



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO
ANTIFIBROGÉNICO DE RILPIVIRINA EN LA
FIBROSIS HEPÁTICA: IMPACTO EN EL
FENOTIPO Y COMUNICACIÓN DE LAS
CÉLULAS ESTRELLADAS**

TESIS DOCTORAL

ANA MARÍA BENEDICTO ELENA

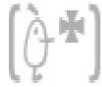
Directores

Dra. Nadezda Apostolova

Dra. Ana Blas García

Dr. Juan Vicente Esplugues Mota

Valencia, enero de 2025



Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Dra. Nadezda Apostolova, Profesora Titular en el Departamento de Farmacología de la Universitat de València.

Dra. Ana Blas García, Profesora Titular en el Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

Dr. Juan Vicente Esplugues Mota, Catedrático en el Departamento de Farmacología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por **Ana María Benedicto Elena**, titulado **“Caracterización del efecto antifibrogénico de Rilpivirina en la fibrosis hepática: impacto en el fenotipo y comunicación de las células estrelladas”**, para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Lo que firmamos en Valencia, a 13 de enero de 2025

NADEZDA| Firmado digitalmente por NADEZDA| APOSTOLOVA| ATANASOVSKA| Fecha: 2025.01.13 16:26:20 +01'00'

Fdo. Nadezda Apostolova

ANA| Firmado digitalmente por ANA|BLAS| GARCIA| Fecha: 2025.01.13 17:22:34 +01'00'

Fdo. Ana Blas García

JUAN| Firmado digitalmente por JUAN VICENTE| ESPLUGUES| MOTA| Fecha: 2025.01.14 13:38:43 +01'00'

Fdo. Juan Vicente Esplugues Mota

Esta tesis doctoral ha sido financiada con fondos del Instituto de Salud Carlos III y Ministerio de Ciencia e Innovación y Universidades (ref. RTI2018-096748-B-100 y CIBER CB06/04/0071), FISABIO (Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana; ref. UGP-19-033), CIBERehd (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas; ref. EHD19PI03) y la Generalitat Valenciana (ref. AICO/2021/017). La doctoranda ha sido beneficiaria de un contrato predoctoral del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (ref. FPU19/05064).

“To be successful at anything, the truth is you don’t have to be special; you just have to be what most people aren’t: consistent, determined, and willing to work for it. No shortcuts—integrity, purpose, determination, and discipline are what it takes to be a champion in life”

-Tom Brady-

A mis padres,

por hacer posible cada uno de mis sueños.

A mi hermano,

por ser la fuente de inspiración para conseguirlos.

A Carlos,

por hacerme creer siempre que puedo lograrlos.

AGRADECIMIENTOS

Es increíble que me encuentre hoy escribiendo lo que tantas veces he dudado que podría hacer. Después de tantos años he aprendido que *todo llega y todo pasa*, aunque muchas veces parezca imposible. En esta etapa me he hecho muchísimo más fuerte y cuando miro atrás estoy muy orgullosa de mí por no haberme rendido a pesar de todas las dificultades. Sin embargo, nada habría sido posible sin el increíble círculo de personas que, afortunadamente, la vida me ha regalado.

El primer agradecimiento es para mis directores de tesis, quienes se han esforzado incansablemente para permitir que me encuentre hoy aquí. **Juan Vicente**, gracias por abrirme las puertas de este mundo, por confiar en mí desde el principio y por todas las oportunidades que me has brindado. Quiero agradecerte de corazón tu apoyo en el terreno personal cuando lo he necesitado. **Ana**, gracias por enseñarme tanto, gracias tu paciencia y por tus consejos. Estoy segura de que todo el esfuerzo que realizas día tras día te llevará a lo conseguir todo lo que te mereces. **Nade**, no cabría en estas líneas todo lo que tengo que agradecerte. Gracias por siempre exigirme tanto, pero a la vez, devolverme todo multiplicado por mil. Gracias por seguir luchando incansablemente por la excelencia, por querer siempre lo mejor para mí, por cuidarme en el terreno profesional, y, especialmente, personal. Siempre estaré plenamente agradecida por tu apoyo y confianza. Estoy muy orgullosa de ti y te admiro muchísimo. Espero celebrar contigo todos los logros que te esperan, que estoy segura de que serán muchos. Eres la mejor investigadora que he conocido nunca.

En segundo lugar, agradecer a todas las personas que han pertenecido en algún momento al *Liver Team*. **Aleks**, tú fuiste mi profesora y guía desde que empecé. Tu paciencia infinita conmigo, tu bondad, tu sonrisa y tus consejos hicieron que formáramos un gran equipo. Gracias por ser tan buena conmigo, por ayudarme tanto y por quererme siempre, estemos donde estemos y pase el tiempo que pase. Te echo de menos y te quiero mucho. **Angelita**, gracias por tu paciencia, consejos, enseñanzas y buenos momentos juntas. **Isa**, estoy muy feliz de que

la vida te esté devolviendo todo el esfuerzo y pasión que siempre has mostrado por la ciencia. Gracias por tantos momentos. **Fede**, ha sido un placer haber compartido unos años contigo en el laboratorio. Hiciste del laboratorio un lugar de felicidad y buenos momentos, y aportaste mucha luz cuando más lo necesitábamos. **Edu y Bárbara**, durante el corto tiempo que pasasteis por el laboratorio hicisteis mis días mucho más felices. Gracias por hacerme siempre las cosas tan fáciles y por apoyarme hasta el día de hoy. Estoy muy orgullosa de vosotros. **Cris**, eres muy valiente y no debes nunca dejar de creer en ti. Mucho ánimo con esta etapa y sigue en este camino, que todo lo bueno llegará. **David Verdú**, hiciste del laboratorio una gran familia, un ambiente de felicidad y de alegría y siempre estaré agradecida por tu apoyo.

También me gustaría agradecer a todas las personas que forman parte del departamento. **Loles, M^a Ángeles, Ángeles, Sara, Dolo, Dulce**, gracias por tantos buenos consejos y ánimos, he aprendido un montón de vosotras. **Raquel**, ha sido una suerte compartir contigo las penas y también las alegrías, gracias por ayudarme y escucharme siempre. **Sandra Coll, Laura, Patri**, gracias por los tantos ratitos de alegría y los consejos en momentos de crisis. **Jesús**, ha sido un placer haber compartido tantos buenos momentos contigo y gracias por ayudarme cuando lo he necesitado. **Rubén y María**, habéis aportado muchísima felicidad en esta etapa final, gracias por todo. **Silvia, Mari, Mamen**, gracias por estar siempre pendientes de todo y hacer las cosas tan fáciles. **Dora**, gracias por tener siempre una sonrisa para los demás y por brindarme tu ayuda siempre. **Brian**, eres fundamental para que todo el departamento funcione, siempre dispuesto a organizar, a ayudar, y a preocuparte por los demás. Ha sido un placer haber compartido este tiempo contigo. **Lluis y Marta**, qué suerte haberos conocido, gracias por todo lo que habéis hecho por mí. Me habéis hecho muy feliz y os he echado de menos durante la última etapa. **Inés Roger**, tu sonrisa, tus consejos y tu alegría constante han aportado mucha luz durante todo este tiempo.

Pero, sin duda, todo esto no habría sido posible sin dos personas que han sido mi apoyo incondicional todos estos años en el laboratorio. **Carmen**, repetiría estos años sin dudarlo si fuera para volver a encontrarme contigo en el camino. Gracias por todo lo que has hecho por mí, personal y profesionalmente. Nunca has dejado de creer en mí, nunca me has dejado caer y nunca has permitido que me rindiera. Gracias por ser la luz en la oscuridad todos los días, por hacer de los problemas siempre soluciones, por darme tanta felicidad, por escucharme siempre y, sobre todo, por permitirme ser tu amiga y parte de tu familia. Eres increíble en todos los sentidos, y así lo sabemos todos los que tenemos la suerte de conocerte. Te quiero muchísimo. **Cris**, hermana y amiga. Contigo empezó todo, y contigo hasta el final. Has sido siempre el apoyo que más he necesitado en estos años. Gracias por escucharme y tener siempre las palabras adecuadas en el momento adecuado. Gracias por repetirme tantas veces que era capaz de conseguirlo, pero también gracias por permitirme dudar de que no podría hacerlo. Gracias por quererme tanto y por recordarme siempre el valor que tengo como persona. Siempre estaremos juntas en cada paso que hagamos. Eres increíble y me siento muy afortunada por tenerte a mi lado. Te quiero muchísimo y estoy muy orgullosa de ti.

Fuera del ámbito profesional me han acompañado muchas personas a lo largo de esta etapa. **María**, gracias por estar siempre para escucharme, darme el mejor consejo y apoyarme en cualquier decisión que haya decidido tomar, te quiero mucho. **Luci**, cuñada, amiga, gracias por todo lo que haces por mí. Estoy muy feliz de que formes parte de mi familia y de mi vida. **Andrea**, gracias por estar siempre. **Albi** y **Laura**, os quiero infinito, y me siento muy afortunada de contar con vosotras, fuisteis las primeras personas que conocí del mundo de la investigación y qué suerte haberos encontrado. A mis **amigos de la universidad** y de **Soneja**, por ser luz y felicidad siempre. También quisiera agradecer a la familia **Michavila-Reyes**, por acogerme y apoyarme desde hace 4 años. En especial a **Encarna**, gracias por tu apoyo incondicional, por tu cariño y por tus ánimos día tras día recordándome el orgullo que sientes por mí.

Por último, mi mayor agradecimiento es para **mi familia**.

A mis **tatas**, por estar siempre ahí, escucharme y apoyarme incondicionalmente. A mis tíos, **Gloria, Vicente, M^a Antonia**, gracias por todo. A mis sobrinos, **Lucas, Bruno, Noa y Maia** (muy prontito), sois mi rayito de luz. A mis **abuelos**, por haberme querido tanto y tan bien. **Isabel** y **Joaquín**, os echo mucho de menos y espero que estéis orgullosos de mí.

Papás, gracias por todo el esfuerzo que habéis hecho durante toda la vida para que Ángel y yo pudiéramos alcanzar cada uno de nuestros sueños. **Papá**, gracias por preocuparte siempre tanto para que las cosas vayan bien y por enseñarme que todo en esta vida siempre debe de hacerse al 100 %. Gracias por escucharme siempre atentamente y estar dispuesto a ayudarme en todo. Para mí es un orgullo cuando la mamá dice “sois iguales”, porque eso significa que estoy en el camino correcto. Estoy muy orgullosa de ti. **Mamá**, gracias por mostrar fortaleza en momentos duros que la vida nos ha obligado tener. Tu valentía ha sido mi mayor fuerza en esta última etapa y seguir tu legado y el del abuelo es el mayor orgullo que puedo sentir. Gracias por tu paciencia infinita conmigo, aunque a veces sea difícil. Espero aprender de ti, codo con codo, toda la vida. Estoy muy orgullosa de ti también. **Ángel**, mi admiración por ti ha sido siempre mi motivación para alcanzar todo lo que me he propuesto. Tu forma de afrontar la vida me ha aportado siempre calma en mitad del caos. Gracias por escucharme y apoyarme en cada decisión, por hacerme la vida mucho más feliz, por creer en mí, por ayudarme en todo y por tener tanta paciencia conmigo. Eres mi ejemplo a seguir y el mejor hermano que podría haber imaginado nunca. Estaré contigo siempre celebrando cada éxito que alcances. Os quiero mucho a los tres. Finalmente, gracias a **Carlos**, mi compañero de vida. No ha habido ni un solo día que no me hayas dicho lo orgulloso que te sientes de mí, y ese orgullo es el mismo que yo siento por ti. Gracias por no dejarme nunca caer, hacerme tan feliz y querer siempre lo mejor para mí. Juntos conseguiremos todo lo que hoy estamos creando. Te quiero mucho, como el mejor equipo.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNmt	ADN mitocondrial
ALT	Alanina transaminasa
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP (<i>AMP-activated protein kinase</i>)
APS	Persulfato de amonio (<i>Ammonium persulfate</i>)
ARE	Elementos de respuesta antioxidante (<i>Antioxidant response elements</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato transaminasa
ATG	Genes relacionados con la autofagia (<i>Autophagy-related genes</i>)
BCA	Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic acid</i>)
BCL2L11	<i>Proapoptotic BH3 only protein Bcl-2-like protein 11</i>
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CAT	Catalasa
CCND1	Ciclina D1
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (<i>Cyclin-dependent kinase</i>)
CDKN1A	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A (<i>Cyclin-dependent kinase 1A inhibitor</i>)
C_{max}	Concentración máxima
DAMP	Patrones moleculares asociados al daño (<i>Damage-associated molecular patterns</i>)
DEG	Gen diferencialmente expresado (<i>Differentially expressed gene</i>)
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco (<i>Dubelcco's modified Eagle medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
Drp1	Proteína 1 relacionada con la dinamina (<i>Dynamain-related protein 1</i>)
ECM	Matriz extracelular (<i>Extracellular matrix</i>)
EHC	Enfermedad hepática crónica
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular (<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>)
ER	Retículo endoplasmático (<i>Endoplasmic reticulum</i>)
ESCRT	Complejos endosomales de clasificación requeridos para el transporte (<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>)

ETC	Cadena de transporte de electrones (<i>Electron transport chain</i>)
EV	Vesículas extracelulares (<i>Extracellular vesicles</i>)
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (<i>Food and drug administration</i>)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (<i>Fibroblast growth factor</i>)
GCLC	Cisteína-glutamato ligasa
GPX	Glutación peroxidasa
GRP75	Proteína 75 regulada por glucosa (<i>Glucose-regulated protein 75</i>)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSH	Glutación
HBSS	Solución salina equilibrada de Hank (<i>Hank's balanced salt solution</i>)
HCC	Carcinoma hepatocelular (<i>Hepatocellular carcinoma</i>)
HGF	Factor de crecimiento hepatocitario (<i>Hepatocyte growth factor</i>)
HMG-CoA	3 hidroxí-3-metilglutaril coenzima A (<i>3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A</i>)
HSC	Célula estrellada hepática (<i>Hepatic stellate cell</i>)
HO-1	Hemo oxigenasa 1
HPx	Hepatectomía parcial
HRP	Peroxidasa de rábano (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HSP	Proteína de choque térmico (<i>Heat shock protein</i>)
INFγ	Interferón γ
IL	Interleuquina
ILV	Vesículas intraluminales (<i>Intraluminal vesicles</i>)
IMM	Membrana mitocondrial interna (<i>Inner mitochondrial membrane</i>)
JNK	<i>c-Jun-N-terminal kinase</i>
Keap1	Proteína 1 asociada a Kelch asociada a ECH (<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>)
KLF2	<i>Krüppel-like factor 2</i>
LC3	<i>Light chain 3</i>
LSEC	Célula endotelial sinusoidal hepática (<i>Liver sinusoidal endothelial cell</i>)

MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MFN	Mitofusina
mARN	ARN mensajero
miARN	Micro ARN
MMP	Metaloproteinasa de la matriz (<i>Matrix metalloproteinase</i>)
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos (<i>Mammalian target of rapamycin</i>)
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide</i>
MVB	Cuerpos multivesiculares (<i>Multivesicular body</i>)
NF-κβ	Factor nuclear kappa β (<i>Nuclear factor-kappa β</i>)
NNRTI	Inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos (<i>Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>)
NQO1	NADPH quinona oxidorreductasa-1
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
OMM	Membrana mitocondrial externa (<i>Outer mitochondrial membrane</i>)
OPA1	Proteína de atrofia óptica 1 (<i>Optic atrophy 1</i>)
ORA	Análisis de sobrerrepresentación (<i>Over-representation analysis</i>)
OXPHOS	Fosforilación oxidativa (<i>Oxidative phosphorylation</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal component analysis</i>)
PCR	Reacción en cadena de polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa (<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
p.o	Vía oral
PPARγ	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>)
PRDX1	Peroxirredoxina 1

RT-qPCR	PCR de transcripción reversa cuantitativa (<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>)
RH	Regeneración hepática
RPV	Rilpivirina
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Error estándar de la media (<i>Standard error of the mean</i>)
SiRNA	ARN pequeño de interferencia (<i>Small interfering RNA</i>)
SOD1	Superóxido dismutasa
SQSTM1	Sequestosoma 1
STAT	Proteína transductora de señales y activadora de la transcripción (<i>Signal transducer and activator of transcription</i>)
SV	Simvastatina
TBS-T	Tampón tris salino-Tween 20
TEMED	N, N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
TIMP	Inhibidor tisular de MMP (<i>Tissue inhibitor of MMP</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
ULK1	Quinasa 1 activadora de la autofagia tipo UNC-51 (<i>Unc-51 like autophagy activating kinase 1</i>)
VDAC	Canal de aniones dependiente de voltaje (<i>Voltage-dependent anion channel</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
Veh	Vehículo
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WB	<i>Western Blotting</i>
αSMA	Actina alfa de músculo liso (<i>Alpha-smooth muscle actin</i>)

LISTA DE FIGURAS

I.1	Estructura del hígado, tipos celulares presentes y vasculatura hepática	6
I.2	Fases de la activación de las HSC y respuesta profibrogénica asociada	8
I.3	Principales células implicadas y comunicación intercelular en el desarrollo de la fibrosis	11
I.4	Biogénesis de los exosomas y microvesículas. Fases y rutas de la formación de los exosomas	13
I.5	Estructura y principales componentes de los exosomas	16
I.6	Vía de señalización canónica y no canónica de TGF- β en el contexto de la activación de HSC	21
I.7	Vía de señalización de Nrf2: principales componentes y genes diana	24
I.8	Fases de la autofagia y principales mediadores implicados	25
I.9	Estructura de la mitocondria, componentes de la ETC mitocondrial y la OXPHOS	32
I.10	Dinámica mitocondrial: fusión/fisión mitocondrial y principales proteínas involucradas	37
I.11	Estructura química de simvastatina (A) y rilpivirina (B)	44
I.12	Vías moleculares asociadas a la RH en el modelo de HPx	52
I.13	Fases de la RH en el modelo de HPx y principales moléculas implicadas	55
III.1	Representación gráfica del gradiente de Percoll para el aislamiento de hHSC	66
III.2	Representación gráfica del protocolo experimental de HPx 70 %	68
III.3	Representación gráfica de los lóbulos hepáticos resecados en el protocolo de HPx 70 % en ratón	68
III.4	Representación gráfica del ensayo de quimiotaxis	81
III.5	Representación gráfica de la reacción que tiene lugar en el ensayo de MTT	83

III.6	Representación esquemática del flujo de trabajo y parámetros determinados en la prueba bioenergética MitoStress de Seahorse	92
III.7	Representación esquemática del proceso de aislamiento y concentración de EV	94
III.8	Representación esquemática del NTA	95
IV.A.1	Análisis de patrones globales de expresión génica de hHSC (I)	103
IV.A.1	Análisis de patrones globales de expresión génica de hHSC (II)	104
IV.A.2	Análisis de funciones biológicas enriquecidas en los perfiles de expresión génica de hHSC mediante ORA	106
IV.B.1	Efecto de RPV en la proliferación estimulada por PDGF- $\beta\beta$ en hHSC	110
IV.B.2	Efecto de RPV en la expresión génica de marcadores de fibrogénesis y metabólicos en células hHSC activadas por PDGF- $\beta\beta$	111
IV.B.3	Efecto de RPV en la expresión proteica de marcadores de activación fibrogénica y metabólicos en células hHSC activadas por PDGF- $\beta\beta$	112
IV.B.4	Efecto de RPV en la expresión de proteínas clave en la vía de señalización de las MAPK	114
IV.B.5	Efecto de RPV en la migración inducida por PDGF- $\beta\beta$ en HSC	116
IV.C.1	Análisis del efecto de RPV sobre la expresión proteica de marcadores autofágicos en células LX-2 tratadas 24 h	118
IV.C.2	Análisis del efecto de RPV sobre la expresión proteica de marcadores autofágicos en células LX-2 tratadas 48 h	120
IV.C.3	Análisis del efecto de RPV sobre la expresión génica de <i>SQSTM1</i>	121
IV.C.4	Análisis del efecto de RPV en la acumulación de lisosomas y estructuras autofágicas en HSC activadas por TGF- β	123
IV.C.5	Evaluación del efecto de RPV sobre el flujo autofágico en LX-2 tratadas con TGF- β	125
IV.D.1	Análisis del efecto de la combinación de RPV y SV en la viabilidad celular mediante MTT	127

IV.D.2	Análisis del efecto de la combinación de RPV y SV en la viabilidad celular mediante el ensayo de fosfatasa ácida	129
IV.D.3	Efecto de la combinación de RPV y SV en la actividad de las caspasas 3/7 en células LX-2	131
IV.D.4	Efecto de la adición de SV en los efectos reguladores de RPV en mediadores de fibrogénesis en células LX-2 (48 h)	133
IV.D.5	Efecto de la adición de SV en los efectos reguladores de RPV en mediadores de fibrogénesis en células LX-2 (72 h)	134
IV.D.6	Efecto del cotratamiento con SV en los efectos reguladores de RPV sobre STAT1/STAT3 y Col1A1 en células LX-2	135
IV.D.7	Efecto de la combinación de SV con RPV sobre la expresión de Nrf2, HO-1 y NQO1 en LX-2	137
IV.D.8	Efecto de SV en combinación con RPV sobre la expresión de Nrf2 mediante inmunofluorescencia	139
IV.D.9	Efecto de la combinación de SV con RPV sobre la expresión génica de enzimas relacionadas con la protección frente al estrés oxidativo	140
IV.D.10	Impacto de la combinación de RPV y SV sobre la producción de superóxido mitocondrial	141
IV.D.11	Análisis del efecto del tratamiento combinado SV-RPV y el silenciamiento de Nrf2 en la expresión proteica de colágeno, producción de ROS y viabilidad celular	143
IV.E.1	Análisis del efecto de RPV en la función mitocondrial en células LX-2	147
IV.E.2	Análisis del efecto de RPV en la producción de superóxido mitocondrial en células LX-2.	149
IV.E.3	Análisis del efecto de RPV en la masa mitocondrial de células LX-2	150
IV.E.4	Análisis del efecto de RPV en la morfología y dinámica mitocondrial en células LX-2	151
IV.E.5	Análisis del efecto de RPV en la forma y tamaño mitocondrial mediante TEM en células LX-2	153
IV.E.6	Análisis de secuenciación de ARN de los mito-DEGs en hHSC (I)	156

IV.E.6	Análisis de secuenciación de ARN de los mito-DEGs en hHSC (II)	159
IV.E.6	Análisis de secuenciación de ARN de los mito-DEGs en hHSC (III)	160
IV.F.1	Efecto de RPV sobre el proteoma de células LX-2 activadas con TGF- β (I)	177
IV.F.1	Efecto de RPV sobre el proteoma de células LX-2 activadas con TGF- β (II)	178
IV.F.1	Efecto de RPV sobre el proteoma de células LX-2 activadas con TGF- β (III)	179
IV.F.1	Efecto de RPV sobre el proteoma de células LX-2 activadas con TGF- β (IV)	180
IV.F.1	Efecto de RPV sobre el proteoma de células LX-2 activadas con TGF- β (V)	184
IV.F.2	Identificación de los exosomas aislados de LX-2	187
IV.F.3	Efecto de RPV sobre el proteoma de exosomas secretados por LX-2 activadas con TGF- β (I)	189
IV.F.3	Efecto de RPV sobre el proteoma de exosomas secretados por LX-2 activadas con TGF- β (II)	190
IV.F.3	Efecto de RPV sobre el proteoma de exosomas secretados por LX-2 activadas con TGF- β (III)	191
IV.F.3	Efecto de RPV sobre el proteoma de exosomas secretados por LX-2 activadas con TGF- β (IV)	192
IV.F.3	Efecto de RPV sobre el proteoma de exosomas secretados por LX-2 activadas con TGF- β (V)	193
IV.F.3	Efecto de RPV sobre el proteoma de exosomas secretados por LX-2 activadas con TGF- β (VI)	196
IV.G.1	Evaluación de peso corporal, peso y coeficiente hepático, y enzimas hepáticas en el modelo de HPx	200
IV.G.2	Evaluación de la expresión proteica del marcador de proliferación PCNA	202
IV.G.3	Evaluación de la expresión génica y proteica del marcador de hepatocito diferenciado albúmina en el modelo de HPx	203
IV.G.4	Evaluación de la activación de STAT3 en el modelo de HPx.	205

IV.G.5	Evaluación de la inactivación de YAP, proteína clave en la ruta de señalización Hippo	206
V.1	Esquema representativo del efecto antifibrogénico de RPV en HSC activadas	243

LISTA DE TABLAS

III.1	Reactivos empleados para el cultivo celular y compañía de suministro	64
III.2	Listado de anticuerpos primarios empleados para los experimentos de inmunotransferencia	73
III.3	Listado de anticuerpos secundarios empleados para los experimentos de inmunotransferencia	73
III.4	Parejas de cebadores para genes de ratón empleados en qRT-PCR	77
III.5	Parejas de cebadores para genes de humano empleados en qRT-PCR	77
IV.1	Análisis de la jerarquía de los <i>Mitopathways</i> en los genes diferencialmente expresados que codifican proteínas mitocondriales (mito-DEGs), utilizando datos de secuenciación de ARN de hHSC tratadas con TGF- β + RPV8 o TGF- β + RPV4 frente a hHSC tratadas solo con TGF- β .	162
IV.2	Análisis de expresión diferencial de genes que codifican proteínas mitocondriales (mito-DEGs) utilizando datos de secuenciación de ARN de hHSC activadas con TGF- β frente al tratamiento con vehículo (Veh).	163
IV.3	Análisis de expresión diferencial de genes que codifican proteínas mitocondriales (mito-DEGs) utilizando datos de secuenciación de ARN de hHSC tratadas con TGF- β + RPV4 frente a TGF- β	167
IV.4	Análisis de expresión diferencial de genes que codifican proteínas mitocondriales (mito-DEGs) utilizando datos de secuenciación de ARN de hHSC tratadas con TGF- β + RPV8 frente a TGF- β .	170

RESUMEN

La fibrosis hepática es un proceso fisiopatológico clave en la enfermedad hepática crónica independientemente de su etiología. Se asocia, en estadios avanzados, con complicaciones graves como la cirrosis, la hipertensión portal, el desarrollo de carcinoma hepatocelular y la insuficiencia hepática. Ante la limitada disponibilidad de terapias eficaces, la búsqueda de nuevas estrategias antifibróticas se erige como una prioridad en la medicina traslacional. En este contexto, las células estrelladas hepáticas (HSC), dada su función central en la fibrosis, representan una diana terapéutica fundamental. Si bien en condiciones fisiológicas las HSC permanecen quiescentes, la lesión hepática desencadena su activación y transdiferenciación a miofibroblastos, con la consiguiente producción excesiva de matriz extracelular (ECM) y el desarrollo de fibrosis.

El reposicionamiento farmacológico, enfocado en la búsqueda de nuevas indicaciones para fármacos ya existentes, constituye una estrategia prometedora para el desarrollo de terapias antifibróticas. En este sentido, rilpivirina (RPV), un inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa inversa utilizado en el tratamiento de la infección por VIH, ha demostrado propiedades hepatoprotectoras en estudios preclínicos, convirtiéndose en un candidato atractivo para la investigación de su potencial antifibrótico en el contexto de la enfermedad hepática.

Esta tesis doctoral evaluó el efecto antifibrogénico de RPV mediante modelos *in vitro* en HSC humanas activadas, tanto de origen primario como de una línea celular. Para abordar distintos aspectos de su activación, se utilizaron dos estímulos profibroticos: TGF- β , asociado principalmente a la fibrogénesis y la producción de ECM, y PDGF- $\beta\beta$, relacionado con la proliferación y migración celular. Este enfoque permitió una evaluación integral del impacto de RPV en las funciones de las HSC.

Inicialmente, se realizó un análisis del transcriptoma de HSC activadas con TGF- β , demostrando que RPV contrarresta las rutas y funciones asociadas

a la fibrogénesis de forma concentración-dependiente, incluyendo la organización de la ECM y la síntesis de colágeno, además de promover la apoptosis de las HSC activadas. En vista de estos hallazgos, se realizaron estudios detallados de procesos clave en la activación de las HSC, como la autofagia, la migración y proliferación, y la función mitocondrial. Los resultados mostraron que RPV atenúa la proliferación, migración y fibrogénesis inducidas por PDGF- $\beta\beta$, regulando negativamente genes del ciclo celular como *CCND1*, disminuyendo la expresión de marcadores fibrogénicos como COL1 α 1 y PDGFRB, e inhibiendo la vía de las MAPK. Además, RPV potenció la autofagia en HSC activadas por TGF- β , incrementando la formación de autofagosomas y autolisosomas, y acelerando el flujo autofágico, efecto que participó en la acción proapoptótica del fármaco en HSC activadas. En términos de función mitocondrial, RPV moduló la función y dinámica mitocondrial, contrarrestando las alteraciones bioenergéticas y morfológicas asociadas a la activación de las HSC por TGF- β .

Dado que el uso de estatinas, incluyendo simvastatina (SV), en combinación con otros fármacos para el tratamiento de la fibrosis hepática es actualmente un campo en investigación activa, se evaluó la capacidad de la SV para potenciar la actividad antifibrótica de RPV en HSC. Los resultados revelaron un efecto sinérgico antifibrótico de la combinación RPV-SV, caracterizado por la reducción de la expresión de marcadores fibrogénicos, el aumento de la apoptosis y la modulación de las vías de señalización STAT1/STAT3. Asimismo, se observó un efecto sinérgico antioxidante, evidenciado por la modulación de la vía Nrf2, un regulador clave de la respuesta antioxidante celular, y por la disminución de los niveles de especies reactivas de oxígeno mitocondriales.

Con el fin de profundizar en el análisis *in vitro* del efecto de RPV, y dado el papel fundamental de la comunicación intercelular en la patogénesis de la

fibrosis, se evaluó su impacto en el proteoma de las HSC activadas por TGF- β , así como en la secreción y composición proteica de los exosomas derivados de estas células. Tras validar el método de aislamiento de exosomas, el análisis proteómico reveló cambios globales en el proteoma tanto de las HSC como de sus exosomas tras la estimulación con TGF- β . En las HSC, TGF- β indujo, entre otros efectos, un aumento de la activación, fibrogénesis y motilidad celular, efectos que fueron prevenidos por el cotratamiento con RPV. En cuanto a los exosomas, TGF- β afectó diversos procesos, incluyendo la ruta Wnt y la apoptosis, junto con una disminución de la hemostasia, la coagulación y la motilidad celular. Algunos de los cambios inducidos por TGF- β en los exosomas fueron contrarrestados por el tratamiento con RPV, como la formación de coágulo de fibrina y la modulación de la ruta Wnt. Además, los exosomas derivados de las células estimuladas con TGF- β y tratadas con RPV en la concentración más alta mostraron una disminución en el contenido de proteínas relacionadas con la fibrogénesis, lo que sugiere, en conjunto, un papel modulador de la RPV en la comunicación intercelular mediada por exosomas durante la activación de las HSC.

También se exploró el impacto de RPV en la regeneración hepática (RH) *in vivo* utilizando un modelo de hepatectomía parcial del 70 % en roedores. Si bien los resultados confirmaron la eficacia del modelo quirúrgico para inducir la RH, RPV no ejerció un efecto adicional apreciable sobre la recuperación de la masa hepática, lo que coincide con la falta de efecto sobre los marcadores de proliferación celular y rutas implicadas en la RH.

