The Journal of biological chemistry* 259, 3993-4007.
- Sage, H., Pritzl, P., and Bornstein, P. (1981). Secretory phenotypes of endothelial cells in culture: comparison of aortic, venous, capillary, and corneal endothelium. *Arteriosclerosis* 1, 427-442.

- Sage, H., Vernon, R.B., Funk, S.E., Everitt, E.A., and Angello, J. (1989). SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca²⁺-dependent binding to the extracellular matrix. *The Journal of cell biology* 109, 341-356.
- Sahin, H., Trautwein, C., and Wasmuth, H.E. (2010). Functional role of chemokines in liver disease models. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 7, 682-690.
- Sailaja, G.S., Bhoopathi, P., Gorantla, B., Chetty, C., Gogineni, V.R., Velpula, K.K., Gondi, C.S., and Rao, J.S. (2013). The secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) induces endoplasmic reticulum stress leading to autophagy-mediated apoptosis in neuroblastoma. *International journal of oncology* 42, 188-196.
- Sakai, H., Park, S.S., and Kikkawa, Y. (1992). Differential oxidase activity of hepatic and pulmonary microsomal cytochrome P-450 isozymes after treatment with cytochrome P-450 inducers. *Biochemical and biophysical research communications* 187, 1262-1269.
- Sakuma, T., Barry, M.A., and Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *The Biochemical journal* 443, 603-618.
- Salazar-Montes, A.M., Hernandez-Ortega, L.D., Lucano-Landeros, M.S., and Armendariz-Borunda, J. (2015). New gene therapy strategies for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 21, 3813-3825.
- Sanchez-Quiles, V., Mora, M.I., Segura, V., Greco, A., Epstein, A.L., Foschini, M.G., Dayon, L., Sanchez, J.C., Prieto, J., Corrales, F.J., et al. (2011). HSV-1 Cgal+ infection promotes quaking RNA binding protein production and induces nuclear-cytoplasmic shuttling of quaking I-5 isoform in human hepatoma cells. *Mol Cell Proteomics* 10, M111 009126.
- Santamaria, E., Avila, M.A., Latasa, M.U., Rubio, A., Martin-Duce, A., Lu, S.C., Mato, J.M., and Corrales, F.J. (2003). Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3065-3070.
- Sanz, N., Diez-Fernandez, C., Andres, D., and Cascales, M. (2002). Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-month-old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochimica et biophysica acta* 1587, 12-20.
- Satterwhite, D.J., Matsunami, N., and White, R.L. (2000). TGF- β 1 inhibits BRCA1 expression through a pathway that requires pRb. *Biochemical and biophysical research communications* 276, 686-692.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Kramer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO - 1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal* 17, 1675-1687.
- Schellings, M.W., Pinto, Y.M., and Heymans, S. (2004). Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovascular research* 64, 24-31.
- Schiedner, G., Morral, N., Parks, R.J., Wu, Y., Koopmans, S.C., Langston, C., Graham, F.L., Beaudet, A.L., and Kochanek, S. (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nature genetics* 18, 180-183.
- Schiemann, B.J., Neil, J.R., and Schiemann, W.P. (2003). SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signaling system. *Molecular biology of the cell* 14, 3977-3988.
- Schiffer, E., Housset, C., Cacheux, W., Wendum, D., Desbois-Mouthon, C., Rey, C., Clergue, F., Poupon, R., Barbu, V., and Rosmorduc, O. (2005). Gefitinib, an EGFR

- inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology* 41, 307-314.
- Schmitz, V., Dombrowski, F., Prieto, J., Qian, C., Diehl, L., Knolle, P., Sauerbruch, T., Caselmann, W.H., Spengler, U., and Leifeld, L. (2006). Induction of murine liver damage by overexpression of CD40 ligand provides an experimental model to study fulminant hepatic failure. *Hepatology* 44, 430-439.
- Schmitz, V., Qian, C., Ruiz, J., Sangro, B., Melero, I., Mazzolini, G., Narvaiza, I., and Prieto, J. (2002). Gene therapy for liver diseases: recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. *Gut* 50, 130-135.