En vista de los resultados, esta tesis doctoral resalta el papel de RPV como agente antifibrótico y describe los mecanismos subyacentes. Estos hallazgos pueden impulsar la investigación tanto para el desarrollo de nuevas terapias antifibróticas como para la identificación de estas vías como potenciales dianas terapéuticas.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA (EHC).....	3
I.1.1. DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA	3
I.1.2. EPIDEMIOLOGÍA	4
I.2. FIBROSIS HEPÁTICA.....	5
I.2.1. ESTRUCTURA Y FISIOLÓGÍA HEPÁTICA.....	5
I.2.2. DESARROLLO DE LA FIBROSIS HEPÁTICA	6
I.2.2.1. PRINCIPALES CÉLULAS IMPLICADAS EN LA FIBROSIS HEPÁTICA	6
I.2.2.2. COMUNICACIÓN CELULAR EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS	10
I.2.3. VESÍCULAS EXTRACELULARES (EV)	12
I.2.3.1. DEFINICIÓN Y TIPOS DE EV	12
I.2.3.2. ESTRUCTURA DE LOS EXOSOMAS	15
I.2.3.3. EXOSOMAS EN EL HÍGADO: PAPEL EN LA PATOLOGÍA HEPÁTICA ...	16
I.2.4. PRINCIPALES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MOLECULAR IMPLICADAS EN LA FIBROGÉNESIS HEPÁTICA	18
I.2.4.1. SEÑALIZACIÓN DE PDGF	18
I.2.4.2. SEÑALIZACIÓN DE TGF- β	20
I.2.5. MECANISMOS IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS.....	21
I.2.5.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y RESPUESTA ANTIOXIDANTE	21
I.2.5.2. AUTOFAGIA.....	24
I.2.5.3. MITOCONDRIA	28
I.3. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS EN LA FIBROSIS HEPÁTICA	37
I.3.1. ENSAYOS PRECLÍNICOS DE FÁRMACOS DIRIGIDOS A LAS VÍAS MOLECULARES IMPLICADAS EN LA FIBROSIS HEPÁTICA	38

I.3.2. ENSAYOS CLÍNICOS DE FÁRMACOS PARA LA PREVENCIÓN O EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS HEPÁTICA.....	41
I.3.3. REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS	44
I.3.3.1. DEFINICIÓN Y CONCEPTO	44
I.3.3.2. SIMVASTATINA (SV)	45
I.3.3.3. RILPIVIRINA (RPV)	48
I.4. REGENERACIÓN HEPÁTICA (RH).....	50
I.4.1. TIPOS DE RH	50
I.4.2. MODELOS <i>IN VIVO</i> EMPLEADOS PARA EL ESTUDIO DE LA RH.....	50
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	57
CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS	61
III.1. FÁRMACOS Y REACTIVOS	63
III.1.1. FÁRMACOS EMPLEADOS.....	63
III.1.2. REACTIVOS PARA CULTIVO CELULAR.....	63
III.2. MODELOS EXPERIMENTALES Y TÉCNICAS.....	64
III.2.1. MODELOS <i>IN VITRO</i>	64
III.2.1.1. LÍNEAS CELULARES HUMANAS	64
III.2.1.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS PRIMARIAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS HUMANAS (hHSC).....	64
III.2.1.3. TRATAMIENTOS <i>IN VITRO</i>	66
III.2.2. MODELO <i>IN VIVO</i> DE HPX 70 %	66
III.2.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.....	69
III.2.3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS DE CULTIVO CELULAR Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA CELULAR TOTAL	69
III.2.3.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL EN TEJIDO HEPÁTICO.....	69
III.2.3.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: ENSAYO DE ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA).....	70

III.2.3.4. WESTERN BLOTTING (WB).....	71
III.2.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	75
III.2.4.1. EXTRACCIÓN DE ARN DE CULTIVO CELULAR.....	75
III.2.4.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE TEJIDO HEPÁTICO.....	75
III.2.4.3. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc) POR RETROTRANSCRIPCIÓN (RT).....	76
III.2.4.4. RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR).....	76
III.2.4.5. SILENCIAMIENTO GÉNICO TRANSITORIO MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA.....	78
III.2.5. ENSAYO DE QUIMIOTAXIS DE hHSC.....	80
III.2.6 ENSAYO DE CIERRE DE LA HERIDA.....	81
III.2.7. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.....	82
III.2.7.1. ESTUDIO DE VIABILIDAD MEDIANTE MTT.....	82
III.2.7.2. ESTUDIO DE VIABILIDAD MEDIANTE FOSFATASA ÁCIDA Y CÁLCULOS DE SINERGIA.....	83
III.2.8. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	84
III.2.8.1. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	84
III.2.8.2. EVALUACIÓN DE AUTOFAGIA.....	86
III.2.8.3. EVALUACIÓN DE LA SINERGIA SV-RPV.....	89
III.2.9. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....	90
III.2.10. ANÁLISIS DE BIOENERGÉTICA MEDIANTE EL ANALIZADOR SEAHORSE XF.....	91
III.2.11. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE EV.....	92
III.2.11.1. AISLAMIENTO DE EV.....	92
III.2.11.2. ANÁLISIS DE SEGUIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA).....	94
III.2.11.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM) PARA EL ANÁLISIS DE EV.....	95

III.2.11.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS CÉLULAS Y LAS EV	96
III.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRESENTACIÓN DE DATOS.....	97
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	99
SECCIÓN A. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RPV EN HSC ACTIVADAS POR TGF- β MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN	101
SECCIÓN.B. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RILPIVIRINA EN HSC ACTIVADAS POR PDGF- $\beta\beta$	109
IV.B.1. EFECTO EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	109
IV.B.2. EFECTO EN MARCADORES DE FIBROGÉNESIS Y METABÓLICOS	111
IV.B.3. EFECTO EN LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE MAPK.....	113
V.B.4. EFECTO EN LA MIGRACIÓN CELULAR	115
SECCIÓN C. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RILPIVIRINA EN LA AUTOFAGIA EN HSC ACTIVADAS POR TGF- β	118
IV.C.1. EFECTO EN LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE MARCADORES AUTOFÁGICOS	118
IV.C.2. EFECTO EN LA FORMACIÓN DE LISOSOMAS Y ESTRUCTURAS AUTOFÁGICAS	122
SECCIÓN D. CARACTERIZACIÓN DE LA SINERGIA DE RPV-SV EN HSC EXPUESTAS A TGF- β	127
IV.D.1. EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.....	127
IV.D.2. EFECTO EN LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS	130
IV.D.3. EFECTO EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE FIBROGÉNESIS ...	132
IV.D.4. MODULACIÓN DE LAS VÍAS STAT3/STAT1 Y LA EXPRESIÓN DE COL1A1	135
IV.D.5. EFECTO SOBRE LA VÍA NRF2/ARE	136
IV.D.6. IMPACTO DE LA TERAPIA COMBINADA SV-RPV Y SILENCIAMIENTO DE NRF2 EN LA EXPRESIÓN DE COLÁGENO, PRODUCCIÓN DE ROS Y VIABILIDAD CELULAR.....	142

SECCIÓN E. CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE RPV SOBRE LA MITOCONDRIA EN HSC ACTIVADAS CON TGF- β	146
IV.E.1. MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	146
IV.E.2. EFECTO EN LA MASA MITOCONDRIAL.....	149
IV.E.3. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL	151
IV.E.4. EFECTO EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES MITOCONDRIALES MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN.....	155
SECCIÓN F. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RPV EN EL PROTEOMA DE HSC ACTIVADAS POR TGF- β Y EN LA SECRECIÓN Y COMPOSICIÓN PROTEICA DE EXOSOMAS.....	176
IV.F.1. EFECTO DE RPV EN EL PROTEOMA DE HSC ACTIVADAS POR TGF- β	176
IV.F.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS EXOSOMAS SECRETADOS POR LAS HSC ...	187
IV.F.3. EFECTO DE RPV EN EL CONTENIDO PROTEICO DE LOS EXOSOMAS DE HSC ACTIVADAS POR TGF- β	189
SECCIÓN G. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RPV EN UN MODELO <i>IN VIVO</i> DE REGENERACIÓN HEPÁTICA 70 %.....	199
IV.G.1. EFECTO DE RPV EN LA RECUPERACIÓN HEPÁTICA Y MARCADORES PLASMÁTICOS	199
IV.G.2. EFECTO DE RPV EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN Y HEPATOCITOS DIFERENCIADOS	201
IV.G.3. EFECTO DE RPV EN LAS PRINCIPALES RUTAS DE REGENERACIÓN HEPÁTICA.....	204
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	209
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	245
BIBLIOGRAFÍA	250
ANEXOS	301

Capítulo I
INTRODUCCIÓN

I.1. ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA (EHC)

I.1.1. DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA

La enfermedad hepática crónica (EHC) se define como una alteración en la función hepática con una evolución progresiva durante un periodo mínimo de seis meses. Se trata de un proceso dinámico que involucra inflamación persistente y un desequilibrio entre la destrucción y la regeneración del parénquima hepático, lo que eventualmente resulta en desarrollo de fibrosis, y, en última instancia, cirrosis (1,2). A medida que se avanza en las diferentes etapas del daño hepático, se produce una alteración en la arquitectura del hígado que involucra la formación de nódulos regenerativos de parénquima, depósito excesivo de matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), angiogénesis y cambios significativos en la arquitectura vascular del órgano, lo que, a su vez, puede resultar en el desarrollo de hipertensión portal y varias complicaciones relacionadas (encefalopatía hepática, ascitis, síndrome hepatorenal, etc.). Además, los pacientes que experimentan progresión en la fibrosis poseen riesgo de desarrollar cáncer primario de hígado, en particular carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés) (2,3).

La velocidad de progresión de las EHC depende de varios factores, como la etiología subyacente, la edad y la presencia de agresiones agudas adicionales (1,4). Entre las etiologías más comunes de la EHC se encuentran la esteatosis hepática metabólica (MASLD, por sus siglas en inglés), la esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH, por su siglas en inglés), la enfermedad hepática alcohólica, las hepatitis virales (hepatitis B, C y D), diversas enfermedades metabólicas hereditarias (deficiencia de α -1 antitripsina, hemocromatosis hereditaria y la enfermedad de Wilson), las enfermedades autoinmunes (hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria y colangitis esclerosante primaria) y las enfermedades vasculares (síndrome de Budd-Chiari). Sin embargo, en aproximadamente un 15 % de los casos, las EHC se presenta de forma idiopática, sin una causa claramente identificable (1,2,4).

I.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La EHC se ha consolidado como un problema de salud pública a nivel mundial debido a su impacto en términos de morbilidad, mortalidad y costes sanitarios. En las últimas décadas, su prevalencia ha experimentado un aumento significativo, especialmente en los países desarrollados, donde este incremento se atribuye fundamentalmente al aumento de casos de enfermedad hepática alcohólica y MASLD (5,6). En España, a pesar de que durante los últimos 30 años la hepatitis C (HCV, por sus siglas en inglés) ha sido la principal causa de EHC, los avances en el tratamiento antiviral y las estrategias de cribado han reducido considerablemente su impacto. Actualmente, la infección por el virus de la hepatitis B (HBV, por sus siglas en inglés) afecta aproximadamente al 0,7 % de la población española, mientras que la enfermedad hepática alcohólica y, especialmente, la MASLD, se han convertido en los principales problemas de salud hepática. Esta última está estrechamente vinculada a la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2, con una prevalencia estimada del 30 % en la población general española (7).

En términos de mortalidad se estima que la EHC es responsable de más de dos millones de muertes anuales a nivel global, lo que representa el 4 % del total de fallecimientos. El HCC contribuye sustancialmente a esta cifra, con entre 600,000 y 900,000 muertes anuales. En este contexto, la fibrosis hepática se erige como la característica histopatológica con mayor impacto en la mortalidad. Su progresión a estadios avanzados, como la cirrosis, reduce drásticamente las opciones terapéuticas, siendo el trasplante de hígado el único recurso disponible. De hecho, la cirrosis se encuentra entre las principales causas de muerte a nivel mundial, ocupando el décimo lugar en África, el noveno en el Sudeste Asiático y Europa, y el quinto en la región del Mediterráneo Oriental (8,9).

I.2. FIBROSIS HEPÁTICA

I.2.1. ESTRUCTURA Y FISIOLÓGÍA HEPÁTICA

El hígado, siendo órgano central en la homeostasis corporal, desempeña diversas funciones esenciales, como el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, la biotransformación de xenobióticos (incluidos fármacos), la síntesis de proteínas plasmáticas, la secreción de bilis o el almacenamiento de glucógeno (10,11).

Desde el punto de vista anatómico, está compuesto por cuatro lóbulos, dos principales (derecho e izquierdo) y dos menores (caudado y cuadrado), formados por unidades funcionales conocidas como lobulillos hepáticos. Éstos se caracterizan por su estructura hexagonal y están compuestos por una vena central desde la que irradian los cordones de hepatocitos hacia las tríadas portales (vena porta, arteria hepática y conducto biliar), situadas en los vértices del hexágono (Figura I.1). Los cordones de hepatocitos están separados por sinusoides hepáticos, capilares fenestrados revestidos por células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC, por sus siglas en inglés) que facilitan el intercambio de sustancias entre la sangre y los hepatocitos. En los sinusoides se localizan las células de Kupffer (macrófagos residentes), mientras que las células estrelladas hepáticas (HSC, por sus siglas en inglés) se encuentran en el espacio de Disse (espacio perisinusoidal), situado entre los cordones de hepatocitos y los sinusoides (10–12). La irrigación sanguínea de este órgano ocurre a través de dos vías principales: la arteria hepática, que suministra sangre oxigenada y representa aproximadamente el 25 % del flujo sanguíneo hepático, y la vena porta hepática, que aporta sangre desoxigenada procedente del tracto gastrointestinal, constituyendo el 75 % del flujo sanguíneo al hígado. Este dualismo en la irrigación permite al hígado procesar los nutrientes y otras sustancias absorbidas desde el intestino antes de que ingresen en la circulación sistémica, asegurando una filtración y regulación adecuada de los metabolitos (10,13).

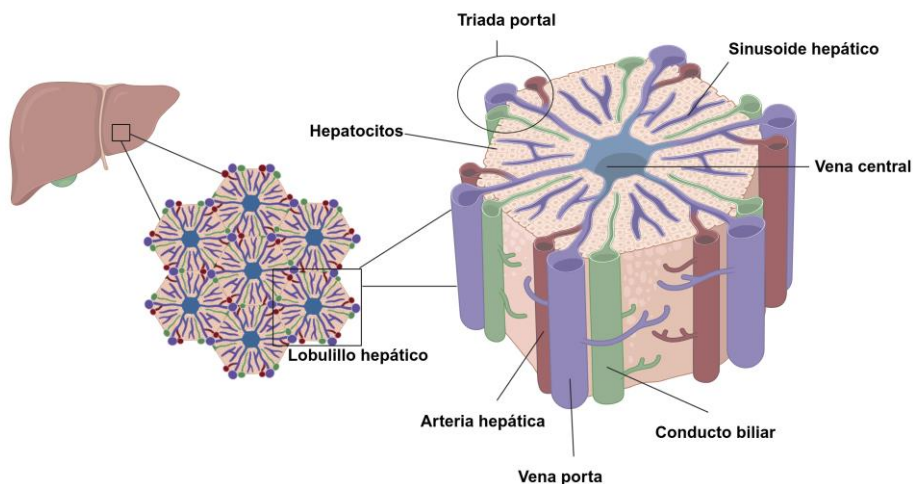


Figura I.1. Estructura del hígado, tipos celulares presentes y vasculatura hepática.

I.2.2. DESARROLLO DE LA FIBROSIS HEPÁTICA

En un contexto de lesión hepática aguda, la respuesta fibrótica es un mecanismo fisiológico de reparación modulado por el sistema inmunitario, donde las HSC activadas producen ECM que actúa protegiendo del daño a los hepatocitos, aumentando la resistencia del hígado a daños agudos y permitiendo la restauración completa de la arquitectura hepática una vez cesa el estímulo lesivo; en este punto, el hígado es capaz de restaurar su arquitectura original. Sin embargo, la respuesta fibrótica se vuelve patológica cuando se cronifica en el contexto de una lesión hepática persistente, dando lugar a una reparación tisular alterada con una respuesta inflamatoria desregulada y una acumulación excesiva de ECM (14–17).

I.2.2.1. PRINCIPALES CÉLULAS IMPLICADAS EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

Si bien el desarrollo de la fibrosis en el hígado involucra la interacción de diversos tipos celulares, incluyendo hepatocitos, LSEC y células del sistema inmunitario, este trabajo se centrará específicamente en las HSC.

A. Hepatocitos

Los hepatocitos representan el 80 % del parénquima hepático y desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis corporal. Entre sus principales funciones se encuentran la síntesis de proteínas esenciales como la albúmina y los factores de coagulación, la secreción de ácidos biliares, la síntesis de glutamina, la formación de urea y la gluconeogénesis (18). Además, la presencia de un sistema enzimático altamente especializado (citocromo P450), le permite reconocer y modificar una amplia variedad de compuestos, permitiendo su eliminación a través de la bilis o la orina (15). Ante una lesión hepática, los hepatocitos no solo son células diana del daño, sino que también contribuyen en la activación del proceso de fibrogénesis. En muchos casos, la lesión desencadena la muerte de los hepatocitos, que, independientemente del mecanismo (necrosis, necroptosis, piroptosis o apoptosis), provoca la liberación de contenido intracelular al espacio extracelular (19). Las moléculas secretadas, fundamentalmente patrones moleculares asociados al daño (DAMP, por sus siglas en inglés), median la interacción de los hepatocitos dañados con las células circundantes, incluyendo hepatocitos adyacentes, HSC, células de Kupffer, LSEC y células inmunitarias infiltradas. Esta interacción activa la respuesta inflamatoria en el hígado, lo que a su vez promueve la activación de las HSC, el primer paso para la progresión de la fibrosis (20,21). Además, los hepatocitos dañados secretan exosomas que pueden contener microARNs (miARN) capaces de activar las HSC (22,23).

B. HSC

Las HSC representan el 10 % de la población celular residente en el hígado y son las principales responsables del desarrollo de la fibrosis hepática. Su localización estratégica, junto con sus prolongaciones citoplasmáticas dendríticas, facilita el contacto directo entre ellas, además de establecer contacto con hepatocitos circundantes, LSEC y células de Kupffer (9,24,25). En condiciones fisiológicas, se mantienen en un estado quiescente desempeñando

funciones de almacenamiento y metabolismo de la vitamina A y retinoides, producción de ECM tras lesiones agudas, vasorregulación, inmunorregulación, detoxificación de fármacos y regeneración (15,26). Sin embargo, en respuesta a una lesión hepática persistente, las HSC se activan y transdiferencian de un fenotipo quiescente a un fenotipo de miofibroblasto, proliferativo, quimiotáctico y contráctil. Durante este proceso, las HSC pierden progresivamente su morfología estrellada y sus gotas lipídicas, al tiempo que producen componentes de la ECM (colágeno de tipo I, III y IV, fibronectina, laminina y proteoglicanos) y mediadores proinflamatorios (interleuquinas como IL-6 e IL-8). Además, la activación promueve la expresión de niveles altos de alfa actina de músculo liso (α -SMA, por sus siglas en inglés) y el inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP-1, por sus siglas en inglés), que contribuyen al fenotipo profibrótico (9). El proceso de activación de las HSC se puede dividir en dos etapas principales: la iniciación (o fase preinflamatoria), que hace referencia a los primeros cambios en la expresión génica poco después del daño, y la perpetuación, que corresponde al mantenimiento de un fenotipo activado y al desarrollo de la fibrosis (Figura I.2).

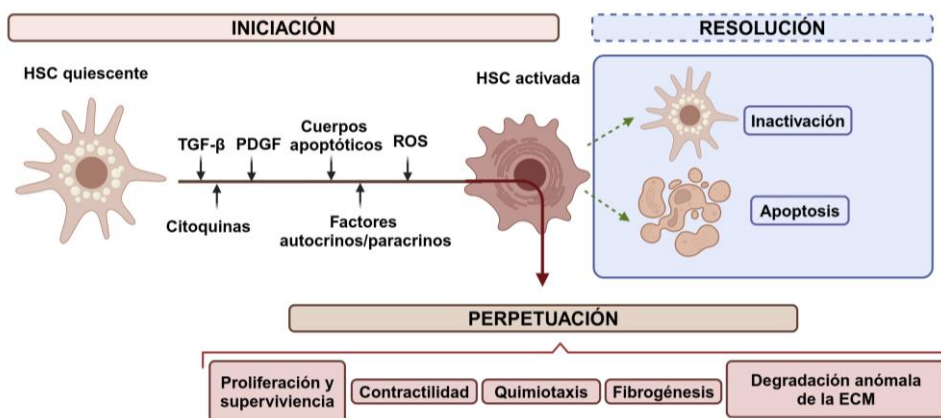


Figura I.2. Fases de la activación de las HSC y respuesta profibrótica asociada. ECM, matriz extracelular; HSC, células estrelladas hepáticas; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; ROS, especies reactivas de oxígeno; TGF- β , factor de crecimiento transformante β .

La primera fase se desencadena por la estimulación paracrina de las HSC a través de los productos de los hepatocitos dañados, las señales de las células de Kupffer y las LSEC, incluyendo las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, del inglés) y peróxidos lipídicos. La segunda etapa se caracteriza por la perpetuación de los estímulos iniciales, principalmente mediante las citoquinas y factores de crecimiento liberados por macrófagos y otros tipos celulares. Esta persistencia desencadena una mayor proliferación y contractilidad de las HSC, la producción de mediadores proinflamatorios y quimioatrayentes y un desequilibrio entre la síntesis y la degradación de la ECM (9,27). Tras la activación de las HSC, la respuesta celular predominante, ya sea proproliferativa o antiproliferativa, definirá su destino. Una respuesta antiproliferativa conlleva la inactivación de las HSC, retornando a un estado quiescente, o la inducción de su muerte mediante apoptosis. En contraste, la predominancia de una respuesta proproliferativa perpetúa el fenotipo proinflamatorio y profibrótico (9,28).

Si bien las HSC son reconocidas por su rol en la fibrosis, también modulan la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Su sensibilidad a los DAMP activa vías proinflamatorias como la de la NF- κ B, induciendo la producción de citoquinas y quimioquinas (CCL2, CXCL10 y CCL5), que amplifican la inflamación local. A pesar de que su producción de mediadores inflamatorios es menor que la de las células inmunitarias, su capacidad de presentar antígenos y expresar quimioquinas e integrinas les permite modular la inmunidad adaptativa y la quimiotaxis celular, actuando como sensores y reguladores del microambiente hepático (29,30).

C. Células del sistema inmunitario

La inflamación causada por un daño hepático agudo se considera un factor beneficioso para el proceso de regeneración del hígado. Sin embargo, la cronificación de este proceso juega un papel crucial en la activación de las HSC

y el desarrollo de la fibrosis. Diversas células inflamatorias, como las células de Kupffer y macrófagos derivados de monocitos, liberan una serie de mediadores que promueven la activación de las HSC. Entre estos mediadores destacan el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β , por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) (15). Por otro lado, los neutrófilos son las primeras células que responden a la lesión hepática y facilitan la eliminación de hepatocitos apoptóticos, además de atraer citoquinas proinflamatorias, como IL-8, IL-18, IL-17, CCL3, CCL4 y CXCL2 (31).

D. LSEC

En condiciones fisiológicas, las LSEC desempeñan un papel fundamental en la regulación del transporte de nutrientes, la interacción con células del sistema inmunitario y la secreción de factores de crecimiento; además, contribuyen al mantenimiento de las HSC en estado quiescente. En cambio, en el contexto del daño hepático crónico, las LSEC sufren un proceso de capilarización, perdiendo sus fenestraciones y reduciendo la producción de óxido nítrico, clave para el mantenimiento de su función. Como consecuencia, pierden su capacidad de mantener la quiescencia de las HSC y comienzan a secretar factores profibróticos, contribuyendo a la progresión del daño (15,32).

1.2.2.2. COMUNICACIÓN CELULAR EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS

El desarrollo de la fibrosis hepática se ve impulsado por una compleja red de interacciones celulares y moleculares, estableciendo un ciclo de retroalimentación positiva que perpetúa el daño hepático. Este ciclo se caracteriza por la liberación de mediadores proinflamatorios y profibróticos, y la activación de células clave en la patogénesis de la fibrosis, como las HSC y las células de Kupffer (Figura 1.3). En respuesta al daño hepático, se liberan citoquinas proinflamatorias como interleuquinas (IL-6, IL-1 β), factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), factores de crecimiento, ROS y DAMP. Estas señales, provenientes tanto de hepatocitos dañados (o apoptóticos) como

de células inmunitarias reclutadas en el sitio de la lesión, activan rápidamente a las HSC y atraen a las células de Kupffer. Estos dos tipos celulares actúan como fagocitos, eliminando restos celulares y potenciando el reclutamiento de células inmunitarias al contribuir de manera paracrina a la señalización proinflamatoria y profibrótica. Al mismo tiempo, todas estas señales actúan de manera autocrina, incrementando la activación de las HSC (fundamentalmente por TGF- β) y su migración y proliferación (principalmente por PDGF). Este microambiente proinflamatorio y profibrogénico se ve reforzado por la capacidad de las células de Kupffer, junto a otras células hepáticas como las LSEC y los hepatocitos, de secretar quimioquinas (CCL2, CCL5, CXCL1) que amplifican el reclutamiento de leucocitos a las zonas de daño. Los monocitos, a su vez, liberan mediadores como la ASK1, pancaspasa y Gal-3, perpetuando un ciclo deletéreo que exacerba el daño hepatocelular, la inflamación y la activación de las HSC (15,29,33).

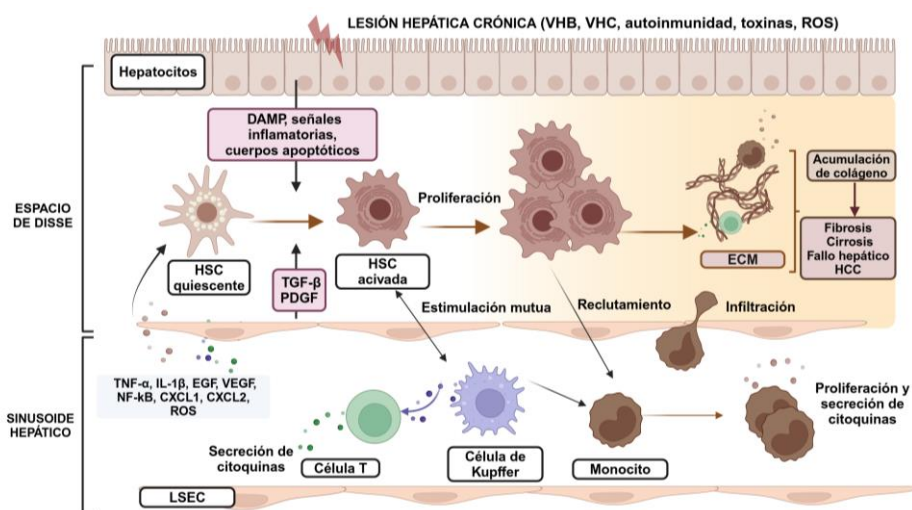


Figura I.3. Principales células implicadas y comunicación intercelular en el desarrollo de la fibrosis. Abreviaturas destacadas: ECM, matriz extracelular; EGF, factor de crecimiento epidérmico; HCC, carcinoma hepatocelular; HSC, células estrelladas hepáticas; LSEC, células endoteliales sinusoidales hepáticas; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; ROS, especies reactivas de oxígeno; TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; TNF- α , factor de necrosis tumoral α ; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; VHB, virus de la hepatitis B; VHC, virus de la hepatitis C.

Por último, un aspecto crucial en la perpetuación de la fibrosis es la desregulación del equilibrio entre la síntesis y la degradación de la ECM. Si bien los macrófagos pueden degradar la ECM mediante la secreción de metaloproteinasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés), este proceso se ve contrarrestado por la producción de TIMP por parte de miofibroblastos activados y macrófagos proinflamatorios, lo que inhibe la degradación de la ECM, favoreciendo su acumulación y la progresión de la fibrosis (15,34).

I.2.3. VESÍCULAS EXTRACELULARES (EV)

I.2.3.1. DEFINICIÓN Y TIPOS DE EV

Las vesículas extracelulares (EV, por sus siglas en inglés) son partículas delimitadas por una bicapa lipídica que son activamente sintetizadas y secretadas al medio extracelular por una multitud de tipos celulares. Son capaces de transportar una amplia gama de componentes, incluyendo receptores de superficie celular, proteínas de señalización, factores de transcripción, enzimas y proteínas de ECM, así como lípidos y ácidos nucleicos (miARN, ARNm y ADN) (35,36). La importancia de estas partículas radica en sus múltiples funciones fisiológicas, como la comunicación intercelular (por ejemplo, transfieren moléculas de señalización como citoquinas, receptores de adhesión, ácidos nucleicos reguladores, metabolitos, nutrientes y cofactores), permitiendo modificar la composición y función de las células receptoras. También pueden servir como marcadores diagnósticos, ya que la cantidad secretada y/o su composición se ve modificada en diversas patologías. Por último, las EV pueden emplearse como sistemas naturales de administración de fármacos, presentando una baja citotoxicidad e inmunogenicidad (37).

Los tres subtipos principales de EV son las microvesículas (MV), los exosomas y los cuerpos apoptóticos, diferenciándose en función de su biogénesis, vías de liberación, tamaño, contenido y función. Además, recientemente se han identificado tipos adicionales de EV, como oncosomas, migrasomas, ectosomas

y exómeros (36,38). La biogénesis de las EV, incluyendo los exosomas y las MV, involucra mecanismos celulares distintos que determinan su origen y composición (Figura I.4).

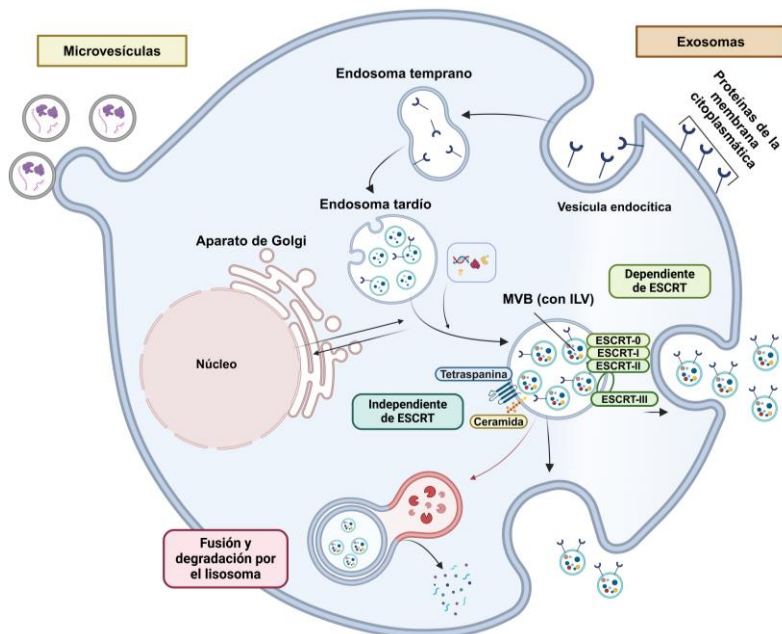


Figura I.4. Biogénesis de los exosomas y microvesículas. Fases y rutas de la formación de los exosomas. ESCRT, complejo de clasificación de endosomas requerido para el transporte; ILV, vesículas intraluminales; MVB, cuerpos multivesiculares.

Los exosomas se originan en la red endosomal, que comienza con la invaginación de la membrana plasmática y la internalización de material extracelular en vesículas endocíticas (39–41). Estas vesículas se fusionan para formar los endosomas tempranos, donde se clasifican las moléculas internalizadas para su reciclaje, degradación o secreción (42). Las moléculas destinadas a la secreción se incorporan en vesículas intraluminales (ILV, por sus siglas en inglés), formadas por la invaginación de la membrana limitante de los endosomas tardíos (producto de la maduración de los endosomas tempranos), constituyendo los cuerpos multivesiculares (MVB, por sus siglas en inglés). Los MVB interactúan dinámicamente con otros orgánulos o

compartimentos, incluyendo el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático (ER, por sus siglas en inglés), las mitocondrias y los fagosomas. Por ello, diferentes componentes como ARN, ADN, proteínas o lípidos son internalizados en las ILV (43). La formación de ILV puede ocurrir a través de una ruta dependiente de los complejos endosomales de clasificación requeridos para el transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés) o mediante una ruta independiente de ESCRT (44). La ruta dependiente de ESCRT involucra la acción secuencial de estos complejos: ESCRT-0 controla la selección del cargo, ESCRT-I y II controlan la invaginación de la membrana intraluminal y ESCRT-III la fisión de la membrana endosomal. Sin embargo, en la ruta independiente de ESCRT participan lípidos de membrana específicos (como ceramidas) y proteínas (como las tetraspaninas (CD63, CD9)) en la formación de ILV (44,45). Una vez formados, los MVB pueden seguir dos rutas: fusionarse con lisosomas para la degradación de su contenido o fusionarse con la membrana plasmática, liberando las ILV al espacio extracelular como exosomas (45–47).

Las MV, sin embargo, se generan por un proceso de evaginación directa de la membrana plasmática regulado por la dinámica del citoesqueleto, la composición lipídica de la membrana y el influjo de calcio (36). Por último, los cuerpos apoptóticos representan fragmentos de células muertas y se originan a partir de la formación de vesículas en la membrana plasmática durante la apoptosis, autofagia y necrosis programada (35,48) (Figura I.4).

Tras su liberación al espacio extracelular, las EV son capaces de interactuar con células receptoras, modulando así su comportamiento y función. Esta interacción se inicia con el anclaje de las EV a la membrana plasmática de la célula diana mediante la unión específica a receptores de superficie, tras lo cual las EV pueden ser internalizadas a través de diversos mecanismos, incluyendo endocitosis, interacción ligando-receptor o fusión directa con la membrana plasmática (49).

Es importante destacar que la clasificación de las EV presenta un desafío debido a la falta de marcadores específicos que permitan determinar con precisión su vía de biogénesis en función de su contenido molecular. Esta dificultad en la clasificación ha llevado a la comunidad científica a adoptar un sistema basado en las propiedades físicas de las EV, como su tamaño, tal y como recomienda la *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV). En base a este criterio, se distinguen dos categorías principales: EV grandes (entre 100 y 1000 nm, la mayoría con menos de 400 nm), y EV pequeñas (de 40 a 200 nm). Las EV grandes se caracterizan por la presencia de marcadores de MV, como el factor de ribosilación ADP 6 y la anexina V, mientras las pequeñas se enriquecen con marcadores típicos de exosomas, como el CD63, CD81 y CD9. Sin embargo, esta forma de clasificación tiene ciertas limitaciones, como la existencia de una superposición en el rango de tamaño de las diferentes subpoblaciones de EV y el hecho de que la presencia de marcadores específicos no siempre es excluyente de una vía de biogénesis particular (50,51).

I.2.3.2. ESTRUCTURA DE LOS EXOSOMAS

Se han identificado una gran variedad de elementos constitutivos en los exosomas, incluyendo aproximadamente 4400 proteínas, 194 mARN, 764 miARN, lo que muestra su complejidad y diversidad funcional (52) (Figura I.5). Entre las proteínas más abundantes se encuentran las tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81), que tienen un papel fundamental en la penetración, invasión y fusión; las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de clase I y II; las de choque térmico 70 y 90 (HSP70 y HSP90, por sus siglas en inglés) como parte de la respuesta al estrés; proteínas responsables del transporte y fusión de membranas (anexina, flotilina, Rab) y las involucradas en la formación de los MVB (Alix, TSG101) (44,52).

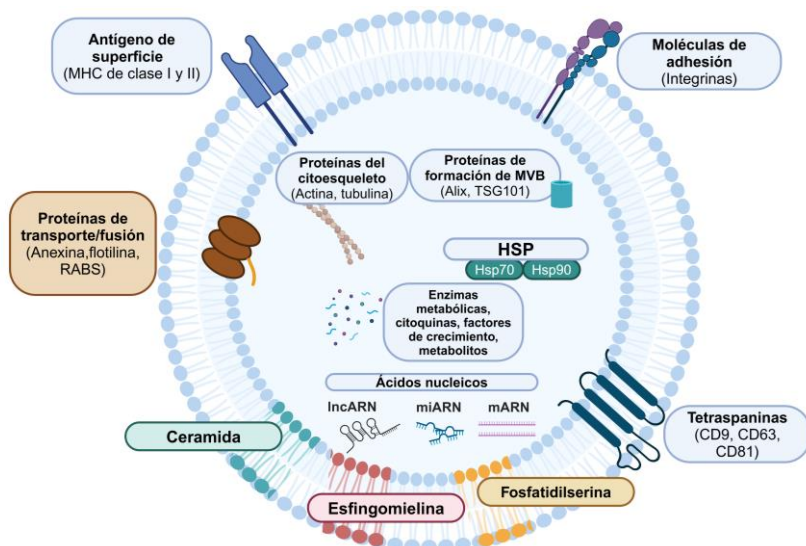


Figura I.5. Estructura y principales componentes de los exosomas. HSP, proteína de choque térmico; lncARN, *long non-coding ARN*; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; miARN, microARN; mARN, ARN mensajero; TSG101, *tumor susceptibility gene 101*.

I.2.3.3. EXOSOMAS EN EL HÍGADO: PAPEL EN LA PATOLOGÍA HEPÁTICA

En el hígado, las EV son secretadas por la mayoría de las células que lo componen, incluyendo hepatocitos, HSC, células de Kupffer y LSEC, desempeñando un papel crucial en la comunicación intercelular y en la regulación de diversas funciones hepáticas. Identificadas en diversos fluidos corporales (como sangre, saliva y orina), las EV se han propuesto como potenciales biomarcadores para biopsias líquidas en una variedad de enfermedades, entre las que se encuentran las patologías hepáticas (53–55). Este interés surge del hecho de que se ha observado que tanto la composición como la secreción de las EV cambian significativamente en etapas tempranas de daño hepático (incluso antes de la aparición de signos histológicos evidentes), lo que ha generado un creciente interés en su empleo tanto para el diagnóstico precoz de enfermedades hepáticas, como para el desarrollo de

terapias dirigidas enfocadas en la modulación de la liberación de EV o en la alteración de su contenido (54,56).

El reconocimiento de que las HSC son dianas de las EV ha puesto de relieve un nuevo mecanismo importante por el cual se modulan las vías fibrogénicas en el hígado y ha dado una nueva pista para nuevas terapias antifibróticas basadas en la supresión de la acción de las EV profibróticas o en el aprovechamiento de las EV intrínsecamente antifibróticas. Por un lado, se ha observado que las EV derivadas de macrófagos del fenotipo antiinflamatorio inhiben la activación de HSC en MASH, sugiriendo que su inhibición podría ser terapéutica (57). En esta línea, se ha descrito que las EV de hepatocitos sanos, de diversas células madre o el suero de ratones sanos tienen la capacidad de inhibir la fibrosis hepática experimental al suprimir las respuestas inflamatorias y/o las vías de activación de las HSC (58–66). En contraste, las EV derivadas de hepatocitos infectados por HCV o HCB o que han estado expuestos a agentes como alcohol, CCl₄ o palmitato, secretan EV que no solo estimulan a los macrófagos y la función inflamatoria, si no que estimulan también la fibrogénesis (67–70).

Si bien la interacción entre las EV derivadas de hepatocitos y otros tipos celulares hepáticos ha sido ampliamente estudiada, el papel de las EV provenientes de las HSC en la patogénesis de la fibrosis hepática aún se encuentra en investigación (35). La evidencia actual sugiere que las HSC utilizan las EV como mediadores de señalización autocrina y paracrina, modulando la actividad tanto de HSC adyacentes como de otras células del microambiente hepático. En este contexto, se ha observado que las HSC activadas secretan un mayor número de EV en comparación con las HSC quiescentes, y que estas EV poseen una composición molecular distinta que refleja su estado de activación (37). Por ejemplo, mientras que las HSC en estado de quiescencia secretan EV que contienen miR-214, miR-199-5p y la proteína relacionada con twist 1, las cuales contribuyen a mantener la quiescencia de las HSC adyacentes al inhibir la señalización del factor de

crecimiento del tejido conectivo (CTGF, por sus siglas en inglés), la activación de las HSC induce un aumento en los niveles de CTGF, lo que, a su vez, regula al alza la expresión de genes profibróticos. Este cambio en la composición de las EV contribuye a la propagación de la señalización profibrótica y a la activación de otras HSC (37). Del mismo modo, se ha observado que la estimulación de HSC con PDGF- $\beta\beta$ induce la liberación de EV enriquecidas con el receptor de PDGF- α . Estas EV, al ser captadas por otras HSC, promueven la transcripción de genes profibróticos, exacerbando así la fibrosis hepática. Además, las EV liberadas por HSC estimuladas con PDGF- $\beta\beta$ también contienen proteínas profibrogénicas como FGFR3 y Tie2, que inhiben la autofagia y promueven la migración de HSC (35,71).

En cuanto a la comunicación paracrina de las HSC mediante EV, se ha observado que las HSC activadas liberan exosomas enriquecidos en miR-19b y miR-200 que, al ser captados por los macrófagos, estimula la liberación de citoquinas profibróticas como IL-6 y TNF- α por parte de estas células, promoviendo la inflamación hepática y la fibrosis. Además, en condiciones de hipoxia, las HSC activadas bajo la influencia del factor de transcripción sensible al oxígeno (HIF-1, por sus siglas en inglés), liberan exosomas cargados de proteínas relacionadas con la glucólisis, como GLUT1 y PKM2. Estos exosomas son internalizados por células no parenquimales del hígado, acelerando la glucólisis como respuesta al entorno hipóxico y promoviendo la proliferación de las HSC quiescentes (72).

I.2.4. PRINCIPALES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MOLECULAR IMPLICADAS EN LA FIBROGÉNESIS HEPÁTICA

I.2.4.1. SEÑALIZACIÓN DE PDGF

El PDGF es un factor determinante en la patogénesis de la fibrosis hepática, particularmente en la proliferación, diferenciación y migración de las HSC. Se han identificado cuatro cadenas polipeptídicas (subunidades) diferentes de

PDGF, denominadas PDGF-A, -B, -C y -D, que se combinan mediante enlaces disulfuro para formar homo o heterodímeros con funciones específicas (9). Entre los dímeros de PDGF, PDGF-BB (también conocido como PDGF- $\beta\beta$) destaca como la isoforma predominante en el contexto de la fibrosis hepática, y su secreción proviene tanto de células residentes en el hígado (células de Kupffer y colangiocitos), como de células infiltradas (plaquetas y monocitos). Las HSC no solo muestran una alta sensibilidad al PDGF- $\beta\beta$, sino que también son capaces de secretarlo, generando un ciclo autocrino que perpetúa la activación de las HSC (32,73).

PDGF ejerce sus efectos biológicos al unirse a receptores específicos de la superficie celular (PDGFR), que pertenecen a la familia de receptores tirosina quinasa y se expresan principalmente en LSEC, HSC y células de Kupffer (74,75). Esta unión desencadena diferentes dimerizaciones y fosforilaciones del receptor, lo que finalmente activa diversas vías de señalización como la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés), incluyendo JNK, ERK1/2, p38, la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt y la vía JAK/STAT. Todas estas vías culminan con la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de genes diana, incluyendo el colágeno de tipo I (*COL1A1*), *TIMP*, *MMP*, el regulador de la apoptosis *Bcl-2* y E3 ubiquitina-proteína ligasa (*XIAP*), resultando en la división celular, proliferación y apoptosis (5,9,76).

Por último, existen dos subtipos de PDGFR: PDGFR α , expresado tanto en HSC quiescentes como activadas, y PDGFR β , que se expresa principalmente en HSC activadas, lo que sugiere un papel crucial de este receptor en la fibrosis (5,76).

I.2.4.2. SEÑALIZACIÓN DE TGF- β

El TGF- β es una citoquina pleiotrópica con tres isoformas principales: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. Si bien cada isoforma posee funciones específicas, TGF- β 1 es la isoforma más estudiada en el contexto de la fibrogénesis hepática, ya que juega un papel crucial en la activación de HSC y la producción de ECM (9,32). En respuesta a una lesión hepática, se produce un aumento de la expresión de TGF- β (principalmente por macrófagos y LSEC), impulsando la activación de las HSC que, a su vez, secretan TGF- β , creando un ciclo de retroalimentación positiva que perpetúa la fibrogénesis (32). La síntesis de TGF- β da lugar a una molécula precursora inactiva que se acumula en la ECM asociada a una proteína de latencia. La activación de TGF- β requiere la escisión proteolítica de este complejo latente gracias a factores como el pH, la presencia de ROS y la interacción con integrinas.

Una vez activo, TGF- β 1 ejerce sus efectos biológicos al unirse a receptores específicos de la membrana, iniciado vías de señalización intracelular para regular la respuesta fibrogénica. Existen dos vías principales de señalización mediadas por TGF- β : la vía canónica (dependiente de Smad) y la no canónica (Figura I.6). En la primera, la unión de TGF- β a su receptor de tipo II induce el reclutamiento y la fosforilación del receptor de tipo I, desencadenando la fosforilación de las proteínas Smad (principalmente 2 y 3). Tras la fosforilación, estas proteínas se asocian a Smad4 y se translocan al núcleo, promoviendo la transcripción de genes diana, incluyendo aquellos que codifican para proteínas de la ECM como laminina, α -SMA, fibronectina y colágeno (principalmente tipo I y III) (77,78). La vía no canónica, sin embargo, es independiente de las proteínas Smad y activa rutas de señalización alternativas, involucrando proteínas quinasas como MAPK, ERK y JNK (32).

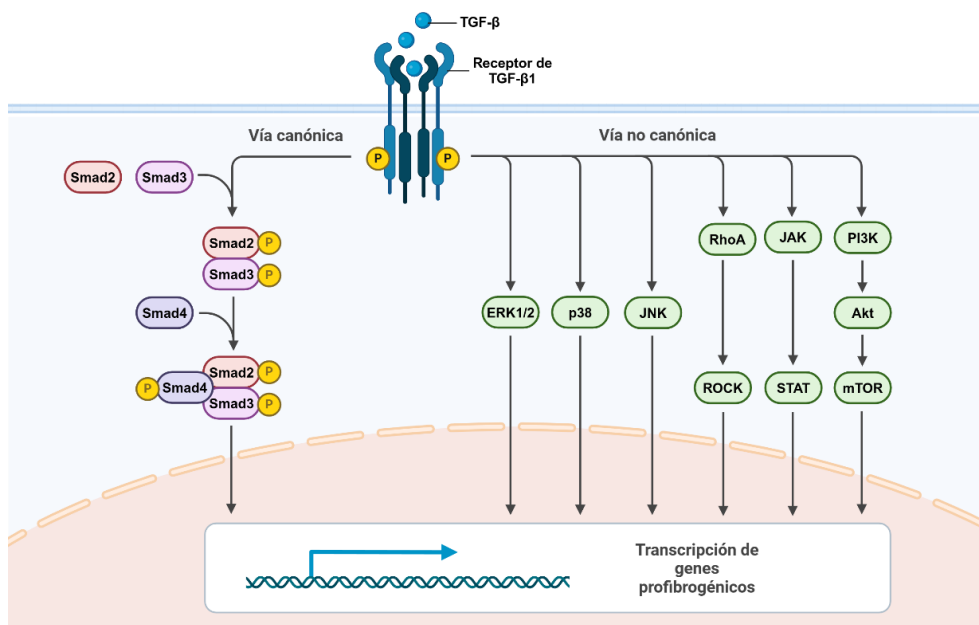


Figura I.6. Vía de señalización canónica y no canónica de TGF-β en el contexto de la activación de HSC. Abreviaturas destacadas: ERK1/2, proteína quinasa regulada por señales extracelulares 1/2; JNK, *c-Jun N-terminal kinase*; mTOR, diana de rapamicina en mamíferos; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; STAT, transductor de señal y activador de la transcripción.

I.2.5. MECANISMOS IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS

I.2.5.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y RESPUESTA ANTIOXIDANTE

El estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la fibrosis hepática, actuando como un desencadenante clave tanto en su inicio como en su progresión. Este proceso se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno, y la capacidad de los mecanismos de defensa antioxidante para neutralizarlas. Dicho desequilibrio redox resulta en la acumulación de estas especies reactivas, lo que a su vez induce disfunción celular y daño tisular. La relevancia del estrés oxidativo en el contexto de la fibrosis hepática se ve amplificada por el papel central del hígado en el metabolismo y la detoxificación, procesos que intrínsecamente generan

una cantidad significativa de ROS, incluyendo superóxidos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos (79). Las ROS se generan en todos los compartimentos intracelulares, pero el 90 % se produce en las mitocondrias, específicamente en la cadena de transporte de electrones (ETC, por sus siglas en inglés). Las fuentes no mitocondriales de ROS son las NADPH oxidasas (NOX, por sus siglas en inglés), las lipooxigenasas, las ciclooxigenasas, las peroxidases, la xantina oxidasa, las enzimas involucradas en la β -oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas y las oxidasas del citocromo P450 (9).

A niveles fisiológicos bajos, las ROS actúan como moléculas de señalización regulando procesos celulares esenciales. Sin embargo, cuando se alcanzan niveles elevados desencadenan daño celular, inflamación y fibrosis. En el contexto de la fibrosis hepática, la producción sostenida de ROS y otros mediadores reactivos por parte de hepatocitos dañados y células no parenquimales activadas contribuyen a la modulación del fenotipo de las HSC hacia un perfil profibrótico (9,32). Es más, un rasgo distintivo de las HSC activadas es la generación de niveles elevados de ROS, atribuido a una mayor actividad mitocondrial y a la sobreexpresión de las NOX. Este fenómeno se ha demostrado repetidamente mediante la inhibición o el silenciamiento de estas enzimas, resultando en una disminución de los estímulos profibróticos.

La activación de NOX en las HSC se ha descrito ampliamente como un factor crucial en diversas EHC, como la enfermedad hepática alcohólica, la MASLD, la cirrosis y el HCC. De hecho, activadores clásicos de la fibrogénesis, como TGF- β , pueden activar la vía de las MAPK/ERK y los factores de transcripción Smad, generando desequilibrios redox a través de la activación de varias enzimas NOX, lo que a su vez potencia la producción de colágeno (80).

El hígado presenta un complejo sistema antioxidante, conformado tanto por elementos enzimáticos como no enzimáticos, permitiendo así mantener una estricta regulación de las ROS. Entre las enzimas antioxidantes destacan la NADPH:quinona oxidoreductasa-1 (NQO1), la hemo-oxigenasa 1 (HO-1), la

superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa citosólica (GPX), la glutatión reductasa (GXR), las peroxirredoxinas (PRX), las tioredoxinas (TRX) y la catalasa (CAT), mientras que la defensa no enzimática la componen fundamentalmente glutatión, bilirrubina, ubiquinona, ácido úrico y vitaminas A, C y E, además de los antioxidantes que provienen de la alimentación (curcumina, resveratrol y quercetina, entre muchos otros). En términos generales, los antioxidantes enzimáticos metabolizan las ROS, mientras que los antioxidantes no enzimáticos previenen o atenúan el daño oxidativo mediante la neutralización de las ROS. En el hígado, la defensa antioxidante se basa en dos mecanismos clave: la inhibición de la actividad/expresión de enzimas involucradas en la producción de ROS y el aumento de la actividad o expresión de enzimas antioxidantes, que actúan conjuntamente para mantener el equilibrio redox celular y prevenir el daño hepático (79,80).

En el contexto de la defensa antioxidante hepática, la vía de señalización Nrf2 es reconocida como el mecanismo más importante para la protección celular y la regulación del equilibrio redox (79). En condiciones fisiológicas, Nrf2 se encuentra secuestrado en el citoplasma por su proteína inhibidora Keap1 (la proteína 1 asociada a ECH con dominio tipo Kelch). Keap1 se une a un complejo de ubiquitina ligasa E3 (Rbx11) a través de la proteína adaptadora Cullin-3 (Cul3), generando un complejo que actúa como sensor de estrés oxidativo y promueve la ubiquitinación y posterior degradación de Nrf2 en el proteasoma 26S (81). Sin embargo, bajo estrés celular (como la exposición a ROS u otras moléculas electrofílicas), se produce la modificación de residuos específicos de cisteína en Keap1, lo que induce cambios conformacionales en el complejo Keap1-Nrf2 y provoca la liberación de Nrf2 (Figura 1.7). Como resultado, se bloquea la poliubiquitinación de Nrf2 dependiente de Cul3/Rbx1 asistida por Keap1, lo que permite la traslocación de Nrf2 al núcleo, donde forma heterodímeros con los factores de transcripción MAF o Jun. Este complejo se une a un elemento cis presente en el promotor de genes diana, conocido como

elementos de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés). Entre los genes diana se encuentran enzimas antioxidantes directas, como HO-1; enzimas relacionadas con la homeostasis del glutatión como glutamato-cisteína ligasa (GCL, por sus siglas en inglés) y enzimas involucradas en la detoxificación celular (GST, NQO1) (79,82).

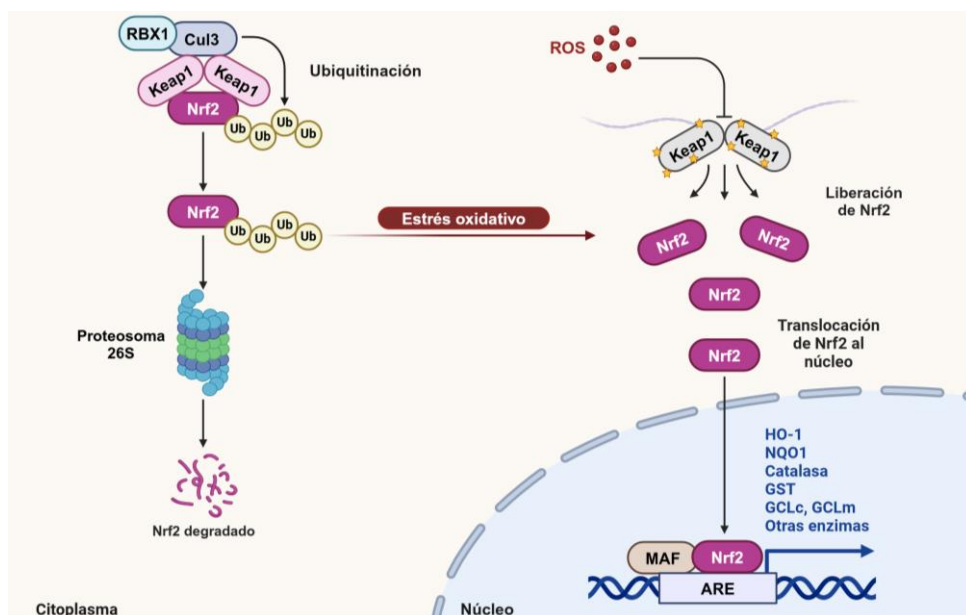


Figura I.7. Vía de señalización de Nrf2: principales componentes y genes diana. Cul3, cullin 3; GCLc, subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa; GCLm, subunidad modificadora de la glutamato cisteína ligasa; GST, glutatión S-transferasa; HO-1, hemoxygenasa-1; Keap1, proteína 1 asociada a ECH con dominio tipo Kelch; NQO1, NADPH: quinona oxidoreductasa 1; Nrf2, factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor de transcripción 2; RBX, *RING-box protein*; ROS, especies reactivas de oxígeno; Ub, ubiquitina.

I.2.5.2. AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso intracelular fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular, permitiendo la degradación y el reciclaje de componentes celulares disfuncionales, proteínas mal plegadas y orgánulos dañados. Si bien se han descrito tres vías autofágicas principales (la autofagia mediada por chaperonas, la microautofagia y la macroautofagia), este trabajo

se centrará en la macroautofagia (autofagia en adelante), por ser la vía más estudiada y relevante en el contexto de esta investigación (83). La autofagia se desarrolla a través de una serie de etapas estrictamente reguladas donde participan un conjunto de genes relacionados con este proceso (*ATG*). Estas etapas incluyen la iniciación, la nucleación del autofagosoma, la elongación y maduración de la membrana del autofagosoma y la fusión con el lisosoma para la degradación de los componentes y reciclaje (Figura I.8) (84,85).

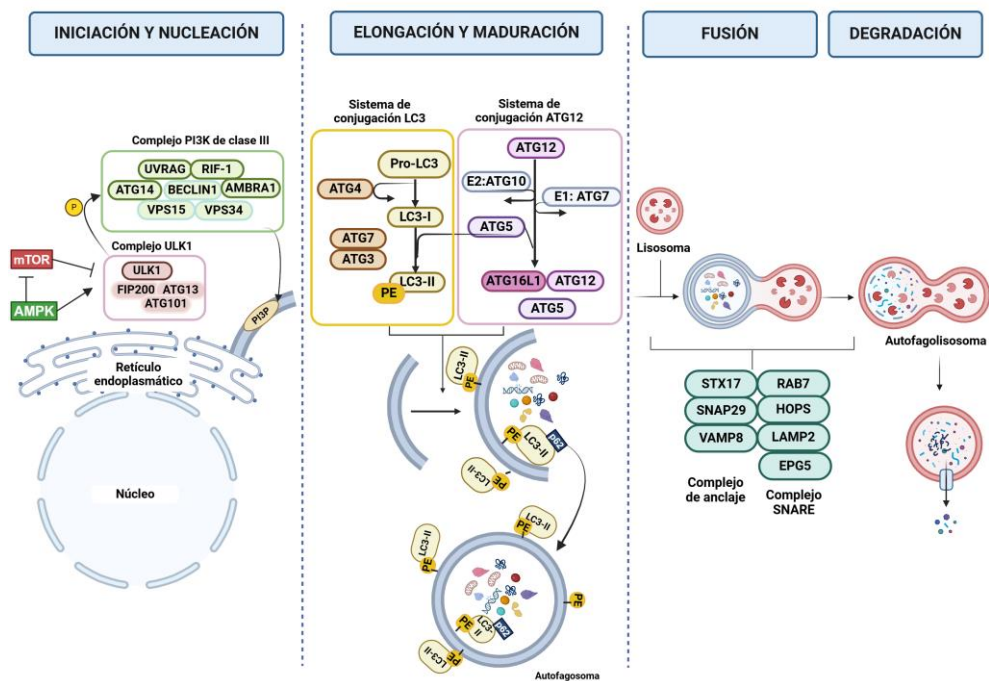


Figura I.8. Fases de la autofagia y principales mediadores implicados. Abreviaturas destacadas: AMPK, proteína quinasa activada por AMP; mTOR, diana de rapamicina en mamíferos; PE, fosfatidiletanolamina; PI3P, fosfatidilinositol 3-fosfato; ULK1, quinasa activadora de la autofagia tipo Unc-51.

La autofagia se activa en respuesta a diversas señales de estrés celular, como la privación de nutrientes, el estrés oxidativo, la acumulación de proteínas mal plegadas o la hipoxia. La proteína quinasa mTOR (diana de la rapamicina en

mamíferos) juega un papel crucial en la regulación de la autofagia, actuando como un sensor de la disponibilidad de nutrientes. En condiciones de abundancia de nutrientes, mTOR se activa y suprime la autofagia mediante la fosforilación y consecuente inactivación del complejo ULK1 (quinasa activadora de la autofagia tipo Unc-51), esencial en la fase de iniciación de este proceso. Por el contrario, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, por sus siglas en inglés) se activa en condiciones de estrés energético y promueve la autofagia. La activación de AMPK puede inducir la autofagia de forma directa mediante la fosforilación y activación del complejo ULK1, o de forma indirecta, mediante la inhibición de mTORC1 (complejo 1 de mTOR), liberando así la inhibición ejercida por mTOR sobre ULK1 (86–88). Una vez activado, ULK1 forma un complejo de preiniciación con ATG13, ATG101 y FIP200, que se dirige a las regiones del ER marcadas por ATG9. Este complejo, a su vez, recluta y activa el complejo de nucleación de la fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III (PI3KC3, por sus siglas en inglés), compuesto por Beclin1, ATG14L, VPS34, VPS15 y AMBRA1. La acción conjunta de estos complejos promueve la nucleación de autofagosomas nacientes o fagóforos que emergen del ER (83,89).

La elongación y maduración del autofagosoma comienza con el aumento en la producción local de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P, por sus siglas en inglés) en los sitios de formación del fagóforo, un proceso mediado por el complejo PI3KC3. Este evento desencadena la acción de dos sistemas de conjugación similares a la ubiquitina, esenciales para la elongación de la membrana del fagóforo y la formación del autofagosoma maduro. El primer sistema involucra a la proteína LC3. Inicialmente, la proteasa ATG4 procesa LC3 naciente a su forma LC3-I, que posteriormente es convertida a la forma conjugada con lípidos LC3-II mediante la acción secuencial de ATG7 (similar a E1) y ATG3 (similar a E2). Paralelamente, el segundo sistema de conjugación, también mediado por ATG7 y ATG10 (E2), facilita la unión de ATG12 a ATG5. Este complejo se asocia entonces con ATG16L1, formando el complejo ATG12-ATG5-ATG16L que

actúa como una ligasa E3, crucial para la conjugación de LC3-II con fosfatidiletanolamina (PE) en la membrana del fagóforo (85,90). Una vez anclado a la membrana, LC3-II impulsa la elongación y el cierre del autofagosoma, encapsulando los componentes citoplasmáticos destinados a la degradación (85). En esta etapa desempeñan un papel crucial las proteínas adaptadoras, como p62 (o sequestosoma 1, SQSTM1) y BRCA1, ya que se encargan de la selección y entrega de componentes específicos al autofagosoma para su degradación. Estas proteínas actúan como puentes moleculares, uniéndose tanto a los componentes destinados a la degradación, como a LC3-II (85). Finalmente, el autofagosoma maduro se fusiona con el lisosoma gracias al complejo SNARE (STX17, SNAP29, VAMP8) y el complejo de anclaje (complejo HOPS, RAB7, EPG5 y LAMP2) para formar el autolisosoma. La membrana interna del autofagosoma y su contenido se degradan por la acción de las hidrolasas y lipasas ácidas lisosomales, liberando macromoléculas que son recicladas para mantener la homeostasis celular (91). Con el objetivo de evaluar la autofagia, se han descrito varios marcadores moleculares. Uno de los principales es la proteína LC3-II, ya que, debido a su abundancia en las membranas autofagosómicas, se correlaciona directamente con la formación de estos orgánulos. Otro marcador clásico es la proteína adaptadora p62/SQSTM1, que se une directamente a LC3-II y se degrada eficientemente durante la autofagia, por lo que sus niveles totales se correlacionan inversamente con la actividad autofágica (84).

La autofagia está implicada en la patogénesis de diversas enfermedades, incluyendo las EHC. Si bien se ha demostrado el papel beneficioso de la autofagia en diversos tipos celulares hepáticos, como los hepatocitos y las células de Kupffer, su influencia en la fibrosis hepática, particularmente en las HSC, presenta una mayor complejidad, manifestándose como un proceso dual con efectos tanto promotores como inhibidores de la fibrogénesis (83). Por un lado, la autofagia degrada las gotas lipídicas liberadas durante la activación de

las HSC, generando ácidos grasos que, tras su oxidación, producen ATP y proporcionan la energía necesaria para su activación y actividad profibrogénica. Contrariamente, la autofagia excesiva puede inducir senescencia celular y apoptosis en las HSC, lo que conlleva a una disminución de la actividad fibrogénica y a la reducción de la secreción de ECM. Este efecto antifibrogénico se ha asociado a la degradación de factores profibróticos, como el colágeno tipo I y MMP, así como a la reducción de la secreción de exosomas profibróticos (92,93).

La ambigüedad del rol de la autofagia en la activación de las HSC podría atribuirse a la heterogeneidad de los modelos experimentales empleados, particularmente en lo que respecta al estado de activación. Es posible que la autofagia actúe como un promotor de la fibrosis hepática durante las etapas tempranas de la activación de las HSC quiescentes tras un daño hepático. Al contrario, la inducción de la autofagia en HSC ya activadas podría inhibir la fibrosis mediante la degradación de mediadores profibróticos. Asimismo, la interacción dinámica entre las HSC y otras células del microambiente hepático podría modular la función de la autofagia en la fibrosis. En este contexto, la autofagia estaría implicada en la regulación de las vías de señalización paracrina/autocrina que median la comunicación intercelular entre las HSC y otros tipos celulares (83,93).

1.2.5.3. MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos que desempeñan un papel fundamental en una amplia gama de procesos celulares esenciales en la mayoría de las células eucariotas. Si bien son ampliamente reconocidas por su papel en la producción de ATP, otras funciones incluyen la biosíntesis de grupos Fe-S, la homeostasis del calcio, la apoptosis, la señalización celular y la generación de ROS (94).

Su morfología se describe con frecuencia como ovalada, con un diámetro de 0,5 a 1 μm ; sin embargo, la naturaleza dinámica de estos orgánulos da lugar a una variedad de formas, desde extensas redes reticulares hasta las estructuras

alargadas más comúnmente representadas (95). La estructura de la mitocondria está estrechamente relacionada con su función, y cada aspecto de su forma contribuye a su alto grado de especialización (96). Estos orgánulos se encuentran delimitados por un sistema de doble membrana compuesto por una membrana externa (OMM, por sus siglas en inglés) y una membrana interna (IMM, por sus siglas en inglés), que establece dos compartimentos distintos: el espacio intermembrana, ubicado entre ambas membranas, y la matriz, un espacio interno delimitado por la IMM (Figura I.9). La OMM, delimitando el orgánulo del citosol circundante, presenta una composición similar a la de la membrana plasmática, facilitando la difusión de moléculas liposolubles hacia el espacio intermembrana. Asimismo, la presencia del canal iónico dependiente de voltaje (VDAC, por sus siglas en inglés) o porina, permite el transporte de proteínas pequeñas y proteínas hidrófilas (95).