- Schnittler, H.J., Wilke, A., Gress, T., Suttorp, N., and Drenckhahn, D. (1990). Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *The Journal of physiology* 431, 379-401.
- Schwarzbauer, J.E., and Spencer, C.S. (1993). The *Caenorhabditis elegans* homologue of the extracellular calcium binding protein SPARC/osteonectin affects nematode body morphology and mobility. *Molecular biology of the cell* 4, 941-952.
- Shapiro, H., Ashkenazi, M., Weizman, N., Shahmurov, M., Aeed, H., and Bruck, R. (2006). Curcumin ameliorates acute thioacetamide-induced hepatotoxicity. *Journal of gastroenterology and hepatology* 21, 358-366.
- Shi, Z., Wakil, A.E., and Rockey, D.C. (1997). Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10663-10668.
- Shiba, H., Uchida, Y., Kamihagi, K., Sakata, M., Fujita, T., Nakamura, S., Takemoto, T., Kato, Y., and Kurihara, H. (2001). Transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin-D-activated pulp cells. *Journal of dental research* 80, 1653-1659.
- Shibata, S., and Ishiyama, J. (2013). Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is upregulated by transforming growth factor (TGF)-beta and is required for TGF-beta-induced hydrogen peroxide production in fibroblasts. *Fibrogenesis & tissue repair* 6, 6.
- Shim, M.S., and Kwon, Y.J. (2010). Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *The FEBS journal* 277, 4814-4827.
- Shirin, H., Aeed, H., Alin, A., Matas, Z., Kirchner, M., Brazowski, E., Goldiner, I., and Bruck, R. (2010). Inhibition of immune-mediated concanavalin a-induced liver damage by free-radical scavengers. *Digestive diseases and sciences* 55, 268-275.
- Siller-Lopez, F., Sandoval, A., Salgado, S., Salazar, A., Bueno, M., Garcia, J., Vera, J., Galvez, J., Hernandez, I., Ramos, M., et al. (2004). Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology* 126, 1122-1133; discussion 1949.
- Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3.
- Smyth, G.K., and Speed, T. (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31, 265-273.
- Sobrevals, L., Rodriguez, C., Romero-Trevejo, J.L., Gondi, G., Monreal, I., Paneda, A., Juanarena, N., Arcelus, S., Razquin, N., Guembe, L., et al. (2010). Insulin-like growth factor I gene transfer to cirrhotic liver induces fibrolysis and reduces fibrogenesis leading to cirrhosis reversion in rats. *Hepatology* 51, 912-921.
- Socha, M.J., Manhiani, M., Said, N., Imig, J.D., and Motamed, K. (2007). Secreted protein acidic and rich in cysteine deficiency ameliorates renal inflammation and fibrosis in angiotensin hypertension. *The American journal of pathology* 171, 1104-1112.

- Sosa, M.S., Girotti, M.R., Salvatierra, E., Prada, F., de Olmo, J.A., Gallango, S.J., Albar, J.P., Podhajcer, O.L., and Llera, A.S. (2007). Proteomic analysis identified N-cadherin, clusterin, and HSP27 as mediators of SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteines) activity in melanoma cells. *Proteomics* 7, 4123-4134.
- Spira, B., and Raw, I. (2000). The effect of thioacetamide on the activity and expression of cytosolic rat liver glutathione-S-transferase. *Molecular and cellular biochemistry* 211, 103-110.
- Stankova, P., Kucera, O., Lotkova, H., Rousar, T., Endlicher, R., and Cervinkova, Z. (2010). The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 24, 2097-2103.
- Starkel, P., and Leclercq, I.A. (2011). Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 25, 319-333.
- Stenner, D.D., Romberg, R.W., Tracy, R.P., Katzmann, J.A., Riggs, B.L., and Mann, K.G. (1984). Monoclonal antibodies to native noncollagenous bone-specific proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 2868-2872.
- Strandjord, T.P., Madtes, D.K., Weiss, D.J., and Sage, E.H. (1999). Collagen accumulation is decreased in SPARC-null mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The American journal of physiology* 277, L628-635.
- Stravitz, R.T., and Kramer, D.J. (2009). Management of acute liver failure. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 6, 542-553.