Las mitocondrias presentan una característica singular en cuanto a su biogénesis: únicamente 13 polipéptidos son codificados por el ADN mitocondrial (ADNmt) en humanos mientras que la gran mayoría de sus proteínas están codificadas en el ADN nuclear, lo que implica un complejo proceso de importación para las proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol. Para llevar a cabo este transporte, se requiere la participación de chaperonas citosólicas, como las proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp90, que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis proteica al prevenir la agregación de las proteínas precursoras mediante la protección de sus dominios hidrofóbicos. Además, estas chaperonas dirigen las proteínas hacia los receptores del complejo translocasa de la OMM, principalmente Tom70 y Tom20, que permiten la translocación de las proteínas a través de esta membrana (97).

La IMM, a diferencia de la OMM, se caracteriza por su alta selectividad, regulando de manera estricta el flujo de moléculas hacia la matriz mitocondrial. Esta función de control es esencial para mantener un microambiente óptimo

para las actividades metabólicas que se llevan a cabo en la matriz mitocondrial. Entre estas actividades se encuentran la metabolización del piruvato y los ácidos grasos (para producir acetil-CoA) y la oxidación del acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico (ciclo de TCA, por sus siglas en inglés), generando CO₂ y NADH. En las invaginaciones de la IMM (crestas mitocondriales) se localizan los complejos de la ETC y el complejo V (ATP sintasa), que forman parte del proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS) (95,96,98).

A. OXPHOS

La OXPHOS es un proceso bioquímico fundamental que permite a las células aprovechar la energía liberada durante la reducción del oxígeno para generar ATP. Se basa en una serie de reacciones de óxido-reducción que implican la transferencia de electrones de NADH y FADH al oxígeno en la ETC (99). La ETC está compuesta por cuatro complejos proteicos (I, II, III y IV) que catalizan las reacciones redox secuenciales, permitiendo el flujo direccional de los electrones a través de la cadena (Figura I.9). El complejo V, aunque es fundamental para la OXPHOS, no participa directamente en el transporte de electrones, sino que emplea el gradiente electroquímico generado por la ETC para impulsar la síntesis de ATP. Los complejos I, III y IV, además de su papel en el transporte de electrones, actúan como bombas de protones translocando 4 protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana por cada par de electrones transferidos. La transferencia de electrones de un complejo al siguiente se lleva a cabo utilizando dos tipos de transportadores de electrones; los hidrofílicos como el citocromo c, que se desplaza libremente por el espacio intermembrana, e hidrofóbicos, como la coenzima Q10 (ubiquinona), que difunde a través de la bicapa lipídica de la IMM (99,100).

El complejo I (NADH deshidrogenasa), el primero y más grande de la ETC, está compuesto por 45 subunidades, de las cuales 7 están codificadas por el genoma mitocondrial (MT-ND1-6 y MT-ND4L) (100). Este complejo cataliza la oxidación del NADH (producto del ciclo de TCA), generando dos electrones que se

transfieren a un mononucleótido de flavina y, a través de una serie de grupos Fe-S, reducen la ubiquinona a ubiquinol. El paso de electrones de NADH a ubiquinona libera energía que es utilizada por el complejo para la translocación de cuatro protones al espacio intermembrana (99,101).

Por otro lado, el complejo II (succinato deshidrogenasa) oxida el succinato a fumarato en el ciclo de TCA, transfiriendo los electrones liberados a la ubiquinona (coenzima Q), que es reducida a ubiquinol. La reoxidación del ubiquinol, previamente reducido por los complejos I y II, es catalizada por el complejo III (ubiquinol/citocromo c oxidorreductasa). En este paso, se oxidan dos moléculas de ubiquinol, se transfieren electrones al citocromo c y se reduce una ubiquinona. Además, por cada par de electrones transferidos a través del complejo III se bombean cuatro protones al espacio intermembrana a través de la IMM (94,99). Por último, los electrones son transferidos al complejo IV (citocromo c oxidasa) mediante el citocromo c, que transporta los electrones uno a uno desde el complejo III al complejo IV. En este último, los electrones son transferidos al oxígeno molecular, permitiendo la reducción de esta molécula a H₂O mediante la adición de dos protones provenientes de la matriz mitocondrial. Durante este proceso se bombean cuatro protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, contribuyendo al gradiente electroquímico de protones que impulsa la síntesis de ATP por parte del complejo final (complejo V o ATP sintasa) de la maquinaria de OXPHOS (99,100).

El último complejo de la ETC está formado por dos fracciones: la F₀, situada en la matriz mitocondrial y la F₁, localizada en la IMM (94,102). La fracción F₀ se caracteriza por presentar un canal que permite el paso de los iones H⁺ hacia la porción F₁, que es de carácter hidrofílico y constituye el sitio catalítico principal de la enzima. El flujo de iones H⁺ desde la porción F₀ hacia la F₁ impulsa la rotación del anillo de subunidades α y β , que, a su vez, induce cambios conformacionales en las subunidades catalíticas, favoreciendo la unión de ADP y fosfato inorgánico para producir ATP (103).

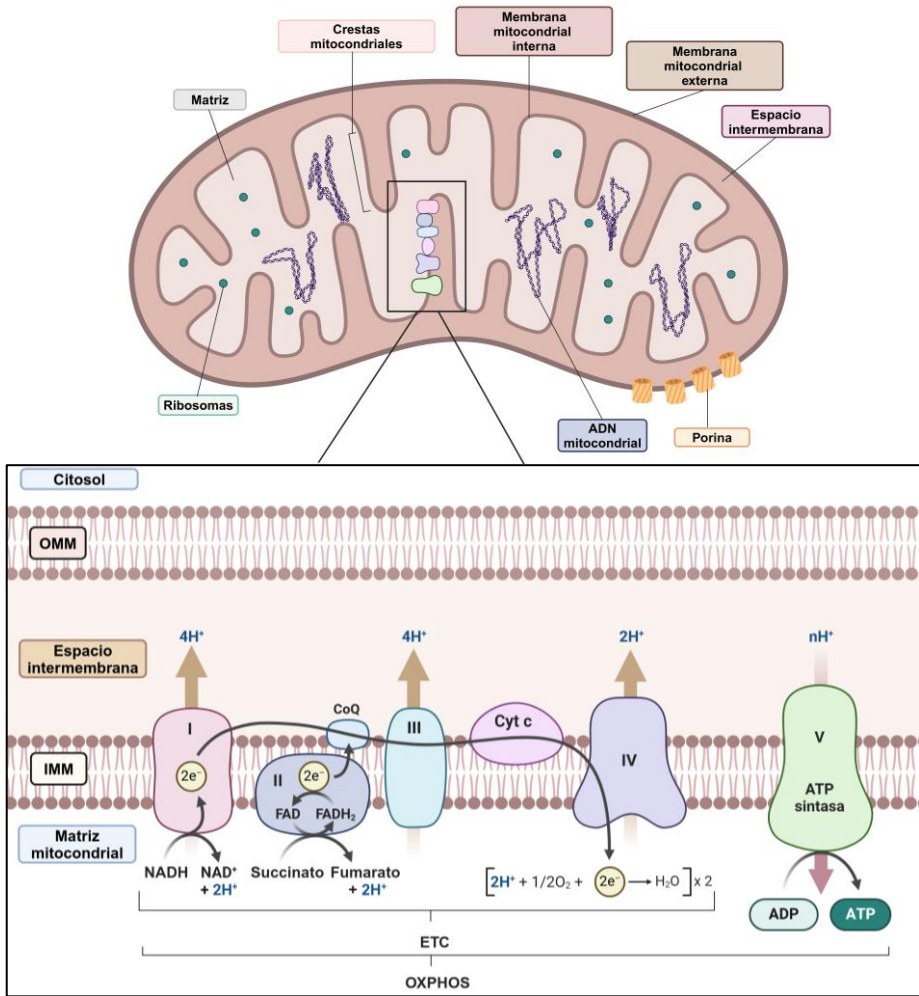


Figura I.9. Estructura de la mitocondria, componentes de la ETC mitocondrial y la OXPHOS. ADP, adenosin difosfato; ATP, adenosin trifosfato; ATP sintasa, complejo V; Cyt c, citocromo c; e⁻, electrones; ETC, cadena de transporte de electrones; FAD, flavin adenin dinucleótido; H⁺, protones; I, complejo I; II, complejo II; III, complejo III; IMM, membrana mitocondrial interna; IV, complejo IV; OMM, membrana mitocondrial externa; OXPHOS, fosforilación oxidativa.

B. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

El $\Delta\Psi_m$ se define como la diferencia de voltaje a través de la IMM, generada por la translocación de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana durante la ETC. Este proceso genera un gradiente electroquímico de protones que constituye la fuerza impulsora para la síntesis de ATP. En condiciones fisiológicas normales, los niveles de $\Delta\Psi_m$ y ATP se mantienen dentro de un rango relativamente estable, aunque pueden presentar fluctuaciones que reflejan las variaciones en las demandas energéticas celulares. Sin embargo, cuando se producen alteraciones significativas y sostenidas en el $\Delta\Psi_m$, ya sea despolarización o hiperpolarización, se pueden desencadenar consecuencias perjudiciales para la homeostasis celular, comprometiendo la viabilidad y función celular (104). El $\Delta\Psi_m$ no solo es crucial para la producción de ATP, sino que también desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la salud y funcionalidad de las propias mitocondrias. Un potencial adecuado es necesario tanto para la importación eficiente de proteínas a la mitocondria, como para la regulación del ciclo celular y eliminación selectiva de mitocondrias disfuncionales a través de la mitofagia (proceso mediante el cual las mitocondrias son degradadas y recicladas por el sistema autofágico). Además, el gradiente electroquímico impulsa el transporte de otros iones y metabolitos a través de la IMM, garantizando el suministro de moléculas vitales para las diversas funciones que se llevan a cabo en la mitocondria (104,105).

C. Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que pueden modular su tamaño, distribución, conectividad y morfología mediante el equilibrio de dos procesos: fusión y fisión mitocondrial (106), lo que permite una adaptación constante a las demandas metabólicas celulares. Ambos procesos de la dinámica mitocondrial (fusión y fisión) están regulados por la acción conjunta de GTPasas (guanosina trifosfatasa) altamente conservadas y sus proteínas reguladoras (107).

La fisión mitocondrial genera orgánulos individuales más pequeños (o una red mitocondrial más fragmentada) fruto de la división de una mitocondria, lo que resulta esencial para la biogénesis de nuevos orgánulos, su transporte, redistribución y segregación de unidades dañadas o disfuncionales que serán eliminadas mediante la mitofagia. Este proceso implica la constricción y escisión de la OMM y la IMM, y está mediado principalmente por la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp1, por sus siglas en inglés), una GTPasa citosólica. Esta proteína, al igual que otros miembros de esta familia, participa en el remodelado de membranas mediante ciclos de oligomerización y cambios conformacionales acoplados a la hidrólisis de GTP (107,108). Estructuralmente, Drp1 presenta cuatro regiones conservadas: el dominio GTPasa en el extremo N-terminal, el dominio central, el dominio variable y el dominio efector de la GTPasa en el extremo C-terminal. En condiciones basales, Drp1 se encuentra mayoritariamente en el citosol como una mezcla de dímeros y tetrámeros, mientras que, en respuesta a señales celulares específicas, es reclutada a la OMM a través de ciertos receptores, donde se ancla por medio de su dominio central. Una vez allí, Drp1 se oligomeriza formando estructuras helicoidales que rodean y estrechan la membrana mitocondrial. La hidrólisis de GTP induce cambios conformacionales en los oligómeros de Drp1, generando la fuerza mecánica necesaria para la escisión de la membrana mitocondrial (107,109). A diferencia de otras dinaminas, Drp1 presenta una baja afinidad por los fosfolípidos de membrana, por lo que su reclutamiento a la superficie mitocondrial requiere de proteínas adaptadoras, como Fis1, el factor de fisión mitocondrial (Mff, por sus siglas en inglés) y las proteínas de división mitocondrial (MiD, por sus siglas en inglés) (110). Si bien Drp1 y sus receptores/adaptadores constituyen el núcleo del aparato de fisión, tanto las etapas iniciales como finales de este proceso dependen de la acción de otros actores celulares, como el ER, el citoesqueleto de actina y la dinamina-2, otra GTPasa (107). Se ha observado que la fisión mitocondrial ocurre

predominantemente en las zonas de contacto entre el ER, las mitocondrias y el citoesqueleto. En estas regiones, los túbulos de la membrana del ER envuelven las mitocondrias señalando los sitios donde se llevará a cabo la división mitocondrial. Debido a que el diámetro del túbulo mitocondrial es aproximadamente cinco veces mayor que el de las hélices de Drp1, es necesaria la cooperación entre la maquinaria del ER y el citoesqueleto para estrechar las mitocondrias a un diámetro adecuado que permita el ensamblaje de oligómeros de Drp1 (110). Asimismo, la cardiolipina desempeña un papel crucial en el proceso de fisión mitocondrial, ya que interactúa con Drp1, estimulando su oligomerización y su actividad GTPasa (106).

La fusión mitocondrial es un proceso mediante el cual dos o más mitocondrias adyacentes se fusionan para formar una mitocondria más alargada o una red mitocondrial interconectada (110). Las redes mitocondriales promueven la eficiencia de la OXPHOS, ya que permiten una mejor distribución de la ETC y una mayor capacidad para disipar el gradiente electroquímico a través de la IMM, optimizando la producción de ATP (111). Además, dado que la fusión mitocondrial implica la unión y fusión coordinada de la IMM y OMM, facilita el intercambio de componentes esenciales entre las mitocondrias, incluyendo ADNmt, proteínas, lípidos y metabolitos (109). La maquinaria de fusión está compuesta principalmente por tres GTPasas relacionadas con la dinamina: mitofusinas 1 y 2 (MFN 1 y 2), presentes en la OMM, y la proteína 1 de atrofia óptica (OPA1, por sus siglas en inglés), presente en la IMM (111). Las MFN, responsables del acoplamiento y fusión de la OMM, poseen una estructura que facilita su función: un dominio catalítico de unión a GTP en el extremo N-terminal, y dos dominios de hélice enrollada en el extremo C-terminal, conocidos como dominios de repetición heptada (HR1 y HR2, por sus siglas en inglés), que median la interacción entre MFN de mitocondrias opuestas. Además, posee dos dominios transmembrana que anclan las MFN a la OMM, mientras que un bucle corto entre estos dominios expone los extremos N-terminal y C-terminal

al citosol, permitiendo la interacción con otras proteínas y la formación de oligómeros. Esta capacidad de autoensamblaje en oligómeros, tanto dentro de la misma membrana como a través de membranas opuestas, es crucial para la actividad de acoplamiento de las MFN y la posterior fusión de las membranas mitocondriales (107,112). Se ha propuesto que las MFN median la fusión de las OMM a través de la interacción de sus dominios HR2, que forman dímeros antiparalelos entre mitocondrias adyacentes. Durante este proceso, la unión e hidrólisis del GTP induce cambios conformacionales en las MFN que promueven el acercamiento y, por tanto, la fusión de la OMM (107,113).

La fusión mitocondrial, al igual que la fisión, ocurre en los sitios de contacto entre el ER y las mitocondrias, donde MFN2 media su interacción (114). Al mismo tiempo, OPA1 facilita la fusión de la IMM, así como la remodelación e integridad de las crestas mitocondriales. Esta proteína se encuentra presente en ocho isoformas en humanos y contiene tres regiones altamente expuestas al espacio intermembrana: el dominio de unión a GTP, el dominio medio y el dominio efector de GTP. Además, contiene la región del extremo N-terminal, que incluye una secuencia encargada de dirigir OPA1 hacia la IMM, seguida de una hélice transmembrana, que se encarga de anclarla en la membrana (115). Esta proteína vincula directamente la estructura mitocondrial con la función bioenergética, de manera que cuando el $\Delta\Psi_m$ está intacto, las isoformas largas de OPA1 (L-OPA1, por sus siglas en inglés), que se encuentran ancladas a la IMM, llevan a cabo la fusión de la IMM, mientras que cuando la membrana se despolariza, L-OPA1 es escindido a isoformas cortas solubles (S-OPA1, por sus siglas en inglés) por la metaloendopeptidasa sensible al estrés del espacio intermembrana (OMA1, por sus siglas en inglés), inhibiendo el proceso de fusión y promoviendo la fragmentación mitocondrial. Tanto las isoformas largas como cortas de OPA1 presentan la capacidad de unirse a la cardiolipina, lo que promueve la activación de la actividad GTPasa intrínseca de esta proteína (116).

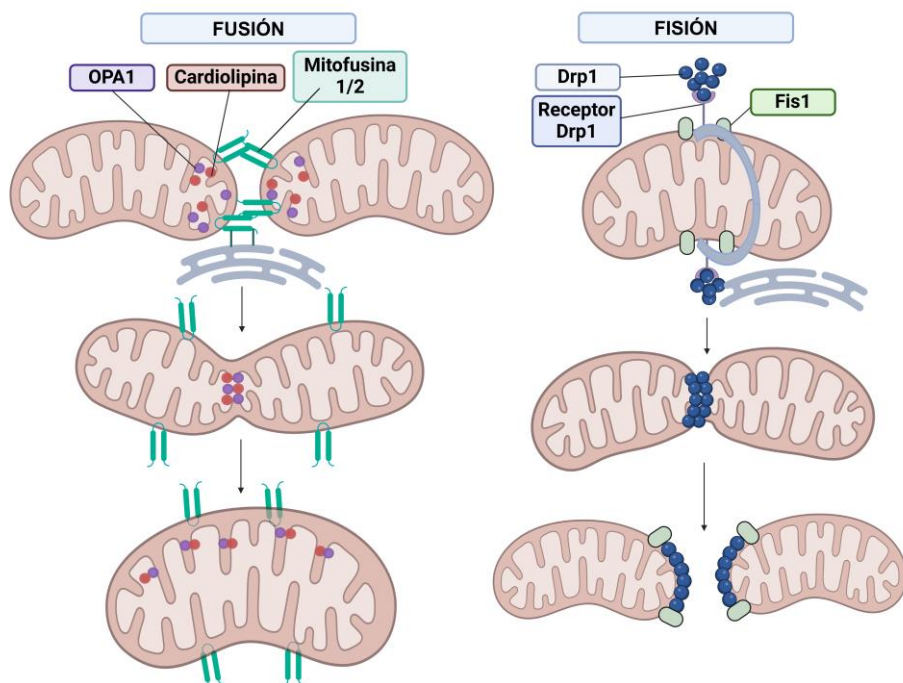


Figura I.10. Dinámica mitocondrial: fusión/fisión mitocondrial y principales proteínas involucradas. Drp1, proteína 1 relacionada con la dinamina; Fis1, proteína de fisión mitocondrial 1; OPA1, proteína 1 de atrofia óptica.

I.3. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

A pesar de la alta prevalencia de las EHC y los esfuerzos realizados para combatirlas, el desarrollo de terapias farmacológicas específicas, especialmente para la fibrosis hepática, continúa siendo un desafío. En la actualidad, el enfoque terapéutico se centra principalmente en las etiologías subyacentes. Por ejemplo, en casos de MASLD se ha demostrado que la implementación de modificaciones en el estilo de vida y la cirugía bariátrica tienen efectos beneficiosos. Asimismo, los fármacos antivirales han mostrado evidencia clínica en la resolución de la fibrosis hepática asociada a la infección por VHB o VHC (116–119).

Si bien aún no se dispone de un tratamiento específico para la fibrosis hepática, se han logrado avances significativos en la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a su desarrollo, lo que ha permitido identificar diversas dianas terapéuticas potenciales para detener o incluso revertir la progresión de esta enfermedad. Una de las estrategias terapéuticas más prometedoras para combatir la fibrosis hepática se centra en la modulación de la actividad de las HSC, fundamentalmente mediante dos enfoques: la inhibición de las señales y procesos intracelulares que culminan en la activación de estas células o en la reversión de las HSC activadas hacia un fenotipo quiescente (116,120).

I.3.1. ENSAYOS PRECLÍNICOS DE FÁRMACOS DIRIGIDOS A LAS VÍAS MOLECULARES IMPLICADAS EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

La investigación preclínica en fibrosis hepática se orienta hacia la modulación de diversas rutas y procesos celulares. Entre las estrategias más prometedoras se encuentra el bloqueo de la citoquina profibrogénica TGF- β , la supresión de la inflamación mediante la inhibición de citoquinas clave, la atenuación del estrés oxidativo, la remodelación de la ECM y la prevención de la transición epitelio-mesenquimal (ETM, por sus siglas en inglés) (117).

El TGF- β , como se comentó anteriormente, es un mediador crucial en la patogénesis de la fibrosis hepática, por lo que se ha convertido en un objetivo terapéutico de interés. Un enfoque prometedor radica en el uso de receptores solubles de TGF- β , que compiten con los receptores de membrana por la unión al TGF- β , evitando así la activación de las vías de señalización profibrogénicas. Estos receptores solubles, al carecer de dominios de señalización intracelular, actúan como secuestradores del TGF- β , impidiendo su interacción con los receptores de membrana y la consiguiente activación de las cascadas de señalización implicadas en la fibrogénesis (121). Estudios preclínicos han constatado la eficacia de esta estrategia; por ejemplo, la administración de formas truncadas del receptor TGF β RII mitiga significativamente la fibrosis

hepática en modelos experimentales (122). Por otro lado, se han desarrollado moléculas capaces de inhibir la actividad quinasa del receptor de TGF- β , bloqueando así sus efectos profibrogénicos. Entre ellos se encuentran galunisertib (LY21572999), que inhibe principalmente el receptor tipo I de TGF- β (TGF β RI), y LY2109761, que actúa como un inhibidor dual, afectando tanto al receptor tipo I como al tipo II (123). Estudios preclínicos han evidenciado resultados prometedores para ambos inhibidores, ya que se ha observado que la administración de estos compuestos interrumpe la señalización intracelular mediada por TGF- β , lo que a su vez conduce a una disminución en la activación de las HSC y en la deposición de ECM (124,125). Además de las estrategias dirigidas a bloquear directamente la actividad de TGF- β , se han explorado enfoques alternativos que buscan reducir la liberación de la forma activa de este factor de crecimiento a partir de su forma latente almacenada en la ECM. Dentro de este grupo, la inhibición de enzimas como la lisil oxidasa (LOXL, por sus siglas en inglés) y de ciertas integrinas ha señalado resultados prometedores. Las integrinas, en particular, desempeñan un papel fundamental en la activación del TGF- β latente almacenado en la ECM. Estas proteínas transmembrana median interacciones célula-ECM y pueden inducir un cambio conformacional en el complejo latente de TGF- β , liberando así la forma activa de esta citoquina (126,127). Debido a los resultados positivos observados en estudios preclínicos, se han desarrollado varios inhibidores de integrinas que actualmente se encuentran en evaluación clínica para el tratamiento de la fibrosis hepática. Un ejemplo notable es bexotegrast, un inhibidor dual de las integrinas $\alpha\beta6/\alpha\beta1$ que ha resultado eficaz en la reducción de la fibrosis en pacientes con colangitis esclerosante primaria en un ensayo clínico de fase II (128–130).

También se han explorado otras vías para interrumpir la señalización del TGF- β , como la interferencia con la translocación nuclear de los complejos Smad2/3/4. Se ha descrito que ciertos péptidos, como AIMP1, pueden bloquear la translocación de Smad3 al núcleo, impidiendo así sus efectos profibróticos

(131). De manera similar, compuestos como el magnolol interfieren con la interacción entre Smad3 y Smad4, atenuando la señalización del TGF- β y reduciendo la fibrosis hepática en modelos preclínicos (132). Por último, diversos compuestos naturales, como la genisteína (un isoflavonoide presente en la soja) y el praziquantel (un fármaco utilizado en el tratamiento de la esquistosomiasis), han mostrado efectos antifibróticos al aumentar la expresión de Smad7, un inhibidor endógeno de la señalización del TGF- β , lo que conlleva una reducción en la activación de las HSC y, por ende, en la progresión de la fibrosis (133,134).

Dado que la inflamación es uno de los factores más importantes que conducen a la fibrosis hepática, también se han explorado diversas estrategias terapéuticas dirigidas a modular la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, fármacos biológicos anti-TNF (como infliximab), que actúan suprimiendo la infiltración de células inflamatorias en el hígado y la subsiguiente activación de las HSC, han resultado eficaces en estudios preclínicos (135).

El estrés oxidativo, otro factor clave en la fibrogénesis, también ha sido objeto de investigación, y se han propuesto diversas vías para su reducción, incluyendo la inhibición de la producción de ROS y la activación de mecanismos antioxidantes. Como ejemplo, los activadores de la ruta Nrf2 (como TBE-31 y S21879) han evidenciado resultados prometedores en modelos preclínicos. En esta línea, la inhibición de la NOX con fármacos como setanaxib también han resultado eficaces en la reducción del estrés oxidativo y fibrosis en modelos preclínicos (136,137).

La activación de las HSC desencadena una reprogramación metabólica significativa para satisfacer las demandas energéticas del proceso fibrogénico. En particular, se ha observado un aumento en la lipogénesis *de novo*, la cual juega un papel crucial en la activación y supervivencia de las HSC. En este contexto, estudios preclínicos han observado que la inhibición farmacológica de enzimas clave en la lipogénesis *de novo* puede suprimir la fibrogénesis hepática.

Entre las dianas terapéuticas más prometedoras se encuentran los inhibidores de la acetil-coA carboxilasa (firsocostat, clesacostat), de la sintasa de ácidos grasos (denifanstat), o de la enzima lipogénica estearoil-coA desaturasa 1 (aramchol) (138–140).

Recientemente están surgiendo terapias basadas en nanopartículas, diseñadas para la entrega dirigida de siARN/miARN, permitiendo el silenciamiento específico de genes relacionados con el desarrollo de varias enfermedades. En el caso de la EHC, se han desarrollado siARN para varias moléculas claves en el desarrollo de la fibrosis. Por ejemplo, la administración de siARN específicos para el gen procolágeno α -1 reduce la deposición de colágeno (141) en ensayos preclínicos. Otras estrategias se fundamentan en la promoción de la autofagia de las HSC, como el inhibidor de proteasas carfilzomib, que redujo la fibrosis hepática al promover la apoptosis de HSC activadas (142). De cara al futuro, otras intervenciones en etapa preclínica muestran potencial para traducirse en terapias antifibróticas. Estas incluyen exosomas y compuestos dirigidos contra modificadores epigenéticos y la modulación del eje intestino-hígado. La integración de técnicas avanzadas como la nanotecnología, células madre pluripotentes inducidas y la edición genética podría permitir terapias celulares y génicas personalizadas (117,143,144).

I.3.2. ENSAYOS CLÍNICOS DE FÁRMACOS PARA LA PREVENCIÓN O EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS HEPÁTICA

Diversos fármacos con resultados prometedores en preclínica están en fase de investigación clínica, incluso con ensayos completados y datos de eficacia y seguridad. La pirfenidona, una molécula con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antifibróticas, ha logrado reducir de la fibrosis hepática en numerosos modelos experimentales. En esta línea, ensayos clínicos de fase II evidenciaron que este fármaco reducía significativamente la rigidez hepática en pacientes con hepatitis C crónica en comparación con placebo. De manera

similar, un ensayo clínico en pacientes con fibrosis hepática avanzada mostró resultados antifibróticos prometedores (117,145,146).

Por otro lado, la activación del receptor nuclear X de farnesoides (FXR, por sus siglas en inglés) suprime la fibrosis hepática a través de diversos mecanismos, incluyendo la inhibición de la activación de las HSC y la reducción de la producción de citoquinas proinflamatorias (147). En este sentido, el ácido obeticólico, un agonista sintético del FXR, ha sido aprobado para el tratamiento de la colangitis biliar primaria en pacientes adultos que no responden o no toleran el ácido ursodesoxicólico (148). En un ensayo clínico de fase II para MASH, el ácido obeticólico mejoró las características histológicas del hígado (incluyendo la fibrosis) en pacientes pre-cirróticos (149). Posteriormente, un ensayo de fase III confirmó la mejoría de la fibrosis en pacientes con MASH en estadio pre-cirrótico, respaldando el potencial del FXR como diana terapéutica para la fibrosis hepática (150). Recientemente, el inhibidor de la sintetasa de ácidos grasos denifanstat ha mejorado la fibrosis hepática en pacientes con MASH en un ensayo clínico en fase II, lo que sugiere que la inhibición de la síntesis *de novo* de ácidos grasos podría ser una estrategia antifibrótica viable (151). De manera similar, se ha reportado que la pentoxifilina, un inhibidor de TNF- α , presenta efectos antifibróticos prometedores, especialmente en pacientes con cirrosis descompensada (117,152).

Otro enfoque terapéutico novedoso se centra en la inhibición del receptor de ácido lisofosfatífico 1 (LPA1, por sus siglas en inglés), implicado en la activación y diferenciación de HSC a miofibroblastos. En este sentido, pegbelfermin, un análogo del FGF21 conjugado con polietilenglicol que bloquea la señalización de LPA1, mostró actividad antifibrótica en pacientes con MASH en un ensayo clínico de fase II (153). En relación con los fármacos dirigidos a la producción de ROS, setanaxib, un inhibidor dual de las NOX1 y NOX4, redujo la producción de ROS y mejoró la fibrosis hepática en pacientes con colangitis biliar primaria en un ensayo clínico de fase II (119,154).

Además de las dianas moleculares mencionadas previamente, los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR, por sus siglas en inglés) se han convertido en un foco de interés en la búsqueda de tratamientos para la fibrosis hepática. Estos receptores nucleares desempeñan un papel crucial en la regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos, la diferenciación de adipocitos y la respuesta inflamatoria. Entre los tres subtipos de PPAR (α , β/δ , γ), el PPAR γ genera un especial interés en el contexto de la enfermedad hepática debido a su capacidad para mejorar la esteatosis, reducir la inflamación y atenuar la fibrosis, tal y como se ha reportado en ensayos preclínicos (155,156). En la actualidad, se están llevando a cabo ensayos clínicos para evaluar la eficacia de agonistas de PPAR, como el lanifibranor, en pacientes con MASH (157).

Otros ensayos clínicos han incluido compuestos como emricasan, un inhibidor de la ASK1, inhibidores de galectinas (implicadas en la inflamación, respuesta inmune y fibrosis) e inhibidores de distintas citoquinas (158–160). Por último, las terapias celulares han surgido como un enfoque innovador para tratar la fibrosis hepática, buscando repoblar el hígado con células sanas o administrar factores antifibróticos directamente en el tejido dañado. Dentro de este enfoque, las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés), al administrarse por vía intravenosa, se dirigen a los tejidos dañados y ejercen funciones inmunomoduladoras, resolutivas de la inflamación y remodeladoras de la ECM. En preclínica, las MSC alivian la fibrosis hepática a través de efectos paracrinos sobre las HSC (161,162). Además, los ensayos clínicos en fases iniciales mostraron que las MSC eran seguras y mejoraban la función hepática en pacientes con cirrosis (117,163).

I.3.3. REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS

I.3.3.1. DEFINICIÓN Y CONCEPTO

El reposicionamiento de fármacos se define como la estrategia que busca utilizar un fármaco ya existente (o un candidato a fármaco) para el tratamiento de una condición médica diferente a aquella para la cual fue inicialmente desarrollado. Este enfoque aprovecha el conocimiento previo sobre la seguridad y eficacia del fármaco en humanos, lo que permite avanzar directamente a fases preclínicas y clínicas, evitando las etapas iniciales del desarrollo de fármacos y, por lo tanto, reduciendo costes y riesgos. Una de las principales ventajas del reposicionamiento de fármacos radica en su capacidad para identificar nuevos usos terapéuticos basados en la observación de beneficios, sin necesidad de definir completamente el mecanismo de acción subyacente. Esta característica permite avanzar rápidamente a la evaluación preclínica en modelos animales, obteniendo resultados con mayor relevancia para la investigación y las aplicaciones clínicas. De hecho, el reposicionamiento de fármacos puede incluso permitir el acceso directo a ensayos clínicos de fase II, minimizando el riesgo de fracaso inherente al desarrollo de nuevos fármacos (164,165). En este contexto, este trabajo se centra en dos fármacos que han mostrado efectos beneficiosos en la patología hepática: simvastatina (SV) y rilpivirina (RPV) (Figura I.11).

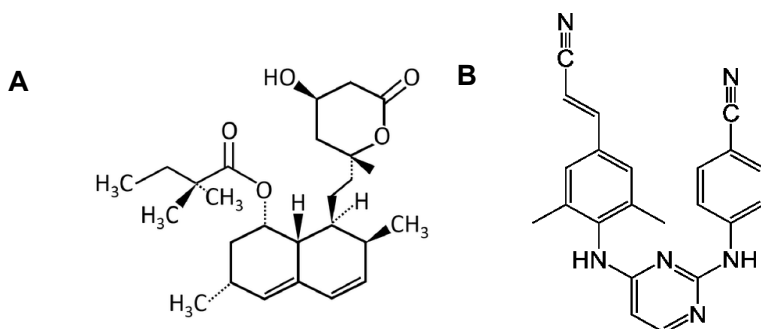


Figura I.11. Estructura química de simvastatina (A) y rilpivirina (B).

I.3.3.2. SIMVASTATINA (SV)

La SV es un fármaco perteneciente a la clase de las estatinas, ampliamente utilizado en la práctica clínica para el manejo de la dislipidemia y la prevención de eventos cardiovasculares. Su administración se indica en conjunto con la implementación de modificaciones en el estilo de vida y con otros tratamientos farmacológicos como parte de una estrategia terapéutica integral para reducir los niveles de lípidos y mejorar la salud cardiovascular (166). Las estatinas son fármacos hipolipemiantes que actúan mediante la inhibición competitiva de la enzima HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa), paso limitante en la síntesis de colesterol. Además de su acción hipolipemiente, las estatinas poseen propiedades pleiotrópicas, incluyendo la inhibición de la agregación plaquetaria, la modulación de la respuesta inflamatoria en la aterogénesis, la mejora de la función endotelial y efectos antiinflamatorios y antioxidantes (167,168).

La SV es un profármaco semisintético derivado de la lovastatina, la primera estatina aprobada por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU) (166). La administración oral de SV en su forma de lactona inactiva resulta en una rápida hidrólisis a su metabolito activo, alcanzando su concentración plasmática máxima (C_{max}) en aproximadamente 5 h. Presenta una vida media de eliminación de 4,4 h y su metabolismo ocurre principalmente en el hígado y el intestino, mediado por las enzimas del citocromo P450 (166,169). La eficacia de SV en la reducción del colesterol total y del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) se ha demostrado en diversos ensayos clínicos controlados, aleatorizados y metaanálisis, que han evidenciado una reducción significativa de la mortalidad y de eventos vasculares en pacientes con enfermedad vascular oclusiva. Las indicaciones aprobadas por la FDA para la SV incluyen hipercolesterolemia familiar (tanto en su forma homocigótica como heterocigótica), hipercolesterolemia no familiar heterocigótica, hipertrigliceridemia,

disbetalipoproteinemia y reducción del riesgo de eventos cardiovasculares adversos (pacientes con enfermedad cardiovascular aterosclerótica o con múltiples factores de riesgo cardiovascular). Además de las indicaciones aprobadas, SV se utiliza en la práctica clínica para indicaciones no aprobadas por la FDA, conocidas como *off-label*, que incluyen la profilaxis de episodios cardiovasculares adversos después de la hospitalización por síndrome coronario agudo, y la profilaxis de la fibrilación auricular en pacientes con enfermedad arterial coronaria estable (166).

Si bien la SV se utiliza como monoterapia, también se encuentra disponible en productos combinados para el tratamiento de la dislipidemia, como simvastatina/ezetimiba y simvastatina/niacina. El perfil de seguridad de la SV es generalmente favorable, y los efectos adversos más comunes incluyen cefalea, mialgia, dolor abdominal, gastritis, estreñimiento, infecciones respiratorias, elevación de las transaminasas hepáticas y alteración del control glucémico. En raras ocasiones, la SV puede ocasionar efectos adversos graves, como fibrilación auricular, hepatotoxicidad (hepatitis colestásica, elevación marcada de las transaminasas, ictericia e insuficiencia hepática) y miopatía. Otros efectos adversos graves, aunque poco frecuentes, incluyen la enfermedad pulmonar intersticial, diabetes mellitus, eritema multiforme, leucopenia, anemia hemolítica, trombocitopenia y síndrome de Stevens-Johnson (166,167,169).

A pesar de que inicialmente las estatinas fueron excluidas en el tratamiento de pacientes con cirrosis debido a su posible hepatotoxicidad, la evidencia actual disponible sugiere que el daño hepático es una complicación poco frecuente del uso de estos fármacos. Además, el tipo de daño hepático observado con las estatinas suele ser autolimitado y generalmente se resuelve a los 6 meses posteriores a la suspensión del fármaco (170). De hecho, múltiples investigaciones epidemiológicas realizadas en los últimos años han revelado que el tratamiento con estos fármacos tiene resultados prometedores en la prevención y retraso de la cirrosis. Varios mecanismos se han propuesto para

explicar estos efectos, incluyendo la reducción de la presión portal, la mejora de la disfunción endotelial y microvascular hepática, la disminución de la fibrosis y la atenuación de la sensibilidad al daño hepático mediado por endotoxinas. Estos efectos se han relacionado con la capacidad de las estatinas para reducir el estrés oxidativo, disminuyendo así la activación de células implicadas en el proceso inflamatorio. Además, se ha postulado que las estatinas podrían estar favoreciendo la síntesis de óxido nítrico, lo que resultaría en una mejora de la función endotelial y un aumento en el número de células progenitoras endoteliales (171,172). Específicamente, la SV ha sido propuesta como la estatina más efectiva en la protección del endotelio hepático en el contexto de la cirrosis debido a su capacidad para activar la vía de señalización KLF2 (*Krüpel-like factor 2*)-óxido nítrico. El factor de transcripción KLF2 es esencial para la homeostasis del endotelio hepático, y juega un papel crucial en la atenuación de la fibrosis (171–173). Aunque su expresión aumenta en etapas tempranas de la cirrosis como un mecanismo compensatorio para mejorar la disfunción vascular, la expresión endógena de KLF2 no es suficiente para contrarrestar el desarrollo de hipertensión portal y la progresión de la enfermedad (173). En este contexto, la administración de SV a las LSEC induce la expresión de KLF2, lo que confiere efectos protectores sobre la función vascular en el hígado cirrótico y, además, promueve la reversión de las HSC activadas a un estado quiescente, junto con una inhibición de la migración y proliferación de estas células. Este efecto está mediado, en parte, por la atenuación del estrés oxidativo intracelular a través de la activación de Nrf2, un factor de transcripción regulado por KLF2 (171,173). Por último, además de su efecto sobre la vía KLF2-Nrf2, las estatinas (incluida la SV) también participan en la inhibición de la vía de señalización RhoA/Rho-quinasa, un regulador clave de la contractilidad de las HSC, la resistencia vascular y la presión portal (171).

I.3.3.3. RILPIVIRINA (RPV)

La RPV es un fármaco antirretroviral de gran relevancia en el abordaje terapéutico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Es un derivado de la diarilpirimidina y pertenece a la segunda generación de inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (NNRTI, por sus siglas en inglés), que ejercen su acción mediante la unión no competitiva a la enzima, deteniendo el proceso de elongación del ADNc y, por tanto, la capacidad de replicación del VIH (174,175). Fue aprobado por la FDA y la EMA en 2011 y se comercializó bajo el nombre de Edurant® por Janssen-Cilag International NV (Beerse, Bélgica), en una formulación oral diaria única de 25 mg. Inicialmente se indicó para pacientes sin tratamiento antirretroviral previo con un número de copias de ARN viral/mL <100000 y un recuento de células CD4⁺ >200 células/mL. Sin embargo, en 2013 se amplió la indicación a pacientes con tratamiento antirretroviral previo que presentaran supresión virológica y ausencia de mutaciones en los NNRTI (176). Un aspecto crucial de la RPV reside en su potente actividad antiviral que se extiende incluso a cepas clínicas de VIH-1 resistentes a otros fármacos de la misma clase. Esta característica se atribuye a su flexibilidad conformacional interna y a la plasticidad de su interacción con el sitio de unión en la transcriptasa inversa (174).

En cuanto a su farmacocinética, RPV muestra una absorción rápida y una buena biodisponibilidad tras la administración por vía oral. Sin embargo, la solubilidad y la biodisponibilidad de RPV dependen de la presencia de un pH ácido en el tracto gastrointestinal por lo que debe evitarse la coadministración con inhibidores de la bomba de protones para evitar una disminución de su eficacia (177). Además, presenta una elevada unión a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina (mayor de 99,7 %) de forma dependiente de la concentración. Tras la administración oral, la C_{max} se alcanza en un plazo de 4-5 h, con una vida media de 34-55 h. Estudios farmacocinéticos mostraron una C_{max} de 134±72 ng/mL en pacientes que recibieron 25 mg/día de RPV por vía

oral, mientras que, en voluntarios que recibieron la formulación de acción prolongada (600 mg), la C_{max} fue de 120 ± 40 ng/mL en el día 29 y 132 ± 19 ng/mL en el día 57. Por último, la RPV se metaboliza fundamentalmente por el sistema enzimático del citocromo P450, por lo que la administración concomitante con fármacos que interactúan con esta enzima podría afectar su aclaramiento (178,179).

En cuanto a su perfil de seguridad, Edurant® se asocia principalmente a efectos adversos leves como episodios depresivos, cefalea, insomnio y erupción cutánea (180). A diferencia de otros fármacos del mismo grupo, RPV presenta un buen perfil de seguridad hepática, caracterizado por un bajo índice de elevaciones transitorias de las transaminasas séricas. Diversos estudios retrospectivos, incluyendo pacientes con VIH mono infectados y coinfectados con el VHC, evidencian una baja frecuencia de hepatotoxicidad asociada a la RPV, sin necesidad de suspender el tratamiento. Adicionalmente, la administración de RPV podría ejercer un efecto beneficioso sobre el perfil lipídico en pacientes con dislipemia, sin que su eficacia se vea comprometida en pacientes con cirrosis hepática por coinfección VHC/VIH (181).

Por último, además de su reconocida eficacia como inhibidor de la transcriptasa inversa en el tratamiento del VIH, RPV ha despertado gran interés por sus potenciales aplicaciones terapéuticas en otros campos. Recientemente, nuestro grupo demostró el efecto hepatoprotector de RPV en varios modelos murinos de daño hepático crónico, así como en ensayos *in vitro* y *ex vivo*, mostrando actividad antiinflamatoria, antifibrótica y antiesteatótica (182–185). Además, en un contexto clínico, se ha observado que el tratamiento con RPV en pacientes previamente curados de hepatitis C crónica resulta en una reducción significativa de la rigidez hepática (186). Del mismo modo, diversos estudios sugieren que este fármaco antirretroviral podría tener efectos beneficiosos en el campo de la oncología a través de la inducción de la muerte celular en modelos de cáncer de mama, páncreas y leucemia (177).

I.4. REGENERACIÓN HEPÁTICA (RH)

El hígado se distingue por ser el único órgano sólido capaz de activar mecanismos regenerativos que le permiten recuperar completamente su masa original a partir de tejido sano remanente. Este proceso, conocido como regeneración hepática (RH), se desencadena por diversos tipos de daño, ya sea físico (como una cirugía) o químico (como la exposición a toxinas) (187,188).

I.4.1. TIPOS DE RH

Se conocen dos tipos principales de RH determinados por el tipo de estímulos que la desencadenan y los mecanismos celulares que la sustentan: la RH típica y la RH dependiente de progenitoras. La RH típica se caracteriza por la hipertrofia e hiperplasia de los hepatocitos y las células epiteliales biliares preexistentes, activándose principalmente en hígados sanos que han sido sometidos a una resección parcial, donde la masa hepática remanente es suficiente para impulsar la proliferación de las células hepáticas existentes. Por otro lado, la RH dependiente de células progenitoras implica la activación y diferenciación de estas células residentes en el hígado y se activa principalmente en situaciones donde la capacidad proliferativa de los hepatocitos diferenciados se ve comprometida, como en el contexto de EHC o lesiones hepáticas agudas masivas (189,190).

I.4.2. MODELOS *IN VIVO* EMPLEADOS PARA EL ESTUDIO DE LA RH

A pesar de los avances significativos en la comprensión de la RH y la identificación de diversas vías de señalización implicadas en este proceso, aún persisten desafíos para alcanzar una comprensión completa de los mecanismos que facilitan la regeneración de un hígado dañado, particularmente en el contexto de una patología preexistente. En este sentido, los modelos experimentales de RH son herramientas fundamentales, no solo para profundizar en la patogénesis de las enfermedades hepáticas, sino también

para proporcionar una plataforma sólida para el desarrollo de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas (188).

Dado que la proliferación celular de los hepatocitos es un evento poco frecuente, los modelos *in vivo* que estudian la RH comienzan con la inducción de una lesión hepática para provocar la respuesta regenerativa. En general, se han adoptado dos estrategias para ello: la resección quirúrgica y la lesión por toxinas (191). Los modelos basados en la inducción del daño por toxinas presentan la ventaja de replicar la respuesta inflamatoria que acompaña a la RH y juega un papel crucial en el contexto del daño crónico asociado a las EHC. Dentro de estos modelos, destacan el modelo de CCl₄ (tetracloruro de carbono), D-Gal (D-galactosamina), APAP (paracetamol o acetaminofeno) y TAA (tioacetamida) (188,192). Adicionalmente, se han desarrollado modelos transgénicos, ofreciendo una alternativa atractiva por su simplicidad operativa y su capacidad para estudiar el papel de citoquinas y genes específicos en la RH (188).

La hepatectomía parcial (HPx) del 70 %, desarrollada por Higgins y Anderson (193) se ha consolidado como el modelo experimental más empleado en el estudio de la RH en estudios *in vivo*. Se caracteriza por la resección quirúrgica precisa del 70 % de la masa hepática funcional, lo que permite una estimulación controlada y reproducible del proceso regenerativo. A diferencia de la HPx 30 %, donde la RH se produce principalmente por hipertrofia celular, la HPx del 70 % induce una respuesta regenerativa mediada por la proliferación de los hepatocitos remanentes (188,194). La relevancia de este modelo radica en un conjunto de características que lo convierten en la herramienta de referencia para el estudio de la RH. En primer lugar, la estructura multilobular del hígado permite una resección precisa y delimitada sin necrosis tisular. Esta característica distintiva diferencia a la HPx de otros modelos que inducen daño hepático mediante agentes químicos o modelos farmacológicos, donde la respuesta inflamatoria y necrosis generada pueden enmascarar los mecanismos intrínsecos de la RH. En segundo lugar, la HPx desencadena una

respuesta regenerativa inmediata, sincronizada y sin las complicaciones inherentes a procesos inflamatorios, por lo que permite establecer un marco temporal de referencia preciso (tiempo 0, momento de realización de la cirugía). Además, la precisión del modelo se ve reforzada por la uniformidad hepática, lo que facilita la estandarización del procedimiento quirúrgico. Finalmente, esta técnica presenta una baja mortalidad perioperatoria (194,195).

La RH tras una HPx es un proceso complejo en el que diversas citoquinas y factores de crecimiento juegan un papel central (Figura I.12). Estas moléculas activan distintas vías de señalización convergen en factores de transcripción y mediadores intracelulares que coordinan la respuesta del hígado tras una resección hepática, promoviendo la regeneración y restauración funcional.

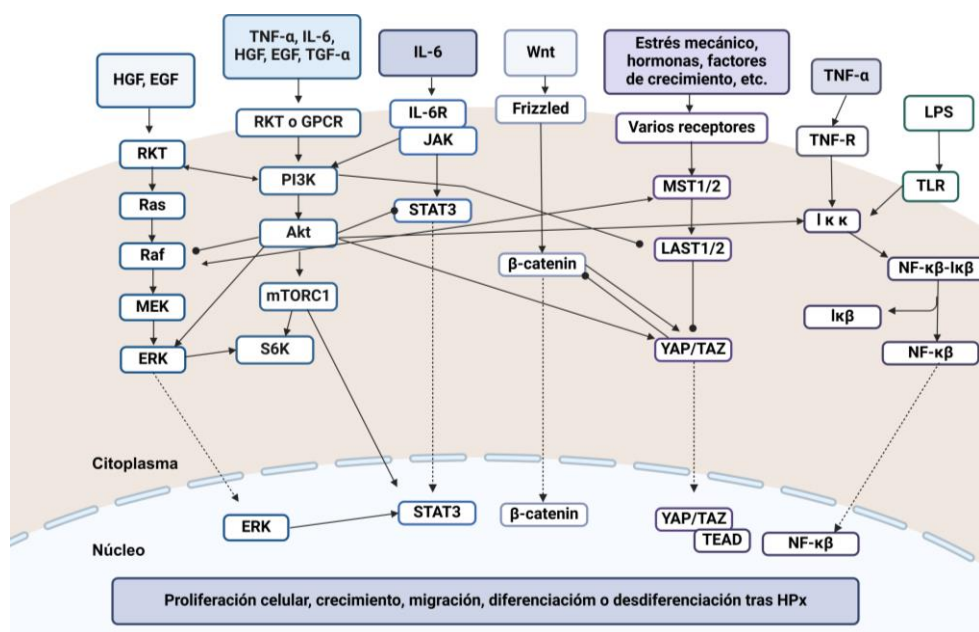


Figura I.12. Vías moleculares asociadas a la RH en el modelo de HPx. Abreviaturas destacadas: EGF, factor de crecimiento epidérmico; GPCR, receptor acoplado a proteína G; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; IFN, interferón; IL, interleuquina; LPS, lipopolisacárido; mTORC1, complejo 1 de la diana de rapamicina en mamíferos; RKT, receptor tirosina quinasa; TGF, factor de crecimiento transformante; TLR, receptor tipo Toll; TNF, factor de necrosis tumoral.

Las fases que componen el proceso de RH en el modelo de HPx son: iniciación, proliferación y terminación (Figura I.13) (196). La fase de iniciación comienza inmediatamente después de la HPx y se caracteriza por la rápida activación de una respuesta inflamatoria controlada y transitoria. Tras la resección del tejido hepático, se produce una activación de células no parenquimales (células de Kupffer, LSEC y HSC), que, en respuesta a la alteración de la homeostasis hepática, liberan una serie de factores de crecimiento y citoquinas que actúan como potentes mitógenos para los hepatocitos (como TNF- α y IL-6), preparando su entrada al ciclo celular (de fase G0 a fase G1) (197). A nivel molecular, estos mediadores ejercen sus efectos a través de la unión a sus respectivos receptores en la superficie de los hepatocitos, lo que desencadena cascadas de señalización intracelular que convergen en la activación de factores de transcripción como NF- κ B y STAT3, lo que regula finalmente la expresión de genes diana implicados en la proliferación (*c-Fos*, *c-Myc*, y *c-Jun*), supervivencia y respuesta al estrés, induciendo así la entrada de los hepatocitos en la fase de proliferación. Finalmente, en esta fase también participan otros factores, como HGF (promueve la síntesis de ADN y la mitosis de hepatocitos de manera paracrina), la ruta Notch y la ruta Wnt (197,198).

La fase de proliferación se caracteriza por una intensa actividad mitótica de los hepatocitos (197). Se lleva a cabo, fundamentalmente, por las ciclinas dependientes de quinasas (CDK, por sus siglas en inglés), que se activan al unirse a las ciclinas, como ciclina D1, ciclina E1, ciclina A y ciclina B (195). Esta etapa está mediada por una compleja red de vías de señalización intracelular y factores de crecimiento que juegan un papel esencial en la proliferación de los hepatocitos (Figura I.13). Entre ellos, se encuentra el HGF y el EGF. El HGF, producido principalmente por HSC y LSEC, se une a su receptor tirosina quinasa (*c-Met*) en la superficie de los hepatocitos, activando vías de señalización como MAPK/ERK y PI3K/Akt, que, a su vez, regulan la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular, la inhibición de la apoptosis y la promoción de

la supervivencia celular. El EGF, por su parte, se une a su receptor EGFR en los hepatocitos, activando vías de señalización similares a las del HGF. Además del HGF y el EGF, otros factores de crecimiento como el TNF- α , y otras rutas de señalización, como la ruta Hippo, también contribuyen a la proliferación de los hepatocitos durante la RH, lo que permite la restauración de la masa hepática tras la resección (197,198).

Por último, la fase de terminación se caracteriza por la transición gradual desde un estado de proliferación celular activa a un estado de quiescencia y homeostasis tisular, evitando la proliferación anormal de hepatocitos. Esta etapa comienza cuando se ha restaurado el 2,5 % del ratio peso del hígado/peso corporal, e implica una regulación a la baja de las vías de señalización implicadas en la proliferación, un aumento en la expresión de factores anti-proliferativos y la remodelación de la ECM para restaurar la arquitectura hepática normal (197,199). Entre los factores clave implicados en la fase de terminación se encuentran el TGF- β , activinas y las proteínas morfogénicas óseas (BMP, por sus siglas en inglés) (Figura I.13). El TGF- β ejerce un potente efecto inhibitorio sobre la proliferación de los hepatocitos, promoviendo al mismo tiempo la síntesis y deposición de proteínas de la ECM. Este proceso de remodelación de la ECM es esencial para la restauración de la arquitectura hepática y la formación de nuevos sinusoides. La activina, por su parte, contribuye a la terminación de la RH a través de la inhibición de la producción de HGF, atenuando así las señales que impulsan la fase de proliferación. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la vía IL-6/JAK/STAT3 está involucrada en la fase de iniciación de la RH, especialmente en la proliferación celular. La activación de STAT3 induce la transcripción de la molécula supresora de la señalización de citoquinas 3 (SOCS-3, por sus siglas en inglés), que actúa como regulador negativo de la vía IL-6/JAK/STAT3 a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. Su dominio SH2 le permite unirse a moléculas de señalización activadas, como STAT3 fosforilado, bloqueando su actividad. De

esta manera, SOCS-3 contribuye a la terminación de la RH al suprimir la proliferación celular mediada por STAT3, asegurando un control preciso del proceso regenerativo (199). Finalmente, la apoptosis juega un papel crucial en la eliminación de hepatocitos excedentes y células dañadas, asegurando una recuperación de la masa hepática normal y previniendo la aparición de displasia o transformación neoplásica (198).

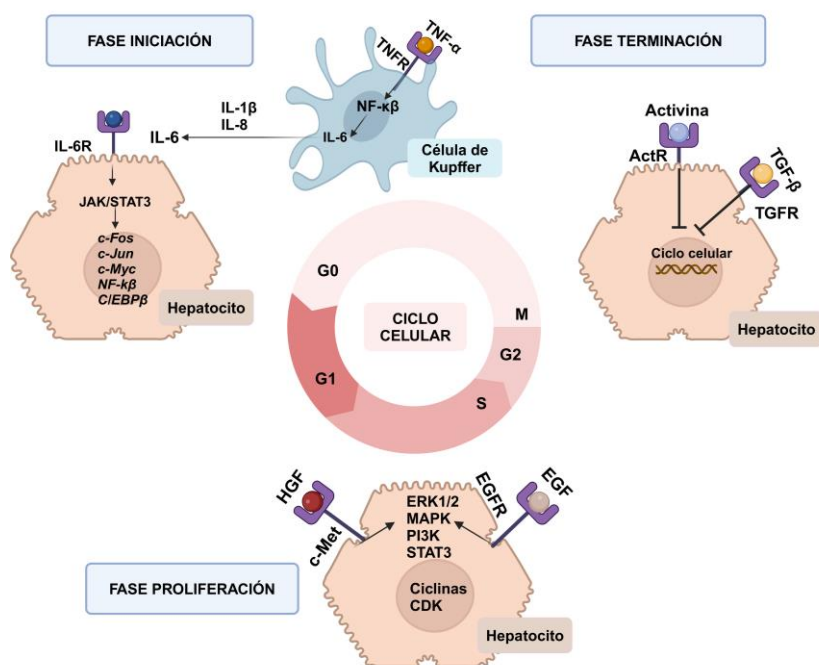


Figura I.13. Fases de la RH en el modelo de HPx y principales moléculas implicadas.

Abreviaturas destacadas: ActR, receptor de activina; CDK, quinasa dependiente de ciclina; EGF, factor de crecimiento epidérmico; ERK1/2, quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2; HGF, factor de crecimiento hepatocitario; IL, interleucina; MAPK, quinasa de proteínas activadas por mitógenos; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; STAT3, transductor de señales y activador de transcripción 3; TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; TGFR, receptor de TGF; TNF- α , factor de necrosis tumoral α ; TNFR, receptor de factor de necrosis tumoral.

Capítulo II

OBJETIVOS

El primer objetivo general de este estudio fue evaluar el potencial antifibrogénico de RPV mediante la caracterización de su efecto en la activación y respuesta de las HSC en modelos *in vitro*.

Los objetivos específicos para alcanzar este objetivo general fueron:

1. Caracterizar el impacto global de RPV en el transcriptoma de HSC activadas por TGF- β mediante un estudio de secuenciación de ARN.
2. Evaluar el efecto de RPV sobre varios procesos clave en la activación de las HSC: la capacidad migratoria y de proliferación durante la estimulación por PDGF- $\beta\beta$, el proceso autofágico en las células activadas por TGF- β y la función mitocondrial en la activación por TGF- β .
3. Analizar el efecto de RPV, solo y en combinación con SV, en la fibrogénesis, viabilidad celular y respuesta antioxidante de las HSC activadas por TGF- β , con el fin de identificar un posible efecto sinérgico o potenciador entre ambos fármacos.
4. Caracterizar el impacto de RPV en el perfil de secreción y composición proteica de las EV liberadas durante la activación celular con TGF- β .

El segundo objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de RPV en la RH utilizando un modelo *in vivo* de HPx del 70 % en roedores.

Capítulo III
MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. FÁRMACOS Y REACTIVOS

III.1.1. FÁRMACOS EMPLEADOS

a) Rilpivirina (RPV)

Para los ensayos *in vitro*, RPV se adquirió de Biosynth Carbosynth ® (Compton, Reino Unido) y se preparó una solución madre de 30 mM en DMSO estéril (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), que fue almacenada según las recomendaciones del fabricante (-80° C). En los ensayos *in vivo*, se utilizó el medicamento Edurant®, cuyo principio activo es la RPV, obtenido del servicio de Farmacia Hospitalaria Hospital Clínico Universitario de Valencia (España). Los comprimidos de dicho fármaco se pulverizaron en un mortero de vidrio y se disolvieron en DMSO estéril para su posterior administración por vía oral a los animales.

b) Simvastatina (SV)

Este fármaco se empleó para los ensayos *in vitro*, y se adquirió de Calbiochem (San Diego, EE. UU.). Se preparó una solución madre de 10 mM en DMSO estéril, que fue almacenada según las recomendaciones del fabricante (-80° C).

III.1.2. REACTIVOS PARA CULTIVO CELULAR

Los medios y suplementos para el cultivo celular se obtuvieron de Gibco™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.), Sigma-Aldrich y Lonza (Basilea, Suiza). En la tabla III.1 se encuentran los reactivos empleados para el cultivo celular y las casas comerciales de cada uno de ellos.

Tabla III.1. Reactivos empleados para el cultivo celular y compañía de suministro.

REACTIVO	COMPañÍA
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich
Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con alta concentración de glucosa (4,5 g/L)	Gibco
Suero fetal bovino (FBS)	Lonza
Solución salina equilibrada de Hank (HBSS)	Lonza
Tripsina-EDTA 0,25 %	Gibco
Penicilina/Estreptomicina	Gibco
Anfotericina B	Gibco
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Lonza

III.2. MODELOS EXPERIMENTALES Y TÉCNICAS

III.2.1. MODELOS *IN VITRO*

Los cultivos celulares se mantuvieron durante su crecimiento en un incubador (IGO 150, Jouan, Saint-Herblain Cedex, France) a 37° C con una humedad atmosférica del 95 % y un 5 % de CO₂ (AirLiquide Medical, Valencia, España).

III.2.1.1. LÍNEAS CELULARES HUMANAS

Se utilizó la línea celular inmortalizada de HSC, LX-2, adquirida de Sigma-Aldrich que se cultivó en medio DMEM con alta concentración de glucosa (4,5 g/L), suplementado con 10 % de FBS inactivado por calor, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Se realizaron pases celulares utilizando tripsina-EDTA al 0,25 % cuando los cultivos alcanzaron un 95 % de confluencia.

III.2.1.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS PRIMARIAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS HUMANAS (hHSC)

El procedimiento de aislamiento se llevó a cabo como describió previamente Casini *et al.*, 1993 (200). Las hHSC se aislaron de tejido remanente (20 g)

obtenido de HPx de pacientes sometidos a cirugía por metástasis hepática de tumor primario de colon. Este protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valencia (ref. 2018/272) y, en todos los casos, los pacientes firmaron el consentimiento informado (género: 4 hombres y 2 mujeres, edad: 51-80, edad promedio: 65,7 años) (Anexo II).

Tras el lavado con HBSS a 37° C, las resecciones hepáticas se trocearon con el uso de una cuchilla estéril con 0,5 % de pronasa (Sigma-Aldrich), 0,05 % de colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich) y 5 µg/mL de desoxirribonucleasa I (ADNasa) (Sigma-Aldrich) en 100 mL de HBSS sin Ca²⁺ y Mg²⁺, y se agitaron a 37° C durante 30 min. La suspensión celular obtenida se filtró con la ayuda de dos tamices metálicos dispuestos en configuración vertical, uno superpuesto sobre el otro. En el tejido no digerido, se realizó de nuevo el proceso de digestión con 0,05 % de pronasa, se filtró y se combinó con el resto de la suspensión celular. Se lavó posteriormente varias veces, se centrifugó (5 min, 500 g) en una solución de HBSS con 5 µg/mL de ADNasa y, por último, el pellet celular obtenido fue resuspendido en 25 mL de la misma solución. Con el objeto de separar las hHSC del resto de células, se preparó un gradiente de tres capas con Percoll (GE Healthcare Life Sciences, Madrid, España) al 100 %, 50 % y 35 % (v/v). Se depositó cuidadosamente la suspensión celular sobre el gradiente y se centrifugó a 274 g durante 30 min a 4° C. Tras la centrifugación, las HSC se recuperaron del halo localizado en la interfase entre el medio y el gradiente al 35 % (Figura III.1). Una vez aisladas, las hHSC se sembraron en placas y se incubaron en medio DMEM con alta concentración de glucosa, 20 % de FBS, 100 U/mL de penicilina y estreptomycin y 0,25 µg/mL de anfotericina B a 37° C en 5 % de CO₂. El medio se cambió 24 h después del sembrado inicial y cada 72 h a partir de entonces. Posteriormente, se siguió el cultivo celular de igual modo que la línea celular LX-2 (Apartado III.2.1.1).

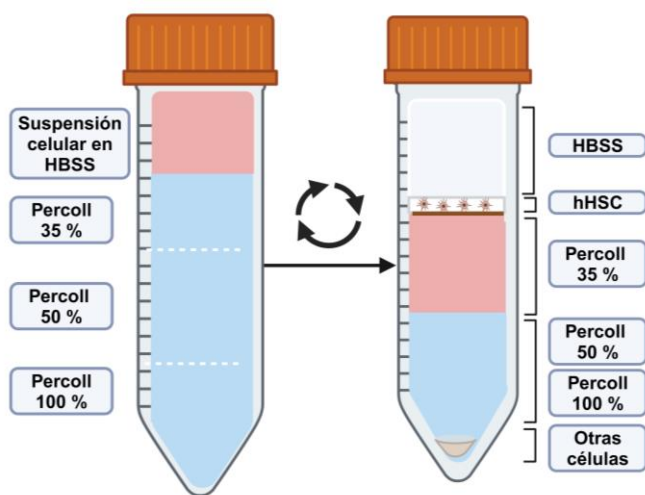


Figura III.1. Representación gráfica del gradiente de Percoll para el aislamiento de hHSC.

III.2.1.3. TRATAMIENTOS *IN VITRO*

Teniendo en consideración la variabilidad interindividual en su farmacocinética, se escogieron cuatro concentraciones de RPV (1, 2, 4 y 8 μM) con el fin de evaluar sus posibles efectos de manera concentración-dependiente (201). Cada experimento contó con un control negativo (células sin tratar), un control positivo (células tratadas con el factor estimulante de las HSC, PDGF- $\beta\beta$ (10 ng/mL) o TGF- β (2,5 ng/mL)) y un control del vehículo del fármaco (DMSO). Cabe destacar que todos los tratamientos, salvo indicación contraria, se realizaron durante 48 h.

Para optimizar el diseño experimental y reducir el número de condiciones, en determinados experimentos se omitió el control negativo, decisión fundamentada en resultados preliminares que mostraban diferencias mínimas entre el grupo tratado con vehículo y el control negativo.

III.2.2. MODELO *IN VIVO* DE HPX 70 %

En este protocolo experimental *in vivo*, se emplearon ratones hembra C57BL/6J de diez semanas de edad (con un peso corporal de 20 ± 3 g)

suministrados por Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, Francia). Los animales se mantuvieron a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ bajo un régimen estándar de luz/oscuridad (12 h/12 h) con acceso *ad libitum* a agua y dieta convencional (Envigo, Huntingdon, Reino Unido), y se dividieron al azar en los diferentes grupos experimentales.