- Sullivan, D.E., Dash, S., Du, H., Hiramatsu, N., Aydin, F., Kolls, J., Blanchard, J., Baskin, G., and Gerber, M.A. (1997). Liver-directed gene transfer in non-human primates. *Human gene therapy* 8, 1195-1206.
- Tagawa, Y., Sekikawa, K., and Iwakura, Y. (1997). Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. *Journal of immunology* 159, 1418-1428.
- Tai, I.T., Dai, M., Owen, D.A., and Chen, L.B. (2005). Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy. *The Journal of clinical investigation* 115, 1492-1502.
- Takehara, T., Tatsumi, T., Suzuki, T., Rucker, E.B., 3rd, Hennighausen, L., Jinushi, M., Miyagi, T., Kanazawa, Y., and Hayashi, N. (2004). Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology* 127, 1189-1197.
- Talarmin, H., Rescan, C., Cariou, S., Glaise, D., Zanninelli, G., Bilodeau, M., Loyer, P., Guguen-Guillouzo, C., and Baffet, G. (1999). The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol Cell Biol* 19, 6003-6011.
- Tamaki, N., Hatano, E., Taura, K., Tada, M., Kodama, Y., Nitta, T., Iwaisako, K., Seo, S., Nakajima, A., Ikai, I., et al. (2008). CHOP deficiency attenuates cholestasis-induced liver fibrosis by reduction of hepatocyte injury. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 294, G498-505.
- Tang, M.J., and Tai, I.T. (2007a). A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers. *Journal of Biological Chemistry* 282, 34457-34467.
- Tang, M.J., and Tai, I.T. (2007b). A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers. *J Biol Chem* 282, 34457-34467.

- Tang, X., Xing, Z., Tang, H., Liang, L., and Zhao, M. (2011). Human cell-death-inducing DFF45-like effector C induces apoptosis via caspase-8. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, gmr073.
- Termine, J.D., Kleinman, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L., and Martin, G.R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26, 99-105.
- Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., and Crawford, J.M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30, 1425-1433.
- Theocharis, S.E., Skopelitou, A.S., Margeli, A.P., Pavlaki, K.J., and Kittas, C. (1994). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Digestive diseases and sciences* 39, 245-252.
- Tiegs, G., Hentschel, J., and Wendel, A. (1992). A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *The Journal of clinical investigation* 90, 196-203.
- Topf, N., Worgall, S., Hackett, N., and Crystal, R. (1998). Regional 'pro-drug' gene therapy: intravenous administration of an adenoviral vector expressing the E. coli cytosine deaminase gene and systemic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma. *Gene therapy* 5.
- Tortora, G.J., and Derrickson, B. (2013). *Principios de Anatomía y Fisiología*, 13 edn (Editorial Medica Panamericana).
- Trombetta-eSilva, J., and Bradshaw, A.D. (2012). Suppl 1: The Function of SPARC as a Mediator of Fibrosis. *The open rheumatology journal* 6, 146.
- Tsukada, N., Ackerley, C.A., and Phillips, M.J. (1995). The structure and organization of the bile canalicular cytoskeleton with special reference to actin and actin-binding proteins. *Hepatology* 21, 1106-1113.
- Tsukamoto, H., Matsuoka, M., and French, S.W. (1990). Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Seminars in liver disease* 10, 56-65.
- Tunon, M.J., Alvarez, M., Culebras, J.M., and Gonzalez-Gallego, J. (2009). An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World journal of gastroenterology* 15, 3086-3098.
- Ueberham, E., Low, R., Ueberham, U., Schonig, K., Bujard, H., and Gebhardt, R. (2003). Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. *Hepatology* 37, 1067-1078.
- Uhrig, A., Banafsche, R., Kremer, M., Hegenbarth, S., Hamann, A., Neurath, M., Gerken, G., Limmer, A., and Knolle, P.A. (2005). Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *Journal of leukocyte biology* 77, 626-633.
- van de Kerkhove, M.P., Hoekstra, R., van Gulik, T.M., and Chamuleau, R.A. (2004). Large animal models of fulminant hepatic failure in artificial and bioartificial liver support research. *Biomaterials* 25, 1613-1625.