El protocolo experimental se llevó a cabo de acuerdo con las pautas para el cuidado y manejo de animales de laboratorio de la Universidad de Valencia (Valencia, España), y fue aprobado por el comité de ética local (código de autorización 2022 VSC PEA0109) (Anexo III).

La dosis de RPV administrada (0,1 mg disueltos en 10 μL de DMSO) se calculó utilizando el factor de escala alométrica interespecies normalizado, basado en cálculos de área superficial corporal interespecífica. Este método, estandarizado por la FDA (*Food and Drug Administration*), permite establecer una dosis para ratones que sea equivalente a la dosis máxima diaria recomendada para humanos (25 mg) (202). Al concluir el protocolo experimental, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical tras anestesia inhalada de isofluorano. Se extrajeron muestras de sangre de la vena cava y se procedió a la extracción del hígado. Tras pesarlos, los hígados se dividieron en dos partes para su posterior análisis: una parte se fijó en formalina al 10 % para análisis histológico y la otra se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización. Para llevar a cabo este procedimiento *in vivo*, los grupos experimentales establecidos fueron los siguientes:

- **Control (Sham) + vehículo:** Ratones sometidos a laparotomía y tratados con DMSO.
- **Control (Sham) + RPV:** Ratones sometidos a laparotomía y tratados con RPV.
- **HPx + vehículo:** Ratones sometidos a HPx y tratados con DMSO.
- **HPx + RPV:** Ratones sometidos a HPx y tratados con RPV.

La administración diaria de RPV o vehículo comenzó una semana antes de la cirugía y continuó hasta el final del experimento (Figura III.2). El sacrificio se realizó en los siguientes puntos temporales postcirugía: 1, 2, 3 y 7 días, y en cada uno de ellos se registró el peso corporal (g) y el peso total del hígado (g). El coeficiente hepático se calculó utilizando la siguiente fórmula: $CE = (\text{peso total del hígado (g)} / \text{peso corporal (g)}) \times 100 \%$.

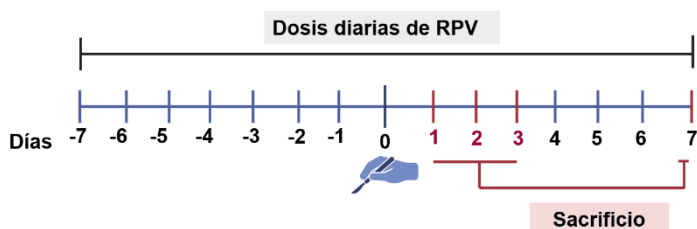


Figura III.2. Representación gráfica del protocolo experimental de HPx 70 %.

Para el procedimiento quirúrgico, se siguió la técnica descrita por Higgins y Anderson (193). Tras la administración de isoflurano en una cámara de inhalación, se realizó una incisión laparotómica (2,5 cm) a todos los ratones. En los animales del grupo HPx, se realizó una ligadura alrededor de los lóbulos lateral izquierdo y medio por separado, procediendo posteriormente a su resección (Figura III.3). Los ratones del grupo control únicamente fueron sometidos a la incisión laparotómica, sin resección de los lóbulos hepáticos.

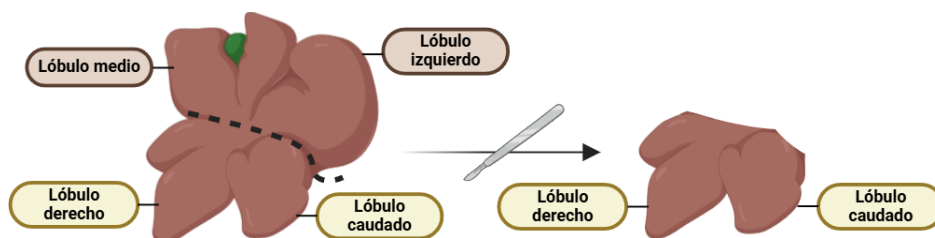


Figura III.3. Representación gráfica de los lóbulos hepáticos resecados en el protocolo de HPx 70 % en ratón.

III.2.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

III.2.3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS DE CULTIVO CELULAR Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA CELULAR TOTAL

Tanto en las hHSC como en las LX-2, tras la retirada del medio de cultivo, las células adheridas al frasco de cultivo se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente y se desprendieron mediante la adición de tripsina-EDTA al 0,25 % (37° C, 1 min) empleando DMEM para parar la reacción. La suspensión resultante se centrifugó (1200 g, 3 min), se eliminó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 1 mL de PBS frío. La suspensión resultante se centrifugó (500 g, 5 min, 4° C) y, posteriormente, los sobrenadantes se descartaron y los pellets de células se almacenaron a -80° C hasta su posterior utilización. Para el procedimiento de extracción de proteína celular total, los pellets celulares se resuspendieron en 50 µL de tampón de lisis, compuesto por 90 % de Phosphosafe™ Extraction Reagent (Merck Milipore) y 10X de Compleat Mini™ Protease Inhibitor (Roche Life Science), un cóctel de inhibidores de serina, cisteína y metaloproteasas, así como calpaínas. Tras agitar brevemente las muestras empleando un vórtex v-1-plus (Biosan, Ritga, Letonia), se incubaron a temperatura ambiente 5 min. Seguidamente, fueron centrifugadas (16000 g, 5 min, 4° C) y el sobrenadante obtenido, compuesto por el extracto de proteína celular total, se almacenó a -80° C hasta su posterior uso.

III.2.3.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL EN TEJIDO HEPÁTICO

Las muestras de hígado (20-35 mg) se homogeneizaron en 900 µL de tampón de extracción (0,66 M Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF y el inhibidor de proteasas Complete Mini™) usando un MACS™ Dissociator (MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Después de agregar 10 µL de NP-40 Surfact-Amps™ (Thermo Fisher Scientific) al 10

%, las muestras homogeneizadas se sonicaron (sonicador B200, Branson, Danbury, EE. UU.) (5 min, 4° C) y, posteriormente, centrifugaron (16000 g, 40 min, 4° C). Los sobrenadantes resultantes (extractos totales de proteínas) se recogieron y almacenaron a -80° C hasta su posterior uso.

III.2.3.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: ENSAYO DE ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)

La cuantificación del contenido de proteínas se realizó mediante el ensayo de BCA. Este método se basa en la reacción de Biuret, que implica la reducción de iones Cu^{2+} por residuos oxidables de aminoácidos como tirosina, triptófano y cisteína en un medio básico. Los iones Cu^+ resultantes se unen a dos moléculas de BCA, formando un complejo de color púrpura intenso que absorbe luz a una longitud de onda de 562 nm. La absorción de este complejo es proporcional a la concentración de proteínas presentes en la muestra, permitiendo una cuantificación precisa en un rango amplio de concentraciones (0,02-2 mg/mL).

Para realizar el ensayo, se utilizó el BCA Protein Assay Kit (Pierce Chemicals, Boulder, EE. UU.). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se preparó una curva estándar mediante diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), lo que permitió establecer una correlación entre la absorbancia y la concentración de proteína de la muestra. En una placa de 96 pocillos enfriada sobre hielo, se añadieron 20 μL de muestra diluida (1:20 o 1:30), curva patrón (0,03125 - 1 mg/mL) o blanco (agua) a cada pocillo. A continuación, se incorporaron 200 μL del reactivo (preparado en el momento del ensayo), que se obtuvo mezclando 50 partes del reactivo A (que contiene BCA, carbonato sódico, tartrato y bicarbonato sódicos, en una solución de 0,1 M de NaOH) con 1 parte del reactivo B (Cu_2SO_4 al 4 %). El ensayo se realizó por duplicado, y la placa se incubó a 37° C durante 30 min con agitación constante y protegida de la luz. Finalmente, la absorbancia se midió a 562 nm utilizando un lector

espectrofotométrico de placas (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific).

III.2.3.4. WESTERN BLOTTING (WB)

A. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

La separación de proteínas por electroforesis se llevó a cabo utilizando geles de poliacrilamida. Se empleó la solución de acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 para la preparación de geles de resolución (8-15 % de acrilamida, Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, SDS al 0,1 %) y geles de concentración (5 % acrilamida, Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS al 0,1 %). La polimerización de los geles se catalizó mediante la adición de persulfato de amonio (APS, por sus siglas en inglés) (SERVA, Heidelberg, Alemania) y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (Fluka o Sigma-Aldrich).

Previo a la carga en el gel, los extractos proteicos se mezclaron con el tampón de carga de Laemmli (0,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 25 % glicerol v/v, 10 % SDS, 0,5 % β -mercaptoetanol y 0,5 % de azul de bromofenol) y se llevaron a ebullición (5 min, 95° C) para permitir el proceso de desnaturalización de las proteínas. Además de cargar las muestras, se añadió un marcador (EZ-RUN™ Pre-stained Rec Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) para la determinación del peso molecular de las proteínas.

La electroforesis se llevó a cabo utilizando el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell Electrophoresis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE. UU.) y el tampón de electroforesis (Trizma base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %) a un voltaje constante de 120 V. Tras completar este paso, se procedió a la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m (GE Healthcare Life Sciences) utilizando la celda de transferencia electroforética Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Este proceso se realizó en presencia de un tampón de transferencia (Trizma base

25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 %) en un periodo de 1 h, a 4° C y una corriente eléctrica constante de 400 mA.

B. Tinción con rojo Ponceau y marcaje con los anticuerpos

Una vez completada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se incubó 1 min con una solución de rojo Ponceau (Sigma-Aldrich) al 0,1 % en 5 % de ácido acético para evaluar la cantidad de proteínas cargadas y la eficacia del proceso de transferencia. Tras eliminar la tinción de Ponceau con agua destilada, la membrana se incubó en agitación continua con una solución bloqueadora (leche en polvo sin grasa o BSA 5 % preparada en el tampón Tris salino con Tween 20 al 0,1 % v/v (TBS-T)) durante 1 h a temperatura ambiente. La incubación del anticuerpo primario, diluido en la solución de bloqueo y suplementado con azida sódica al 0,02 % (NaN_3 , Merck Milipore), se llevó a cabo durante toda la noche (4° C, agitación constante usando un agitador de balanceo DRS-12 (ELMI, Ritga, Letonia) y, posteriormente, la membrana se lavó tres veces durante 10 min con TBS-T en agitación intensa. Por último, la membrana se incubó (1 h, temperatura ambiente) con el anticuerpo secundario, preparado en la solución de bloqueo, y se realizaron tres lavados de 10 min con TBS-T en agitación intensa. Los detalles de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se encuentran especificados en la tabla III.2 y tabla III.3, respectivamente.

Tabla III.2. Listado de anticuerpos primarios empleados para los experimentos de inmunotransferencia.

ANTICUERPOS PRIMARIOS				
PROTEÍNA	ESPECIE/TIPO	PM (kDa)	DILUCIÓN	COMPAÑÍA (referencia)
GAPDH	Conejopoliclonal	36	1:20000	Sigma Aldrich (G9545)
PPARg	Conejo/policlonal	56	1:1000	Abcam (ab19481)
COL1A1	Conejo/monoclonal	170	1:1000	Cell Signaling (84336)
pAkt	Conejo/policlonal	65	1:1000	Cell Signaling (9271)
pERK1/2	Conejo/policlonal	44,42	1:1000	Cell Signaling (9101)
pJNK1/2	Conejo/monoclonal	46,54	1:1000	Thermo Fisher (700031)
pp38	Ratón/monoclonal	38	1:1000	Cell Signaling (9216)
MTND1	Conejo/monoclonal	36	1:1000	Abcam (ab74257)
Porina	Ratón/monoclonal	32	1:1000	Abcam (ab14734)
GRP75	Ratón/policlonal	75	1:1000	Abcam (ab53098)
DRP1	Conejo/monoclonal	82	1:1000	Cell Signaling (8570S)
pDRP1	Conejo/policlonal	82	1:1000	Cell Signaling (3544S)
OPA1	Ratón/monoclonal	80,100	1:1000	BD Biosciences (612606)
MTFN2	Ratón/monoclonal	86	1:1000	Abcam (ab56889)
LC3	Conejo/policlonal	17	1:1000	Cell Signaling (2775)
p62	Ratón/monoclonal	62	1:1000	Santa Cruz (sc-28359)
ATG5	Conejo/monoclonal	58	1:1000	Cell Signaling (12994)
ATG7	Conejo/monoclonal	70	1:1000	Cell Signaling (8558)
Beclin1	Conejo/policlonal	56	1:1000	Invitrogen (PA1-16857)
pSTAT1	ratón/monoclonal	87	1:1000	Abcam (ab29045)
pSTAT3	Conejo/policlonal	88	1:1000	Abcam (ab76315)
STAT3	Ratón/monoclonal	88	1:1000	Cell Signaling (74234)
Nrf2	Conejo/policlonal	61	1:1000	Santa Cruz (sc-13032)
HO-1	Ratón/monoclonal	50	1:1000	Santa Cruz (sc-136961)
Albúmina	Conejo/policlonal	69	1:1000	Abcam (ab135575)
YAP	Ratón/monoclonal	78	1:1000	Cell Signaling (12395)
pYAP	Conejo/monoclonal	78	1:1000	Cell Signaling (13008)
PCNA	Ratón/monoclonal	3	1:1000	Thermo Fisher (PC10)

Tabla III.3. Listado de anticuerpos secundarios empleados para los experimentos de inmunotransferencia.

ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
ANTICUERPO	MARCAJE	DILUCIÓN	COMPAÑÍA (referencia)
Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón	HRP	1:2000	Thermo Fisher (31430)
Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo	HRP	1:5000	Vector (PI-1000)

C. Detección por quimioluminiscencia

La visualización del inmunomarcaje se realizó mediante quimioluminiscencia empleando los reactivos Immobilon™ Crescendo Western HRP substrate (Merck Milipore), Immobilon™ Forte Western HRP substrate (Merck Milipore) o SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific). Este método de detección se fundamenta en una reacción de oxidación del luminol, catalizada por la enzima peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) conjugada al anticuerpo secundario. En presencia de H₂O₂, esta reacción genera 3-aminofalato, con una emisión lumínica a 425 nm. Tras ajustar el tiempo de exposición según la intensidad de la señal de cada proteína y tipo de reactivo utilizado, el inmunomarcaje se visualizó utilizando una máquina de revelado automática Amersham ImageQuant (GE Healthcare Life Science). Posteriormente, se realizaron los análisis densitométricos de los resultados mediante el software Fiji (Image J) y la expresión proteica se normalizó con respecto a los niveles de la proteína de referencia gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, por sus siglas en inglés).

E. Reutilización de las membranas de nitrocelulosa

Para permitir la reutilización de la membrana de nitrocelulosa en el análisis de otras proteínas de interés, se eliminaron los anticuerpos primarios y secundarios sumergiendo la membrana en una solución de glicina (0,5 M, pH 2,5) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación continua y, tras tres lavados con TBS-T (10 min cada uno), se continuó con el protocolo estándar de WB descrito en la sección III.2.3.4., comenzando por el bloqueo de la membrana.

III.2.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

III.2.4.1. EXTRACCIÓN DE ARN DE CULTIVO CELULAR

Para el aislamiento y purificación de ARN de cultivos celulares se empleó el kit comercial ilustra™ RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare Life Sciences) siguiendo las directrices proporcionadas por el fabricante. Los pellets celulares se lisaron con 350 µL de tampón de lisis con la adición de 3,5 µL de β-mercaptoetanol, y se procesaron pasándolas a través de una aguja de calibre 25 G. El lisado resultante se filtró para reducir la viscosidad y, posteriormente, se incorporaron 350 µL de etanol al 70 % con el objeto de permitir la retención del ARN en las columnas. Después del lavado con la disolución de desalado para facilitar la digestión con ADNasa, se aplicó ADNasa I y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron varios pasos de lavado con las disoluciones proporcionadas por el kit y, finalmente, el ARN fue eludido con agua libre de nucleasas. Por último, la pureza y concentración del ARN se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

III.2.4.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE TEJIDO HEPÁTICO

Para realizar la extracción de ARN a partir de tejido hepático, se empleó Tripure Isolation Reagent (Roche Life Science). Las muestras de tejido hepático (30-40 g) fueron homogeneizadas utilizando el dispositivo MACS™ Dissociator (MACS, Miltenyi Biotec) en presencia de 750 µL de TriPure, seguido de una centrifugación (16000 g, 15 min, 4° C) para eliminar los restos de tejido hepático. Posteriormente, al sobrenadante se le añadieron 150 µL de cloroformo para facilitar la separación de las fases (acuosa, interfase y orgánica). Las muestras se sometieron a agitación, seguida de una incubación en hielo durante 15 min y centrifugación (16000 g, 15 min, 4° C). La fase acuosa superior, que contiene el ARN, se transfirió a tubos nuevos y el ARN se precipitó incubando la solución con 500 µL de isopropanol toda la

noche a -20°C . A continuación, las muestras se centrifugaron (16000 g, 20 min, 4°C), se lavaron dos veces con 1 mL de etanol al 70 % y se centrifugaron nuevamente (16000 g, 15 min, 4°C). Finalmente, el pellet de ARN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30-100 μL (dependiendo del tejido y la cantidad) de agua libre de nucleasas. La pureza y concentración del ARN se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

III.2.4.3. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc) POR RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

Para la síntesis de ADNc se empleó la transcriptasa reversa PrimeScript™ RT Reagent Kit (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japón) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se transcribió 1 μg de ARN total con PrimeScript Buffer, 1 μL de PrimeScript RT Enzyme Mix I, 50 pmol de Random 6-mers and 25 pmol de Oligo dT Primer en un volumen final de 20 μL . La reacción tuvo lugar en un termociclador GeneAmp® PCR System 2400 (PerkinElmer Inc, Waltham, MA, EE. UU.) con las siguientes condiciones: 37°C durante 15 min, 85°C durante 5 s, y 4°C hasta su almacenamiento a -20°C .

III.2.4.4. RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR)

La RT-qPCR se realizó con TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) de TaKaRa Bio Inc, que contiene TaKaRa Ex Taq HS, una mezcla de dNTP, Mg^{2+} , Tli ARNasa H y SYBR Green I. Este fluoróforo emite fluorescencia exclusivamente al unirse el ADN de doble cadena. Tras cada ciclo de amplificación, el SYBR Green I se excita y su emisión de luminiscencia se mide, permitiendo cuantificar la cantidad de producto obtenido. Se utilizó 1 μL de ADNc, 5 μL de TB Green® Premix Ex Taq™, cebadores a 2 μM (sentido y antisentido) y agua libre de nucleasas, en un volumen final de 10 μL , y las RT-qPCR se realizaron en un termociclador Lightcycler® 96 Real-

Time PCR System (Roche Life Science), siguiendo el protocolo: 30 s a 95° C, 5 s a 95° C, 15 s a 65° C, 1 s a 95° C y 30 s a 40° C.

Cada experimento incluyó un control negativo (se sustituyó el ADNc por 1 µL de agua) y todas las muestras fueron realizadas por duplicado. Las parejas de cebadores empleadas para genes de ratón (Tabla III.4) y de humanos (Tabla III.5) fueron diseñadas por Primer-BLAST tool (203) y sintetizadas por Condolab (Madrid, España). Antes de su utilización, los cebadores se validaron mediante análisis de punto de fusión del producto y electroforesis en gel de agarosa al 2 %, utilizando Serva DNA Stain G (Serva, Heidelberg, Alemania) y tampón TAE (20 mM Tris pH 7,8, 0,5 mM EDTA y 10 mM de acetato de sodio).

Tabla III.4. Parejas de cebadores para genes de ratón empleados en qRT-PCR.

PAREJAS DE CEBADORES PARA GENES DE RATÓN		
GEN	SENTIDO (5'→3')	ANTISENTIDO (5'→3')
<i>Actb</i>	GCCAACCGTGAAAAGATGACC	GAGGCATACAGGGACAGCAC
<i>Alb</i>	AGTGAGATCGCCCATCGGTA	ACAGCAGTCAGCCAGTTCAC

Tabla III.5. Parejas de cebadores para genes de humano empleados en qRT-PCR.

PAREJAS DE CEBADORES PARA GENES DE HUMANO		
GEN	SENTIDO (5'→3')	ANTISENTIDO (5'→3')
<i>ACTB</i>	GCCAACCGTGAAAAGATGACC	CTGTACGCCAACACAGTGCT
<i>CCND1</i>	ATGCCAACCTCCTCAACGACC	TCCTCCTCGCACTTCTGTTC
<i>CMYC</i>	TTCCCCTACCCTCTCAACGAC	TTCTTCCTCATCTTCTTGTTCCTCC
<i>BCL2L11</i>	CAACACAAACCCCAAGTCCTC	GTCTCCAATACGCCGCAAC
<i>CDKN2A</i>	GCACCAGAGGCAGTAACCA	ATGAAAACACTACGAAAGCGGGG
<i>ACTA2</i>	CCAAGCAACCGGGAGAAAATGA	GCATAGAGAACAGCACCCGCTGG
<i>COL1A1</i>	AAGCTGGAAAACCTGGTCGT	AGCACCATCATTCCACGAG
<i>TGFB1</i>	CTTCAGCTCCACAAGAAGAACTG	ACGATCATGTTGGACAACCTGCTC
<i>PDGFRB</i>	CCATCAGCAAGGACACCA	CCCAGCAGGTCAGAACGAA
<i>PPARG</i>	GACAGGAAAGACAACAGACAAATC	GGGGTGATGTGTTTGAACCTG
<i>SQSTM1</i>	GGTTGCCTTTCCAGTGACG	TCGAGACGCTACACAAGTC
<i>SERPINE1</i>	CGTGCTCAAGAAGACCCACA	ACCTGCTGAAACACCCCTCAC
<i>TIMP1</i>	AATTCCGACCTCGTCATCAGG	ATCCCCTAAGGCTTGGAAACC
<i>MMP2</i>	CAATTCCTCCGGCGATGC	TTCTGGTCAAGGTCACCTGTCT
<i>NQO1</i>	AACTGAAGGACCCTGCGAAC	ACTCGCTCAAACCAFCTTTT
<i>HO1</i>	TTCTCTTGGCTGGCTTCCTTAC	AACTCAGGGCTTTTGGAGTTT

Los datos obtenidos de la qRT-PCR se analizaron empleando el método comparativo C_T (*Cycle Threshold*) con el propósito de obtener la expresión génica relativa del gen de interés. Este enfoque se fundamenta en la siguiente ecuación: $Fold\ Change = 2^{-\Delta(\Delta C_T)}$, donde $\Delta C_T = C_T$ (gen de interés) - C_T (gen de control de carga), y $\Delta(\Delta C_T) = \Delta C_T$ (tratado) - ΔC_T (control). Se empleó *ACTB/Actb* (β -actina) como gen de control (204).

III.2.4.5. SILENCIAMIENTO GÉNICO TRANSITORIO MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA

Para silenciar transitoriamente *Nrf2*, se empleó el siARN específico (Santa Cruz Biotechnology, Inc), siARN de control no conjugado SignalSilence® (Cell Signaling Technology) y Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron durante 4 h con OptiMEM (Thermo Fisher Scientific) que contenía siARN (100 nM) y 5 μ L, 2 μ L y 1 μ L de Lipofectamine™ 2000 por pocillo para placas de 6, 24 y 96 pocillos, respectivamente.

III.2.4.6. ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN DE ARN

A. Librerías de ARNm y secuenciación de ARN

Para evaluar el efecto de RPV a gran escala en la expresión génica de hHSC, se realizó un análisis de secuenciación de ARN (Servicio de Genómica y Epigenética, Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM), Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, España). En primer lugar, se prepararon bibliotecas de ARNm a partir de ARN total utilizando el kit de preparación de bibliotecas de ARNm de cadena TruSeq de Illumina (Illumina, San Diego, EE. UU) siguiendo el protocolo del fabricante. Para ello, la purificación del ARNm se llevó a cabo utilizando oligos dT que se unen a las colas poliA de los ARNm y, posteriormente, estas moléculas se fragmentaron y se hibridaron con hexámeros para sintetizar el

ADNc. La segunda cadena del ADNc se sintetizó con dUTP para su marcaje y para asegurar la especificidad de la cadena; estas moléculas de doble cadena se ligaron a adaptadores indexados y, posteriormente, se enriquecieron mediante qRT-PCR. Las bibliotecas así generadas se cuantificaron mediante fluorimetría y su tamaño se verificó mediante el Bioanalyzer de Agilent (Santa Clara, EE. UU.), tras lo cual se preparó una reserva equimolar de todas las muestras y se secuenció en la plataforma NGS NextSeq 550 (Illumina) utilizando una secuenciación de lectura única de 75 ciclos (1x75 pb).

B. Análisis transcriptómico

El análisis bioinformático se llevó a cabo por la plataforma de bioinformática del Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). El procesamiento de las lecturas brutas, incluido el control de calidad, el recorte de los adaptadores de Illumina, el filtrado, la alineación con el genoma del ratón y la cuantificación de genes se realizaron de acuerdo con lo descrito por Planas *et al.*, 2022 (205). Por último, se utilizó DESeq2 (un paquete del software estadístico R) en conteos brutos para identificar genes diferencialmente expresados (DEGs, por sus siglas en inglés) (206).

Para la visualización de los datos y la interpretación de los resultados, se emplearon varios métodos. Por un lado, los datos se representaron en Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) para visualizar los patrones globales de expresión génica y evaluar las similitudes entre las muestras, usando la función estadística princomp y empleando el paquete ggplot2 de R para la representación (207). Por otro lado, se realizaron mapas de calor (*heatmap*) con agrupamiento jerárquico de correlaciones de Pearson usando el paquete pheatmap de R (208). Para la identificación visual rápida de genes con grandes cambios de expresión que también son estadísticamente significativos, se recurrió a los gráficos de

volcán, un tipo de gráfico de dispersión que muestra la significancia estadística ($-\log_{10}$ del p valor) frente a la magnitud del cambio (\log_2 del *fold change*), empleando el paquete *ggplot2* de R.

Finalmente, se realizó un análisis de sobrerrepresentación de grupos de genes (ORA, por sus siglas en inglés) para identificar si los genes con un p valor $< 0,05$ estaban enriquecidos en un contexto biológico dado. Para este análisis, se empleó la base de datos MSigDB y, concretamente, las colecciones de genes de Reactome (209). Con la función *enricher* del paquete *clusterProfiler* de R (210), se investigó el enriquecimiento de procesos biológicos en el conjunto de genes sobreexpresados e infraexpresados identificados mediante DESeq2. Este análisis se representó mediante un gráfico de puntos (*dotplot*) usando *ggplot2* de R.

III.2.5. ENSAYO DE QUIMIOTAXIS DE hHSC

Para evaluar la migración de las hHSC, las células se sembraron a una densidad de 0,06 millones de células/mL y, al día siguiente, se sometieron a privación de FBS durante 24 h con el objeto de evitar que éste actuara como un factor quimioatrayente durante el ensayo. Transcurridas 48 h de tratamiento con el agente estimulante y/o fármaco, se lavaron, se desprendieron con tripsina, se resuspendieron en 1 mL de medio libre de FBS y se contaron. Por último, 30000 células se resuspendieron en un volumen final de 200 μ L de medio de cultivo celular.

La quimiotaxis se evaluó utilizando cámaras de Boyden modificadas (Neuro Probe, Inc., Gaithersburg, EE. UU.) con filtros de 8 μ m de poro (Cytiva, Marlborough, EE. UU.), recubiertos previamente con colágeno de cola de rata (20 μ g/mL) (Sigma-Aldrich) e incubados (37° C, 30 min), tal y como se muestra en la Figura III.4. La suspensión celular se colocó en el compartimento superior, mientras que PDGF- $\beta\beta$ (10 ng/mL) se colocó en el compartimento inferior en medio libre de FBS. Tras incubar durante 6 h a 37 ° C y 5 % de CO₂, se descartó la suspensión celular y se limpió la parte

superior del filtro con hisopos. Las células que migraron al lado inferior de los filtros se fijaron en metanol al 100 % (15 min), se tiñeron con hematoxilina al 100 % (15 min), se montaron y se adquirieron imágenes a 10X de magnificación utilizando el microscopio Leica DMI 3000-B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). La cuantificación del área de hematoxilina se llevó a cabo con Image J.

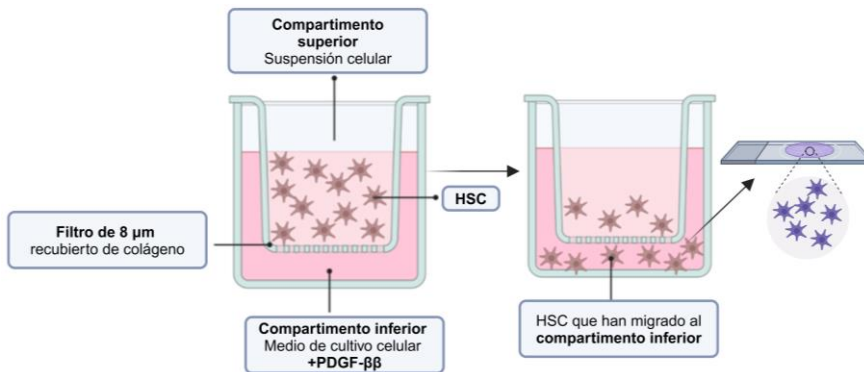


Figure III.4. Representación gráfica del ensayo de quimiotaxis.

III.2.6 ENSAYO DE CIERRE DE LA HERIDA

Las células LX-2 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 0,06 millones de células/mL y se cultivaron durante 24 h en medio con 10 % de FBS. Para minimizar el efecto de la proliferación celular en el ensayo, se redujo el medio a 1 % de FBS durante las siguientes 24 h. A continuación, las células se trataron durante 24 h en medio con 1 % de FBS y, posteriormente, se retiró el medio condicionado y se reservó. Se añadieron 2 mL de PBS estéril a cada pocillo para facilitar la realización de una herida lineal en la monocapa celular utilizando una punta de micropipeta de 10 µL. Se eliminaron las células desprendidas mediante aspiración del PBS y se añadió nuevamente el medio condicionado previamente reservado. En este punto, se inició el tratamiento con el factor de crecimiento PDGF-ββ (10 ng/mL) en las condiciones experimentales correspondientes. Por último, se

tomaron imágenes de las heridas del cultivo celular en varios tiempos (0, 8, 24 y 48 h, considerando 0 h el momento posterior a realizar la herida) utilizando el microscopio Leica DMI 3000-B (Leica Microsystems). El análisis densitométrico de las imágenes se realizó con el software Image J, complementado con un plugin adicional descargado desde (<https://github.com/AlejandraArnedo/Wound-healing-size-tool/wiki>) (Wound_healing_size_tool.ujm).

III.2.7. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

Para la evaluación de la viabilidad celular, se emplearon dos métodos diferentes, seleccionados en función de las características específicas de cada experimento.

III.2.7.1. ESTUDIO DE VIABILIDAD MEDIANTE MTT

Uno de los métodos empleados fue la evaluación mediante colorimetría por MTT (Cell Proliferation Kit I MTT, Roche Life Sciences), que se basa en la capacidad de las células metabólicamente activas para reducir la sal amarilla de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) a diformazán, un compuesto púrpura insoluble (Figura III.5). La reacción es catalizada por reductasas mitocondriales activas presentes únicamente en células viables y, por tanto, la reducción de MTT está relacionada, en condiciones generales, con el número de células viables presentes en la muestra. Este ensayo se realizó en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Se añadieron 10 µL del reactivo que contiene el sustrato (Roche Life Science) en cada pocillo y se incubaron durante 4 h. Posteriormente, se eliminó el medio y los cristales de diformazán resultantes de la reacción se solubilizaron con 100 µL de DMSO. La solución coloreada se cuantificó espectrofotométricamente a 570 nm como la absorbancia de lectura, y a 690 nm como absorbancia de fondo (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific).

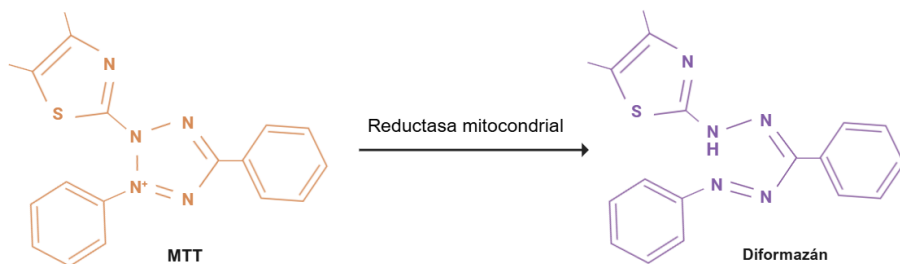


Figura III.5. Representación gráfica de la reacción que tiene lugar en el ensayo de MTT.