- Vera, M., Sobrevals, L., Zaratiegui, M., Martinez, L., Palencia, B., Rodriguez, C.M., Prieto, J., and Fortes, P. (2007). Liver transduction with a simian virus 40 vector encoding insulin-like growth factor I reduces hepatic damage and the development of liver cirrhosis. *Gene Ther* 14, 203-210.
- Verma, I.M., and Somia, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239-242.
- Waehler, R., Russell, S.J., and Curiel, D.T. (2007). Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nature reviews Genetics* 8, 573-587.

- Wallace, K., Burt, A.D., and Wright, M.C. (2008). Liver fibrosis. *The Biochemical journal* 411, 1-18.
- Wands, K.R., and Isselbacher, K.J. (1975). Lymphocyte cytotoxicity to autologous liver cells in chronic active hepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 1301-1303.
- Wang, H.X., Liu, M., Weng, S.Y., Li, J.J., Xie, C., He, H.L., Guan, W., Yuan, Y.S., and Gao, J. (2012). Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World journal of gastroenterology* 18, 119-125.
- Ware, C.F., and Sedy, J.R. (2011). TNF Superfamily Networks: bidirectional and interference pathways of the herpesvirus entry mediator (TNFSF14). *Curr Opin Immunol* 23, 627-631.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nagata, S. (1992). The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *The Journal of Immunology* 148, 1274-1279.
- Wrana, J.L., Overall, C.M., and Sodek, J. (1991). Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor beta. Comparison of transcriptional and post-transcriptional control with fibronectin and type I collagen. *European journal of biochemistry / FEBS* 197, 519-528.
- Wu, J., and Norton, P.A. (1996). Animal models of liver fibrosis. *Scandinavian journal of gastroenterology* 31, 1137-1143.
- Wu, Z., Han, M., Chen, T., Yan, W., and Ning, Q. (2010). Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 30, 782-794.
- Yan, Q., and Sage, E.H. (1999). SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 47, 1495-1506.
- Yang, M.C., Chang, C.P., and Lei, H.Y. (2010). Endothelial cells are damaged by autophagic induction before hepatocytes in Con A-induced acute hepatitis. *International immunology* 22, 661-670.
- Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E., and Wilson, J.M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 4407-4411.
- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic acids research* 30, e15.
- Yee, J.K., Miyahara, A., LaPorte, P., Bouic, K., Burns, J.C., and Friedmann, T. (1994). A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9564-9568.
- Yiu, G.K., Chan, W.Y., Ng, S.W., Chan, P.S., Cheung, K.K., Berkowitz, R.S., and Mok, S.C. (2001). SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol* 159, 609-622.
- Yonezawa, T., Kurata, R., Kimura, M., and Inoko, H. (2011). Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism. *Molecular bioSystems* 7, 91-100.
- Young, B.A., Wang, P., and Goldblum, S.E. (1998). The counteradhesive protein SPARC regulates an endothelial paracellular pathway through protein tyrosine phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* 251, 320-327.

- Ytrebo, L.M., Nedredal, G.I., Langbakk, B., and Revhaug, A. (2002). An experimental large animal model for the assessment of bioartificial liver support systems in fulminant hepatic failure. *Scandinavian journal of gastroenterology* 37, 1077-1088.
- Zaragoza, A., Andres, D., Sarrion, D., and Cascales, M. (2000). Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. *Chem Biol Interact* 124, 87-101.
- Zhang, W.W. (1999). Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer gene therapy* 6, 113-138.
- Zhou, X., Tan, F.K., Guo, X., Wallis, D., Milewicz, D.M., Xue, S., and Arnett, F.C. (2005). Small interfering RNA inhibition of SPARC attenuates the profibrotic effect of transforming growth factor beta1 in cultured normal human fibroblasts. *Arthritis and rheumatism* 52, 257-261.
- Zimmermann, T., Muller, A., Machnik, G., Franke, H., Schubert, H., and Dargel, R. (1987). Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in Uje: WIST rats. *Zeitschrift fur Versuchstierkunde* 30, 165-180.
- Zwingmann, C., Chatauret, N., Leibfritz, D., and Butterworth, R.F. (2003). Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [H-C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* 37, 420-428.