III.2.7.2. ESTUDIO DE VIABILIDAD MEDIANTE FOSFATASA ÁCIDA Y CÁLCULOS DE SINERGIA

Este ensayo se basa en la actividad de la enzima fosfatasa ácida citosólica, presente únicamente en células viables, y que cataliza la hidrólisis de ésteres fosfóricos en un medio ácido. La reacción que tiene lugar se basa en la conversión de p-nitrofenil fosfato (sustrato) a p-nitrofenol, un compuesto amarillo cuya concentración, medida por espectrofotometría, es proporcional a la actividad enzimática y, por tanto, a la viabilidad celular (211). Las células se cultivaron en una placa de 96 pocillos y, tras el tratamiento, se retiró el medio y se lavó con PBS. Luego, se añadieron 100 μL de buffer de ensayo (0,1 M de acetato de sodio a pH 5,0, 0,1 % Triton X-100) y 7,25 mM de p-nitrofenil fosfato (Sigma-Aldrich), y las placas se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 h. Finalmente, se detuvo la reacción con la adición de 50 μL de NaOH 1 M y se midió el color de cada pocillo a 405 nm utilizando un lector de placas Multiskan® EX (Thermo Fisher Scientific). Se incluyeron pocillos control sin células para determinar la hidrólisis no enzimática del sustrato.

Adicionalmente, se realizaron análisis de sinergia para evaluar interacciones entre los dos tratamientos evaluados en este experimento (SV y RPV) y las representaciones gráficas con el modelo de Bliss se calcularon utilizando la aplicación web SynergyFinder.

III.2.8. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La microscopía de fluorescencia se ha empleado para abordar diversas cuestiones experimentales en esta tesis doctoral. En los siguientes apartados se describe en detalle la metodología específica aplicada en cada estudio.

III.2.8.1. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL

En todos los casos, las células se sembraron a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células por pocillo en un portaobjetos de cámara de 8 pocillos estéril (Ibidi, Gräfelfing, Alemania). La adquisición de imágenes se realizó en la UCIM, utilizando un microscopio confocal de barrido láser Leica TCS-SP8 (Leica Microsystems). El sistema incluía láseres de diodo 405 y de luz blanca acoplados a un microscopio invertido Leica DMI8 con platina calefactada e incubada con CO_2 . Las imágenes se capturaron con objetivos de 63 \times (HC PL APO 63.0 \times /1.40 NA CS2 oil) o 40 \times (HC PL APO 40 \times /1.30 NA CS2 oil).

A. Análisis de la masa y morfología mitocondrial

La tinción de las mitocondrias en células vivas se realizó con colorantes no dependientes del $\Delta\Psi_m$. Tras del tratamiento habitual, se incubaron durante 30 min a 37° C con 100 nM de NAO (10-nonyl acridine orange, Thermo Fisher Scientific), un compuesto verde fluorescente que se une específicamente a la cardiolipina, un fosfolípido de la IMM; 100 nM de MitoView 650 (Biotium, Fremont, EE.UU.), una tinción mitocondrial de color rojo lejano adecuada para tinción a largo plazo en células vivas; y 100 nM de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich), que emite fluorescencia azul al unirse al ADN, por lo que es empleado para la detección de núcleos. Posteriormente, se retiró el medio, se lavaron las células con KB (Krebs Buffer) y se incubaron con KB que contenía 5 mM de D-glucosa, 2,5 mM de CaCl_2 y 100 nM de Hoechst 33342 durante la obtención de imágenes de células vivas.

Para el análisis de la morfología mitocondrial a nivel de células individuales, las imágenes de fluorescencia de MitoView se sometieron a un proceso de deconvolución y posteriormente se analizaron utilizando el software Fiji (Image J). Se aplicó la función de sustracción de fondo con la opción de *sliding paraboloid* a 50 píxeles. A continuación, se empleó el plugin *MiNA analyze morphology* (211) para obtener la longitud media de las ramificaciones mitocondriales en cada imagen. Este análisis se llevó a cabo empleando un filtro gaussiano con un radio de 4 píxeles para la convolución y un umbral basado en el método de máxima entropía. Por otro lado, para analizar la masa mitocondrial, se utilizó Image J para determinar el número de células, así como el área e intensidad de la señal de NAO. Los parámetros utilizados para la evaluación de la masa mitocondrial fueron *area stained per cell* e *intensity of the staining per cell*.

B. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Las células se incubaron en el medio de cultivo (30 min, 37° C) con 60 nM de tetrametilrodamina metil éster (TMRM, Thermo Fisher Scientific), un colorante fluorescente catiónico de color rojo-anaranjado, fácilmente captado por las mitocondrias activas y empleado para evaluar el $\Delta\psi_m$; y 100 nM de Hoechst 33342 para la detección de núcleos. Cabe destacar que se utilizó el desacoplador mitocondrial CCCP (Sigma Aldrich) como control experimental, a una concentración de 50 μ M que se incubó 30 min previamente a la tinción. El análisis de las imágenes se analizó utilizando CellProfiler. Se empleó un módulo de *correct illumination* con un tamaño de bloque de 60 y sin suavizado para minimizar la señal de fondo. Posteriormente, se aplicó un módulo de suavizado para mejorar la señal de fluorescencia y la imagen resultante se procesó con un módulo de *identify secondary objects* para definir los límites celulares. Luego, se utilizó un módulo de identificación de mitocondrias (*identify primary objects*) para delimitar cada orgánulo a partir de la señal TMRM y asignarlo a su célula correspondiente. Finalmente, se

aplicó el módulo *measure object intensity* para obtener la intensidad media de cada mitocondria.

C. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL CON MITOSOX UTILIZANDO IMÁGENES EN VIVO DE CÉLULAS INDIVIDUALES

Las células se incubaron (30 min, 37° C) con 1 μ M de MitoSox (Thermo Fisher Scientific), un derivado catiónico del dihidroetidio (DHE) diseñado para detectar superóxido mitocondrial en células vivas, ya que es capaz de permeabilizar selectivamente la mitocondria debido a su carga positiva; y con 100 nM de Hoechst 33342 en HBSS (30 min, 37° C). A continuación, se lavaron con HBSS y se visualizaron inmediatamente en el microscopio. El control positivo empleado en este caso fue rotenona (25 μ M), un inhibidor del complejo I en la ETC mitocondrial, que se agregó 1 h antes de la tinción. Se empleó Image J para el análisis de la señal de MitoSox, cuantificando el número de células, el área y la intensidad de fluorescencia. La evaluación de la producción de ROS se basó en los parámetros *area stained per cell* e *intensity of the staining per cell*.

III.2.8.2. EVALUACIÓN DE AUTOFAGIA

En todos los casos, las células se sembraron ($1,5 \times 10^4$ células/pocillo) en un portaobjetos de cámara de 8 pocillos estéril (Ibidi). La adquisición de imágenes se realizó en la UCIM, utilizando un microscopio confocal invertido de barrido láser Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems). Las imágenes se capturaron con el objetivo de 40 \times (HC PL APO 40.0 \times /1.25 NA CS oil).

A. Microscopía de fluorescencia en tándem del sistema eGFP/mCherry

El flujo autofágico se monitorizó utilizando LC3 marcado con fluorescencia en tándem (mCherry-GFP). La proteína mCherry (fluorescencia roja) mantiene su fluorescencia en el ambiente ácido del lisosoma, a diferencia del

GFP (fluorescencia verde). Por lo tanto, la expresión de mCherry sin señal de GFP, es decir, fluorescencia roja, indica la presencia de autolisosomas, mientras que la co-localización de GFP y mCherry (fluorescencia amarilla/naranja) señala autofagosomas.

Se transfectaron las células con el plásmido codificante para LC3 o p62-mCherry-GFP (proporcionado por el Prof. José M. Fuentes de la Universidad de Extremadura, España) utilizando lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific). Tras 4 h de incubación, las células se trataron (incluido con el control positivo rapamicina (5 μ M)) y posteriormente se lavaron dos veces con buffer KB (140 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM $MgCl_2$, 15 mM HEPES) y se reemplazó el medio con 300 μ L de KB que contenía 5 mM de D-glucosa, 2,5 mM de $CaCl_2$ y 100 nM de Hoechst.

B. Evaluación de autofagia empleando Cyto-Id

La autofagia se evaluó utilizando el kit de detección de autofagia CYTO-ID® 2.0 (Enzo Biochem Inc, Nueva York, EE. UU.), que ofrece un enfoque rápido y cuantitativo para monitorizar la autofagia en células vivas sin necesidad de transfección celular. Cyto-Id etiqueta selectivamente las vacuolas autofágicas acumuladas, incluyendo preautofagosomas, autofagosomas y autolisosomas (autofagolisosomas), con una tinción mínima de los lisosomas. Tras el tratamiento, las células se incubaron con 100 μ L/pocillo de solución de tinción (2 μ L de Cyto-ID en 1 mL de KB y 100 nM de Hoechst 33342) durante 30 min a 37° C. Posteriormente, se lavaron con KB y se reemplazó el medio con KB que contenía 100 nM de Hoechst, 5 mM de D-glucosa y 2,5 mM de $CaCl_2$.

Cabe destacar que, para las hHSC, a diferencia del resto de parámetros estudiados en la sección de autofagia, se empleó el microscopio confocal de barrido láser invertido (Leica TCS SP8, en la UCIM) con un objetivo HC PL APO 40.0 \times 1.30 NA CS2 oil equipado con un láser blanco (WLL) y un láser de diodo.

C. Evaluación del contenido lisosomal utilizando LysoTracker Red

Una vez tratadas las células, la detección de lisosomas se realizó mediante tinción con 100 nM de LysoTracker™ Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific) durante 30 min a 37°C para la detección de lisosomas, junto con la tinción de Hoechst 33342. Tras la incubación, las células se lavaron con KB y se mantuvieron en KB con 5 mM de D-glucosa, 2,5 mM de CaCl₂ y 100 nM de Hoechst 33342.

En los tres parámetros de análisis de autofagia, el procesamiento inicial de las imágenes se llevó a cabo utilizando el software Image J. Se realizó una sustracción del fondo a partir de las imágenes (realizadas en serie) empleando la función sustracción de fondo con la opción *sliding paraboloid* ajustada a un radio de 50 píxeles. El análisis de las imágenes se realizó con CellProfiler: En el caso de las imágenes de fluorescencia dual, se recortaron individualmente las imágenes en serie de células individuales que mostraban expresión del constructo y, tras la sustracción del fondo, se identificaron los puntos rojos y verdes mediante el módulo *identify primary objects* con un diámetro típico de objeto establecido entre 2 y 5 píxeles, empleado el método Otsu para la umbralización. Posteriormente, se relacionaron los objetos verdes con los puntos rojos utilizando el módulo *relate objects* y se clasificaron para obtener el número de puntos rojos, verdes y dobles positivos (rojos y verdes).

Para LTR y Cyto-Id, se aplicó un módulo de corrección de iluminación con un método de suavizado gaussiano, y los núcleos se determinaron empleando el módulo *identify primary objects* con un diámetro típico de objeto establecido entre 40 y 80 píxeles, empleando el método de Otsu para la umbralización. Para la señal de los puntos, se aplicó nuevamente un módulo de corrección de iluminación seguido del módulo de *enhance features* (tipo de característica establecido en *speckles*). Los puntos se identificaron empleando el módulo *identify primary objects* con un diámetro

típico de objeto establecido entre 2 y 10 píxeles, empleando el método de Otsu para la umbralización. Finalmente, el conjunto de puntos identificados se relacionó con su núcleo correspondiente mediante los módulos *expand objects* y *relate objects*.

III.2.8.3. EVALUACIÓN DE LA SINERGIA SV-RPV

A. Estudio de la activación de caspasa

La activación de caspasa se midió utilizando el reactivo CellEvent™ Caspase-3/7 Green ReadyProbes™ (Invitrogen). Las células se sembraron en una placa de 24 pocillos a una densidad de 3×10^4 células/pocillo. Se utilizó estaurosporina (STS, 0,1 μM) como control positivo de apoptosis, con una incubación de 2 h previo a la tinción. La tinción se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, añadiendo 2 gotas del reactivo por cada 1 mL de medio junto con 100 nM de Hoechst 33342 y yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tras 30 min (a 37 °C), las células se visualizaron en un microscopio de fluorescencia invertido Leica DMI 3000-B equipado con un objetivo de 20x. Las imágenes se procesaron con CellProfiler.

B. Detección de Nrf2 por inmunofluorescencia

Para el estudio de la localización de Nrf2, las células se sembraron como se describió en el apartado de activación de caspasa (III.2.8.3.A). Tras el tratamiento habitual, la fijación se realizó con paraformaldehído al 4 % (10 min), seguido de permeabilización con etanol al 95 % y ácido acético glacial al 5 % (10 min). Para la inmunofluorescencia, se utilizó un anticuerpo primario anti-Nrf2 (policlonal de conejo, 1:300, Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 (1:500, Thermo Fisher Scientific). Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con ProLong® Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) con DAPI para la visualización de los núcleos. Las imágenes se adquirieron en un

microscopio Leica DMI 6000-B (Leica Microsystems) con un objetivo HC PL FLUOTAR 20x/0.40 NA y un iluminador LED pE-300^{white} (CoolLED, Andover, Inglaterra). El análisis de las imágenes se realizó con CellProfiler.

C. Estudio de la producción de superóxido mitocondrial con MitoSox utilizando imágenes de células vivas

El análisis de la producción de superóxido mitocondrial se realizó como se describe en la sección (III.2.8.1 C), con las siguientes modificaciones: se empleó una concentración de rotenona de 50 μM como control positivo, MitoSOX a 5 μM y Hoechst 33342 a 500 nM. El análisis de las imágenes se realizó con CellProfiler.

III.2.9. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Para el análisis ultraestructural de las mitocondrias, se realizó TEM en la unidad central de microscopía electrónica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF, Valencia, España). Las células se sembraron (1×10^4 células/pocillo) en placas de cultivo estériles de 8 pocillos (NuncTM Thermo Fisher Scientific) y se trataron durante 48 h, tras lo cual se fijaron en glutaraldehído al 3 % en tampón fosfato (PB) 0,1 M (10 min, 37° C), se lavaron en PB y se fijaron nuevamente en glutaraldehído (2 h, temperatura ambiente). A continuación, se lavaron en PB 0,1 M cinco veces durante un período de 10 min y se almacenaron a 4°C. Las muestras se fijaron de nuevo en OsO₄ al 2 % durante 1 h a temperatura ambiente y se tiñeron con acetato de uranilo al 2 % en la oscuridad (2 h, 4° C). Después, se lavaron con agua destilada, se deshidrataron en etanol y se infiltraron durante la noche en resina Durcupan (Sigma-Aldrich). Tras la polimerización, los cultivos embebidos se despegaron de los pocillos y se pegaron a bloques de Durcupan. Finalmente, se cortaron secciones ultrafinas (0,08 μm) con un Ultracut UC-6 (Leica Microsystems), se tiñeron con citrato de plomo (solución de Reynolds) y se examinaron bajo un microscopio electrónico de

transmisión FEI Tecnai Spirit BioTwin (Thermo Fisher Scientific). Se tomaron fotomicrografías con una cámara digital Xarosa (EMSIS GmbH, Münster, Germany) controlada por el software Radius (Versión 2.1).

El tamaño y la forma de las mitocondrias se midieron utilizando Image J trazando manualmente las mitocondrias con contornos claramente discernibles en las micrografías TEM (212). El área superficial (tamaño mitocondrial) se reporta en micrómetros cuadrados, el perímetro en micrómetros, la relación de aspecto se calcula como [(eje mayor)/(eje menor)] y refleja la "relación longitud-ancho" y el factor de forma $[(\text{perímetro}^2)/(4\pi \cdot \text{área superficial})]$ refleja la complejidad y el aspecto ramificado de las mitocondrias. La circularidad $[4\pi \cdot (\text{área superficial}/\text{perímetro}^2)]$ y la redondez $[4 \cdot (\text{área superficial})/(\pi \cdot \text{eje mayor}^2)]$ son índices bidimensionales de esfericidad con valores de 1 que indican esferoides perfectos; por ejemplo, la circularidad indica la comparabilidad de la forma con un círculo, y es la relación entre el área real y el área de un círculo de la misma longitud, por lo que este factor aumenta a medida que la forma de la mitocondria se vuelve más circular.

III.2.10. ANÁLISIS DE BIOENERGÉTICA MEDIANTE EL ANALIZADOR SEAHORSE XF

El Analizador Seahorse XF (Agilent) es una tecnología ampliamente reconocida y estándar empleada para evaluar el estado bioenergético de células vivas, ya que mide simultáneamente la tasa de consumo de oxígeno en tiempo real (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR), indicativa del glicólisis (213) (Figura III.6). Las células se sembraron (1×10^4 células/pocillo, en un volumen final de 80 μL /pocillo) y se trataron durante 48 h. La función mitocondrial se evaluó utilizando el kit de prueba de estrés mitocondrial XFp Cell Mito Stress Test (Agilent), siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando el analizador Seahorse XF de 8 pocillos. Los compuestos se cargaron en los puertos de inyección del cartucho para

obtener concentraciones finales de 1,5 μM de oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa), 1 μM de FCCP (desacoplador mitocondrial) y 1 μM de rotenona (inhibe el complejo I de la ETC) / antimicina A (inhibe el complejo III de la ETC). Los datos se normalizaron al contenido de proteína en cada pocillo. Para ello, inmediatamente después de la medición de Seahorse, las células se lisaron con buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (50 μL /pocillo) y se determinó la concentración de proteína mediante el ensayo BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) descrito en el apartado III.2.3.3.

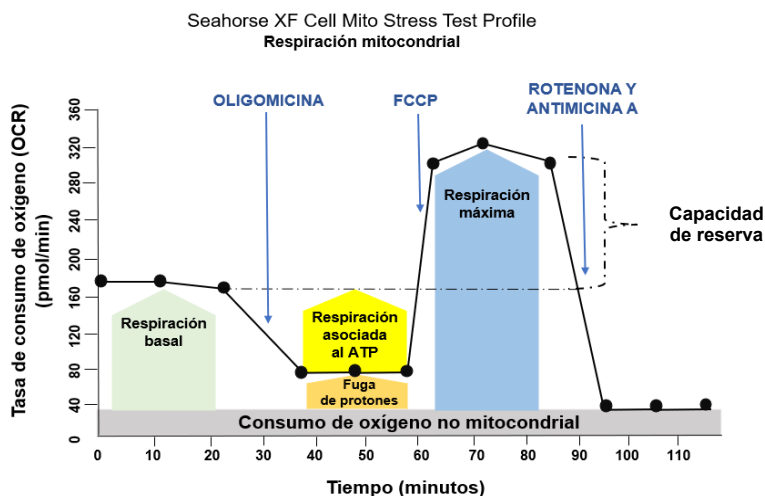


Figura III.6. Representación esquemática del flujo de trabajo y parámetros determinados en la prueba bioenergética MitoStress de Seahorse.

III.2.11. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE EV

III.2.11.1. AISLAMIENTO DE EV

Las células LX-2 se sembraron y trataron de manera estándar, con la excepción de que se empleó FBS desprovisto de EV durante las 48 h de tratamiento. Esta modificación tuvo como objetivo garantizar que las EV

aisladas provinieran exclusivamente de la secreción celular, evitando así la contaminación con EV presentes en el FBS. Tras las 48 h de tratamiento, se recolectó el medio de cultivo (250 mL por condición) y se sometió a dos pasos de centrifugación: primero a 3000 g (10 min, 4 °C) y, posteriormente, a 16000 g (20 min, 4 °C). El sobrenadante final, que contenía los productos de excreción y secreción celular, incluyendo las EV, se procesó utilizando el sistema de filtración tangencial TFF-Easy (Tangential Flow Filter for EV Concentration, HansBioMed Life Sciences). Este sistema, que emplea un cartucho de filtración que utiliza fibras huecas de polisulfona, permitió concentrar las EV hasta un volumen final de 1,5 mL de medio enriquecido en EV.

Para el aislamiento de las EV mediante cromatografía de exclusión por tamaño, el volumen de EV concentrado se cargó en columnas SPE Tube, Empty (Merck) con 10 mL de Sepharose-CL2B previamente empaquetada (Sigma-Aldrich) y se recolectaron 20 fracciones de 0,5 mL de cada muestra. Las fracciones enriquecidas en EV (fracciones 6-10) se agruparon y fueron concentradas utilizando un filtro centrífugo Amicon® Ultra-4 (MilliporeSigma, Billerica, EE. UU) (3200 g, 20 min, 4 °C), alcanzando un volumen total de 500 µL de EV aisladas (Figura III.7), que se almacenaron a -80° C hasta su posterior uso.

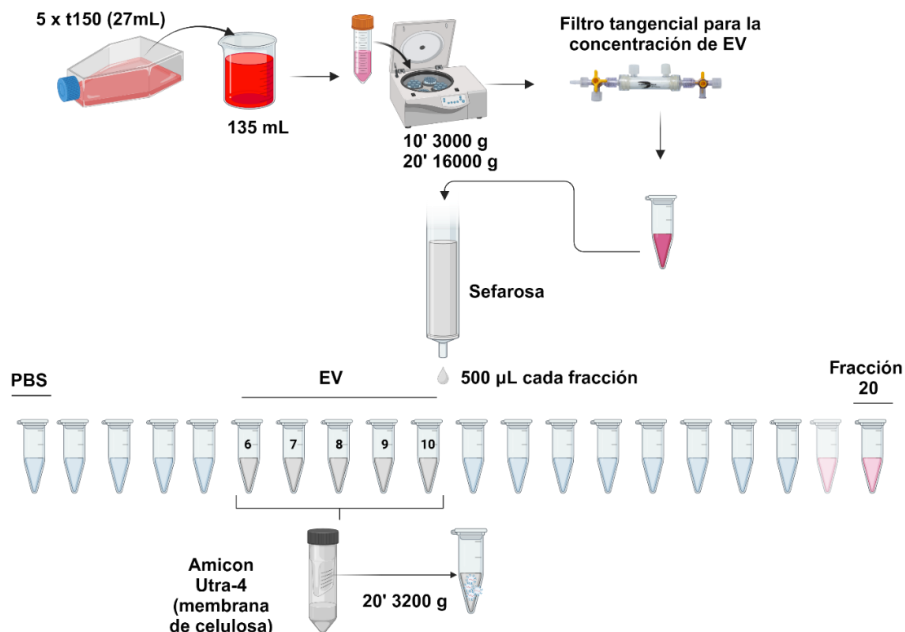


Figura III.7. Representación esquemática del proceso de aislamiento y concentración de EV.

III.2.11.2. ANÁLISIS DE SEGUIMIENTO DE NANOPÁRTÍCULAS (NTA)

La concentración y el tamaño de las EV se determinaron mediante la técnica de análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés) que se basa en el principio de dispersión de la luz y el movimiento browniano de las partículas en suspensión. Para ello, se utiliza un rayo láser que ilumina la cámara de muestra donde se encuentran las EV, lo que provoca su dispersión, la cual es captada por el objetivo de un microscopio y registrada por una cámara digital (Figura III.8). Esta cámara también permite observar el movimiento browniano de las partículas. Finalmente, un software de análisis de NTA rastrea individualmente cada partícula y, mediante la aplicación de la ecuación de Stokes-Einstein, calcula sus diámetros hidrodinámicos (214). En este estudio, realizado en el CIPF, la distribución

de tamaño de las EV se analizó utilizando un equipo NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido) equipado con un sistema de detección por fluorescencia y un sistema automático de bombeo mediante jeringuilla. Para cada muestra, se grabaron cinco vídeos de 30 s de duración, los cuales se analizaron posteriormente con el software NTA para determinar la concentración y el tamaño de las partículas.

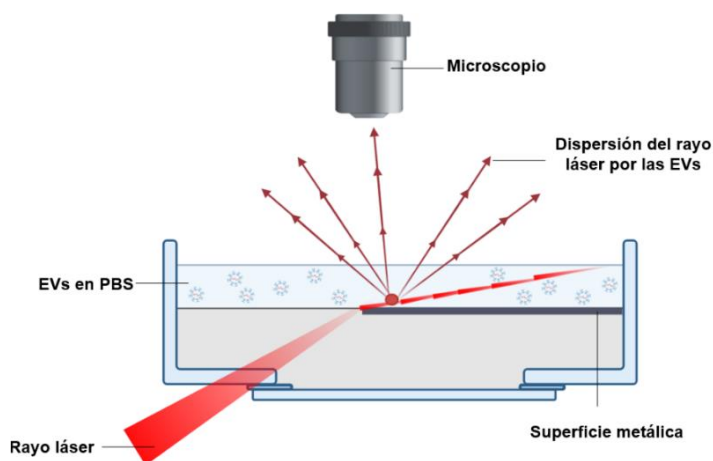


Figura III.8. Representación esquemática del NTA.

III.2.11.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM) PARA EL ANÁLISIS DE EV

Este experimento, al igual que el de NTA (II.2.11.2), se llevó a cabo en el CIPF. Las EV aisladas en PBS se aplicaron sobre rejillas de cobre recubiertas con una película de carbono (10 min), se lavaron con una gota de PB 0,1 M y se fijaron en glutaraldehído 1 % (5 min). Tras lavarse con agua destilada, se realizó una tinción con acetato de uranilo (2 %) y se embebieron en metilcelulosa. El exceso de solución se eliminó y las muestras se dejaron secar al aire antes de su visualización empleando un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai GS Spirit (Thermo Fisher Scientific). Por último,

la adquisición de las imágenes se realizó con una cámara digital Xarosa (EMSIS GmbH, Múnich, Alemania) controlada por el software Radius.

III.2.11.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS CÉLULAS Y LAS EV

Este estudio se llevó a cabo en el Cic Biogune (Bilbao, España). Inicialmente, se procedió a la extracción proteica por incubación de la muestra en un tampón de lisis compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M y detergente CHAPS (3-((3-colamidopropilo) dimetilamonio)-1-propanesulfonato) al 4 %. Tras 30 min de incubación a temperatura ambiente bajo agitación, se realizó la digestión siguiendo el protocolo FASP (*filter-aided sample preparation*) descrito por Wisniewski *et al.*, 2009 (215), con modificaciones menores. Se añadió tripsina en bicarbonato de amonio 50 mM a una relación tripsina:proteína de 1:10, y la mezcla se incubó (12 h, 37 °C). Los péptidos resultantes se secaron en un concentrador speedvac RVC2 25 (Christ, Osterode am Harz, Alemania) y se resuspendieron en ácido fórmico al 0,1 %. Finalmente, se realizó la desalinización y resuspensión de los péptidos en ácido fórmico al 0,1 % utilizando puntas de pipeta de 10 µL (Millipore Sigma) antes del análisis por espectrometría de masas.

El análisis por espectrometría de masas se llevó a cabo en un equipo timsTOF Pro con PASEF (Bruker Daltonics, Billerica, EE. UU.) acoplado a un cromatógrafo de líquidos Evosep ONE (Evosep, Odense, Dinamarca). Se inyectaron 200 ng de muestra en el Evosep ONE y se analizaron utilizando el protocolo de 60 muestras por día (216). Los datos DIA (*data-independent acquisition*) se procesaron con el software DIA-NN para la identificación y cuantificación de proteínas utilizando parámetros predeterminados. Las búsquedas se realizaron en una base de datos que constaba de entradas de proteínas de *Homo sapiens* de Uniprot en modo sin biblioteca (*library-free mode*), es decir, no se emplearon bibliotecas de espectros predefinidas para identificar proteínas. La carbamidometilación de cisteínas se consideró como modificación fija y la oxidación de metioninas como modificación variable.

Los datos se cargaron en la plataforma Perseus para el procesamiento de datos (transformación logarítmica en base 2, imputación de valores no detectados) y el análisis estadístico (prueba t de Student, para detectar las proteínas diferencialmente expresadas entre los diferentes tratamientos).

La visualización de los datos y la interpretación de los resultados, llevada a cabo por el CIBERehd, se realizó de igual modo que se describe en el apartado III.2.4.6.B.

III.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRESENTACIÓN DE DATOS

Todos los valores están expresados como media \pm error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés). El número de experimentos independientes (n) para cada parámetro está indicado en la leyenda de las figuras; todas las medidas se repitieron 3-8 veces. A menos que se indique lo contrario, los datos están representados como porcentaje de control (células sin tratar/células tratadas con vehículo para los análisis *in vitro* o ratones control (Sham) sacrificados a día 7, para los experimentos *in vivo*, considerados 100 %). Las ratios de expresiones proteicas se expresan en tanto por 1, considerando 1 el valor del control/vehículo. Los datos se analizaron usando el software GraphPad Prism® 8.0.2 (GraphPad Prism® Software Inc.) Los análisis estadísticos empleados para cada experimento se especifican en los resultados y pies de figura correspondientes. Los análisis de bioinformática (transcriptómica y proteómica) se detallan en los respectivos apartados de resultados. Por último, todas las representaciones gráficas de esta tesis doctoral se realizaron mediante el programa BioRender.com.

Capítulo IV
RESULTADOS

SECCIÓN A. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RPV EN HSC ACTIVADAS POR TGF- β MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN

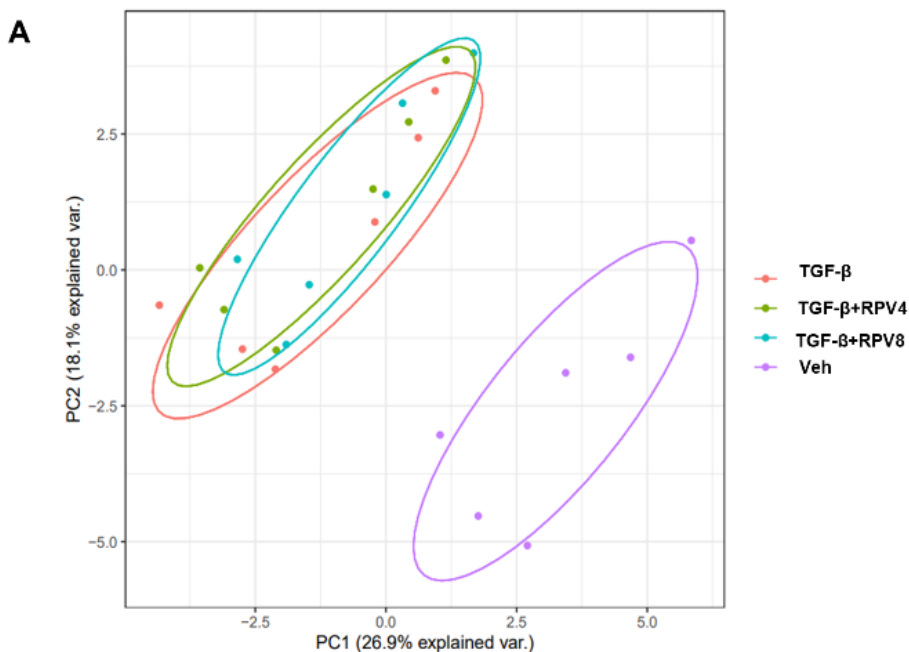
Con el objeto de caracterizar cambios de expresión génica a gran escala inducidos por el tratamiento con RPV en las HSC activadas, se realizó una secuenciación de ARN en hHSC expuestas a TGF- β .

El análisis de secuenciación detectó un total de 13157 secuencias, de las cuales 13156 fueron genes codificantes de proteínas. Se generó un gráfico de PCA para identificar patrones globales de expresión génica en respuesta al tratamiento con RPV en el contexto de la activación de las hHSC. En esta representación se observó una clara distinción entre el vehículo y las células estimuladas con TGF- β (en presencia o no de RPV) (Figura IV.A.1 (I) A).

Para evaluar la similitud entre los perfiles de expresión génica, se elaboró un mapa de calor con agrupamiento jerárquico de correlaciones de Pearson (Figura IV.A.1(I) B) Tras estandarizar los datos de expresión mediante la puntuación $z = (x - \mu) / \sigma$, donde x es el nivel de expresión de cada muestra, μ la media de la expresión en todas las muestras y σ la desviación estándar de la expresión en todas las muestras, el mapa visualiza la correlación entre cada par de muestras con una escala de color del azul al rojo (máxima correlación), agrupando jerárquicamente las muestras con perfiles similares para facilitar la identificación de patrones y la comparación entre las condiciones experimentales. El análisis, que incluyó seis réplicas por condición, mostró una mínima variación en la expresión génica entre las condiciones, evidenciado por el estrecho rango de correlación de Pearson (de 0,96 a 1). A pesar de que el análisis reveló una tendencia a la separación entre las muestras vehículo y las estimuladas con TGF- β (con o sin RPV), una de las réplicas del grupo vehículo (n1) mostró un perfil de expresión similar al de las células estimuladas, lo que refleja que existe cierta variabilidad en la susceptibilidad a los distintos tratamientos. Sin embargo,

ninguna réplica fue excluida del análisis para preservar la totalidad del conjunto de datos.

Posteriormente, se realizó un análisis de expresión génica diferencial para identificar los genes y las vías moleculares que experimentan una modulación en respuesta a la activación de las HSC y al tratamiento con RPV. Los resultados mostraron 2521 genes sobreexpresados y 2701 genes infraexpresados en el grupo TGF- β en comparación con el grupo vehículo (p valor ajustado <0,05), 25 genes sobreexpresados y 63 infraexpresados al comparar el grupo TGF- β +RPV 4 μ M con el grupo TGF- β (p valor <0,05) y 1082 genes sobreexpresados y 1232 infraexpresados entre los grupos TGF- β +RPV 8 μ M y TGF- β (p valor ajustado <0,05).



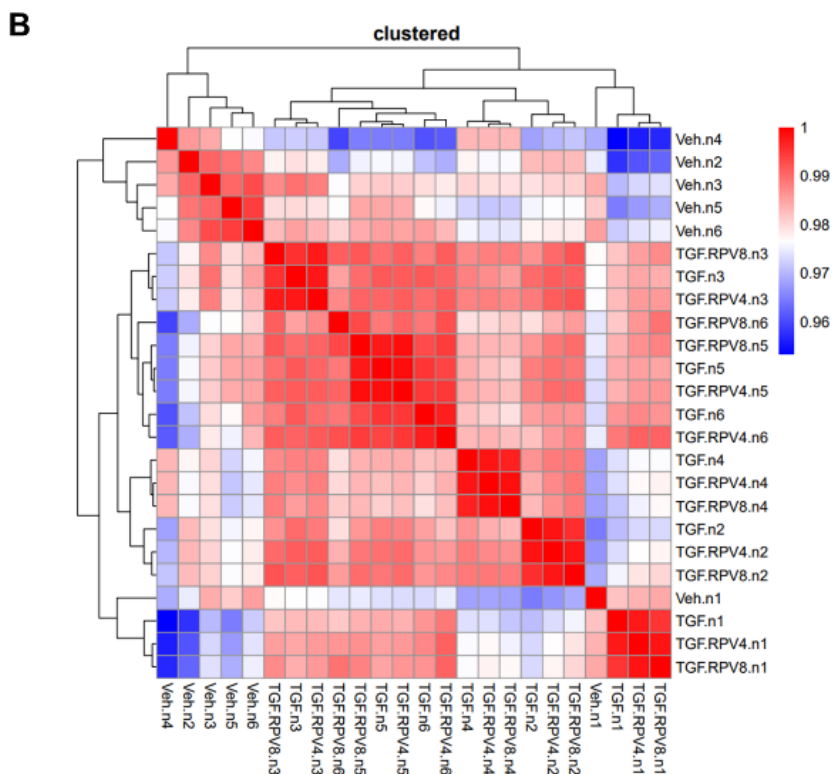


Figura IV.A.1. Análisis de patrones globales de expresión génica de hHSC (I). Las hHSC se trataron con Veh y TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=6$). **A)** PCA de las cuatro condiciones experimentales. **B)** Mapas de calor con agrupamiento jerárquico de correlaciones de Pearson representando todas las réplicas biológicas en cada condición experimental. La escala de color indica la correlación de Pearson entre las muestras, desde 0,96 (azul, baja correlación) hasta 1 (rojo, máxima correlación).

Complementariamente, se analizaron los datos mediante un gráfico de volcán (Figura IV.A.1. (II)), un tipo de gráfico de dispersión que muestra la significación estadística (p valor) versus la magnitud del cambio (*fold change*) y que permite la identificación visual rápida de genes con grandes cambios de expresión que también sean estadísticamente significativos. Este análisis mostró cambios importantes en los patrones de expresión, tanto de genes sobreexpresados como infraexpresados en todas las comparaciones, especialmente en células tratadas con TGF- β en comparación con el

vehículo. Entre los genes con mayor significancia estadística y mayor magnitud de cambio en la comparativa de TGF- β frente a vehículo se encuentran *PLPP3*, *GBP2*, *SYTL2*, *CNKS3* (infraexpresados) y *XYLT1*, *VDR* y *CLTCL1* (sobrexpresados). El tratamiento de TGF- β +RPV 4 μ M frente a TGF- β mostró cambios significativos en los genes *MYDGF*, *CYP2S1*, *IGFBR5*, *TOR4A*, *CRY1*, *GREM1* (infraexpresados) y *CD248* (sobrexpresado). Finalmente, TGF- β +RPV 8 μ M frente a TGF- β mantuvo *MYDGF* como gen más relevante entre los infraexpresados, además de *BMC10*, *FKBP10*, *SUN2*, *CRY1* y *SYNGR2*, y como genes más destacados entre los sobreexpresados se encontraron *CRYAB* y *ITPR3*.

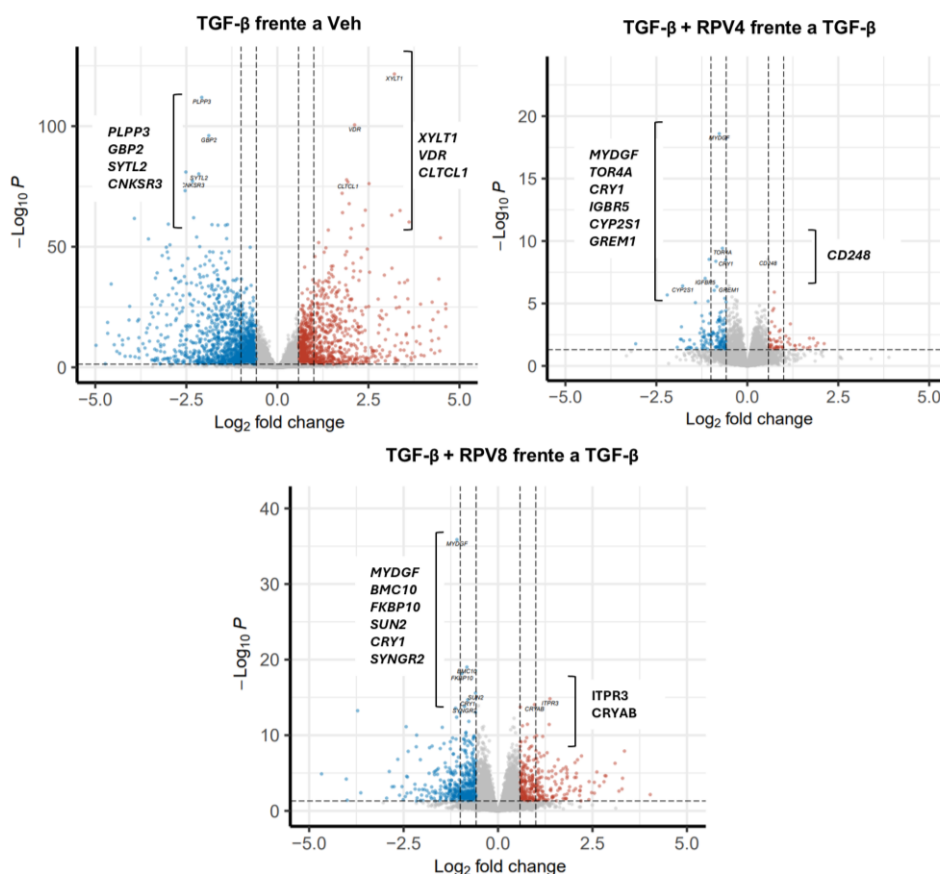
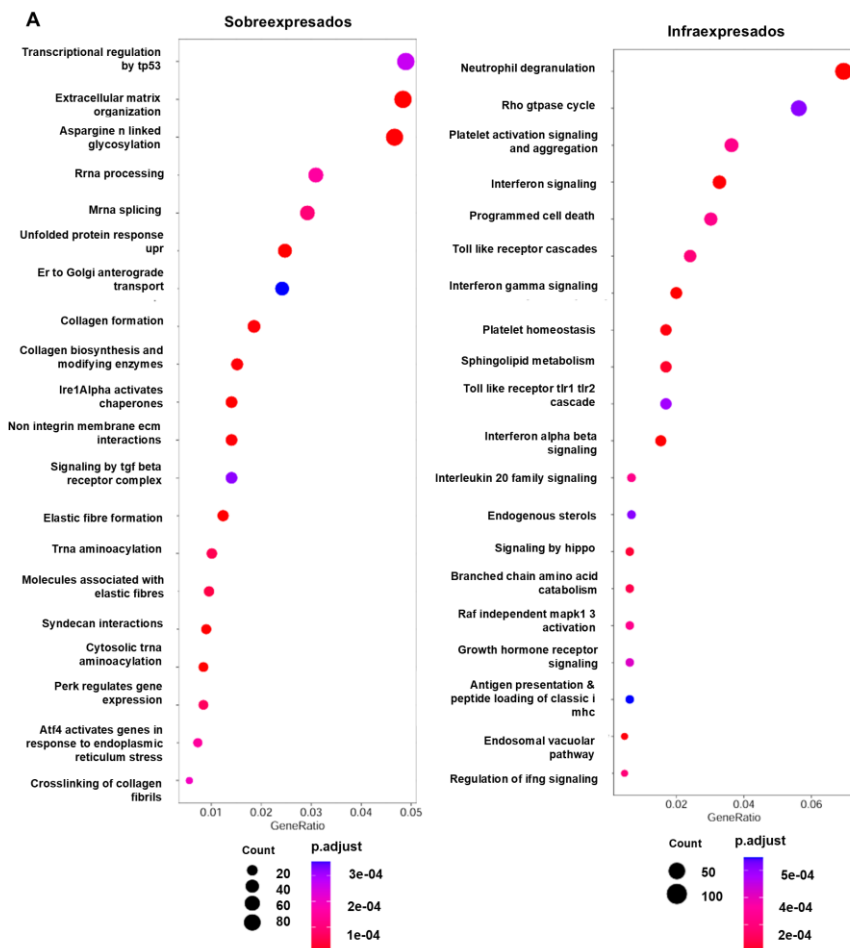
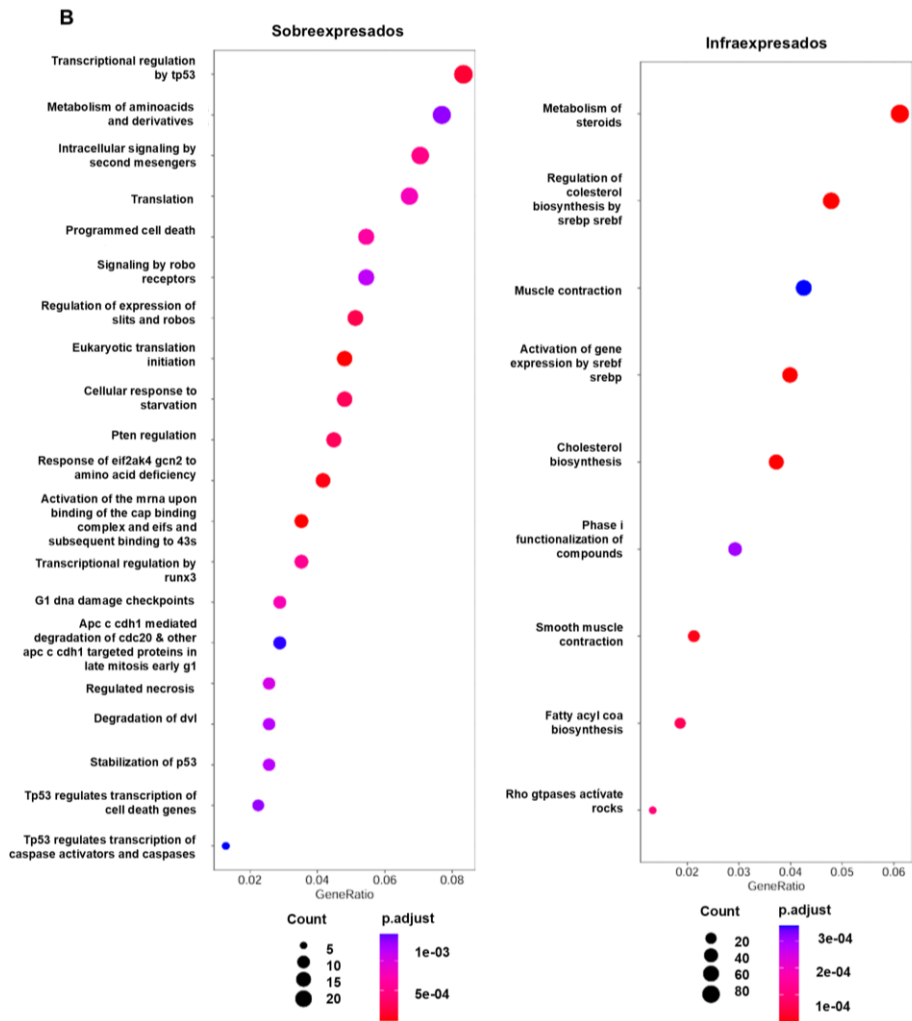


Figura IV.A.1. (Página anterior) Análisis de patrones globales de expresión génica de hHSC (II). Las hHSC se trataron con Veh y TGF- β solo (2,5 ng/mL) o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=6$). Gráficos de volcán de las siguientes comparaciones: TGF- β frente a vehículo, TGF- β +RPV4 frente a TGF- β y TGF- β + RPV8 frente a TGF- β . En azul se muestran aquellos genes infraexpresados con un p valor <0,5 y un *fold change* por debajo de -1,5. En rojo se muestran los genes sobreexpresados con un p valor <0,5 y un *fold change* por encima de 1,5. Se encuentran destacados los genes con mayor magnitud de cambio (al alza o a la baja) y mayor significancia estadística.

Para determinar las funciones biológicas enriquecidas en los perfiles de expresión génica de cada grupo experimental, se realizó un análisis de sobrerrepresentación (ORA, del inglés) de rutas de Reactome. Para cada comparación, se generaron dos listas de DEGs con un p valor <0,05, una con genes sobreexpresados y otra con genes infraexpresados. Ambas listas se sometieron a un análisis ORA y los 20 términos más enriquecidos de cada comparación (o 10 en el caso de RPV4), con un p valor <0,05, se seleccionaron y representaron en gráficos de puntos. El tratamiento con TGF- β indujo un enriquecimiento en términos relacionados con la activación de las HSC, tales como [organización de la ECM] [formación de colágeno], [biosíntesis de colágeno y enzimas modificadoras], [formación de fibras elásticas], [moléculas asociadas con fibras elásticas] y [entrecruzamiento de fibras de colágeno], así como en términos que reflejan la respuesta al estrés del RE como [transporte anterógrado del RE al Golgi], [regulación de la expresión génica por PERK] y [activación de genes en respuesta al estrés del RE por ATF4]. Entre los términos regulados a la baja se encontraron [muerte celular programada] y [ciclo de las Rho GTPasas] (Figura IV.A.2 A). Sin embargo, el cotratamiento con RPV mostró un efecto inhibitorio sobre la fibrogénesis. Concretamente, RPV 4 μ M disminuyó el término [contractilidad de la fibra muscular] y [contracción muscular]. Además, indujo una disminución de genes relacionados con la [biosíntesis de colesterol] y [biosíntesis de acil-coA ácidos grasos]. El tratamiento con RPV 8 μ M, en línea con el efecto antifibrogénico observado con RPV 4 μ M, disminuyó los términos [organización de la matriz extracelular], [formación de colágeno],

[formación de fibras elásticas] y [moléculas asociadas a fibras elásticas], revelando un mayor efecto antifibrótico con la concentración más alta del fármaco. Además, también disminuyó aquellos procesos relacionados con el transporte Golgi-ER: [transporte anterógrado del ER al Golgi], [transporte retrógrado del Golgi] y [transporte retrógrado del Golgi al ER dependiente de COPI]. Por último, ambas concentraciones de RPV generaron un cambio hacia un perfil transcripcional asociado a la inducción de apoptosis, sobreexpresando [muerte celular programada], [estabilización de p53], [tp53 regula la transcripción de genes de muerte celular] y [tp53 regula la transcripción de activadores de caspasa y caspasas] (Figura IV.A.2 B, C).





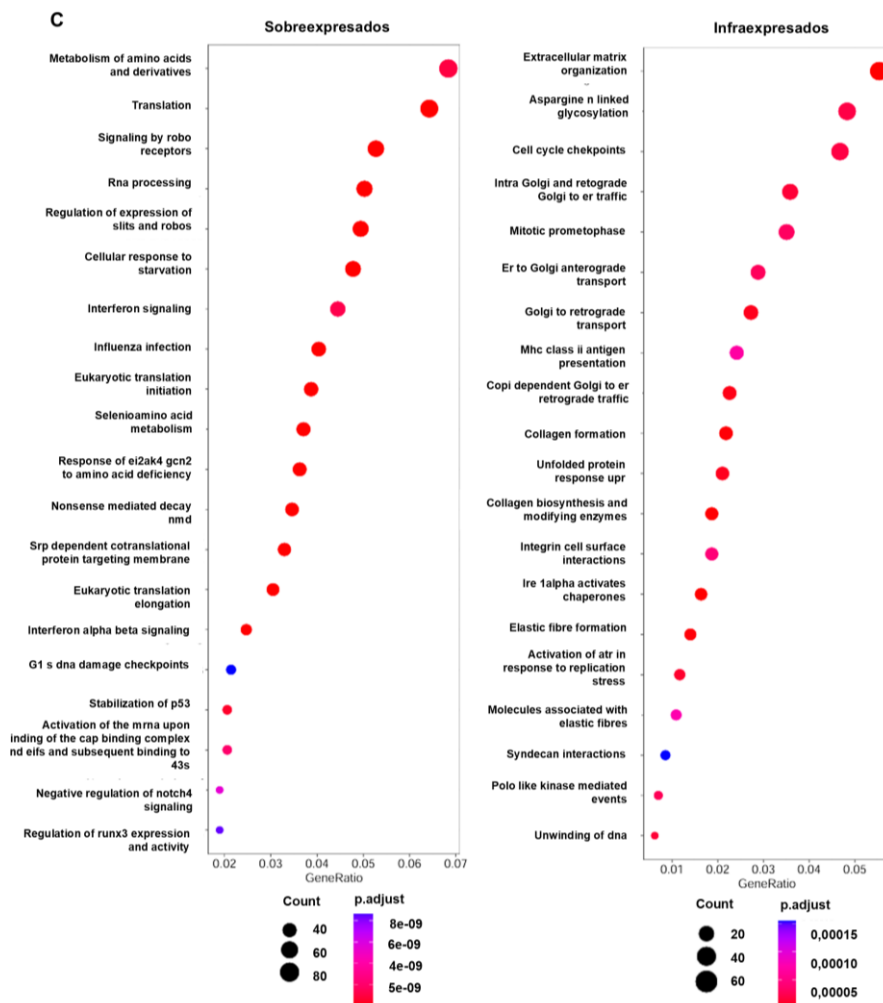


Figura IV.A.2. Análisis de funciones biológicas enriquecidas en los perfiles de expresión génica de hHSC mediante ORA. Las hHSC se trataron con Veh y TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=6$). Se representan las 20 funciones biológicas más enriquecidas ($p < 0,05$), tanto sobrexpresadas como infraexpresadas para las comparaciones de TGF- β frente a vehículo (A), TGF- β + RPV4 frente a TGF- β (B) y TGF- β + RPV8 frente a TGF- β (C). En este gráfico de puntos, el tamaño del punto representa el número de genes del conjunto de genes analizado (*count*) que están asociados a una función biológica específica, lo que permite visualizar rápidamente el grado de enriquecimiento. El color de los puntos indica el nivel de significancia estadística (p valor), con un gradiente de color que va desde rojo para los p valores más bajos (mayor significancia) hasta azul para los p valores más altos (menor significancia). El *GeneRatio*, representado en el eje horizontal, indica la proporción de genes dentro del conjunto analizado que están asociados con una función biológica dada.

SECCIÓN.B. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RILPIVIRINA EN HSC ACTIVADAS POR PDGF- $\beta\beta$

Dado el papel crucial del PDGF- $\beta\beta$ en la función de las HSC, esta sección se centra en evaluar el impacto de RPV sobre diversos procesos celulares desencadenados por este estímulo.

IV.B.1. EFECTO EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR

En primer lugar, se evaluó el efecto de RPV sobre la proliferación de hHSC estimuladas con PDGF- $\beta\beta$ durante 48 h. Como se muestra en la Figura IV.B.1 A, PDGF- $\beta\beta$ indujo un aumento en la proliferación celular en comparación con el tratamiento con vehículo. Este efecto proliferativo de PDGF- $\beta\beta$ fue contrarrestado por el tratamiento con RPV de manera dependiente de la concentración. Cabe destacar que este efecto inhibitorio de RPV no se debió a una disminución de la viabilidad celular, ya que ésta no se vio afectada por ninguna de las concentraciones de RPV utilizadas.

Para profundizar en el mecanismo por el cual RPV contrarresta el efecto proliferativo de PDGF- $\beta\beta$, se analizó la expresión de genes clave involucrados en la regulación del ciclo celular. PDGF- $\beta\beta$ indujo un aumento en la expresión de *CCND1*, un regulador positivo del ciclo celular, efecto que fue contrarrestado por la concentración más alta de RPV (8 μ M). Por otro lado, a pesar de que PDGF- $\beta\beta$ no alteró la expresión de *C-MYC* (un gen relacionado con la proliferación celular), el tratamiento con RPV (4 y 8 μ M) aumentó la expresión génica de este marcador, siendo dicho incremento significativo a la concentración más alta. En cuanto a la expresión de *CDKN2A*, un regulador negativo del ciclo celular involucrado en la senescencia, se observó un ligero aumento en presencia de RPV 4 μ M, mientras que PDGF- $\beta\beta$ no ejerció ningún efecto sobre la expresión de este gen. Finalmente, la expresión de *BCL2L11*, una proteína proapoptótica, disminuyó en presencia de PDGF- $\beta\beta$, mientras que RPV mostró una tendencia a aumentar su expresión sin alcanzar la significancia estadística

(Figura IV.B.1 B). En conjunto, estos datos destacan que RPV podría estar regulando negativamente el ciclo celular y la supervivencia de las HSC activadas por PDGF- β .

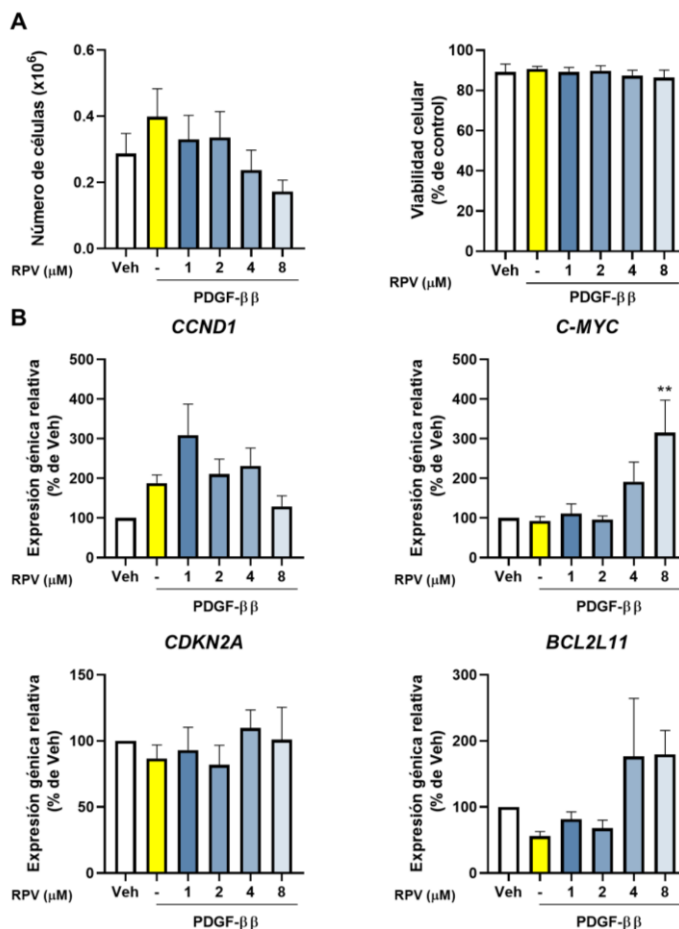


Figura IV.B.1. Efecto de RPV en la proliferación estimulada por PDGF- β en hHSC.

Las células se trataron con Veh, PDGF- β (10 ng/mL), o PDGF- β + RPV (1-8 μ M) durante 48 h. **A**) Los datos del número de células (recuento celular) y viabilidad celular ($n=5$) se representaron como media \pm SEM. En el caso de la viabilidad celular, los datos se relativizaron a los del control (células sin tratar), que se consideró como 100 %. **B**) Expresión génica relativa de *CDKN2A*, *C-MYC*, *BCL2L11* y *CCND1*, analizada mediante RT-qPCR. Los resultados (media \pm SEM; $n=4-5$) se normalizaron considerando la expresión del gen de referencia *ACTB* y se representaron como expresión relativa respecto a la observada en las células tratadas con vehículo, que se consideró el 100 %. Para el análisis estadístico, se realizó el test ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni para el tratamiento del fármaco respecto a PDGF- β (** $p<0,01$).

IV.B.2. EFECTO EN MARCADORES DE FIBROGÉNESIS Y METABÓLICOS

Para evaluar el potencial antifibrogénico de RPV en HSC expuestas a PDGF- β , se examinó la expresión de varios genes clave en la fibrosis hepática. Aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas, RPV indujo una disminución en la expresión de *PDGFR β* y *COL1 α 1* en las concentraciones de 2-8 μ M. Asimismo, RPV disminuyó la expresión de *ACTA2* en todas las concentraciones del fármaco, mientras que la expresión de *TGF- β* no mostró grandes cambios con ninguna de las condiciones experimentales. En cuanto a *PPARG* (un receptor nuclear crucial en el mantenimiento del fenotipo quiescente de las HSC), RPV aumentó su expresión en las concentraciones más altas, alcanzando la significancia estadística a 4 μ M. Cabe mencionar que en ninguno de los genes analizados se mostraron cambios con PDGF- β , lo que se puede atribuir a la variabilidad y grado de activación en el estado basal de las diferentes réplicas biológicas de hHSC durante el cultivo celular (Figura IV.B.2).

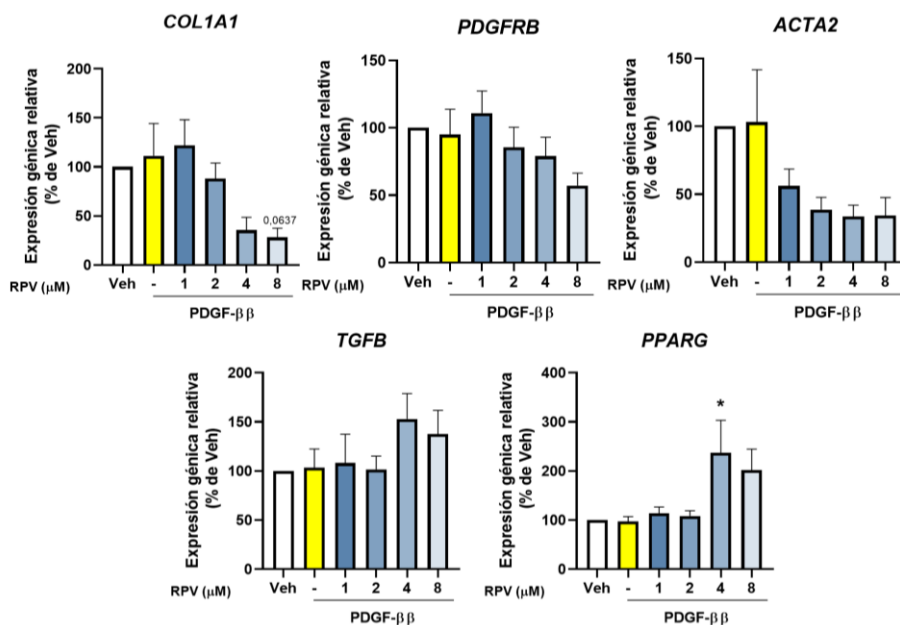
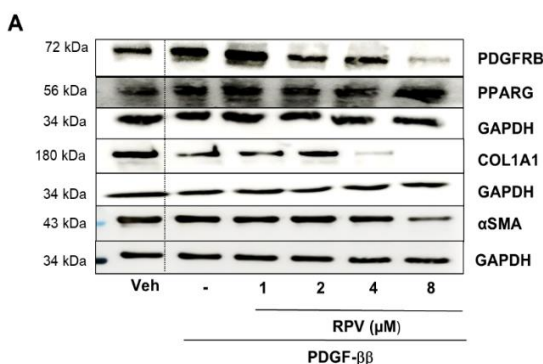


Figura IV.B.2. (Página anterior) Efecto de RPV en la expresión génica de marcadores de fibrogénesis y metabólicos en células hHSC activadas por PDGF-ββ. Las células se trataron con Veh, PDGF-ββ (10 ng/mL), o PDGF-ββ + RPV (1-8 μM) durante 48 h. Se muestra la expresión génica relativa de *COL1A1*, *PDGFRB*, *ACTA2*, *TGFB* y *PPARG* analizada mediante RT-qPCR. Los resultados (representados como media ± SEM; $n=4-5$) fueron normalizados considerando la expresión del gen de referencia *ACTB* y representados como expresión relativa respecto a la observada en las células tratadas con vehículo, que se consideró el 100 %. Para el análisis estadístico, se realizó el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para el tratamiento del fármaco respecto a PDGF-ββ (* $p<0,05$).

Para complementar los análisis de expresión génica, se evaluó la expresión de varias proteínas clave en la activación de las HSC. El cotratamiento con RPV durante 48 h en hHSC estimuladas con PDGF-ββ disminuyó los niveles de COL1A1 a las concentraciones de 2, 4 y 8 μM de manera concentración-dependiente. En la misma línea, la expresión de PDGFRB disminuyó con las concentraciones de 4 μM y, más notablemente, 8 μM. En cuanto a PPARG, al igual que se observó a nivel génico, RPV indujo un aumento en su expresión con la concentración más (8 μM), mientras que la expresión de αSMA no se vio modificada en ninguna de las condiciones experimentales, a excepción de una ligera disminución con el tratamiento de RPV 8 μM. Tal y como ocurría en el análisis de expresión génica, la exposición a PDGF-ββ no modificó la expresión proteica de estos marcadores, salvo PPARG, donde se observó un notable aumento. En conjunto, RPV mostró un claro efecto antifibrogénico en las HSC, tanto a nivel de expresión génica como proteica, (Figura IV.B.3).



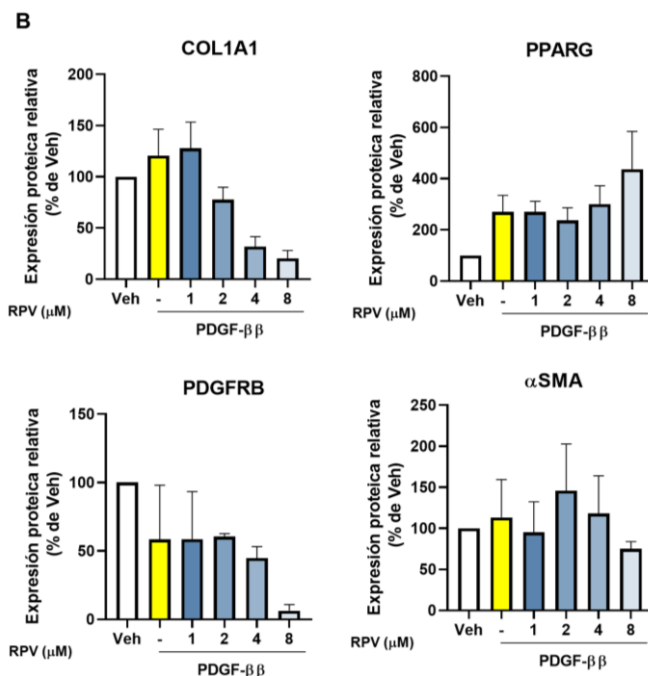


Figura IV.B.3. Efecto de RPV en la expresión proteica de marcadores de activación fibrogénica y metabólicos en células hHSC activadas por PDGF-ββ. Las células se trataron con Veh, PDGF-ββ (10 ng/mL), o PDGF-ββ+RPV (1-8 μM) durante 48 h. **A)** Imágenes representativas de WB para PDGFRB, PPARG, COL1A1 y αSMA. **B)** Cuantificación de la expresión de proteínas mediante análisis densitométrico de las imágenes de WB. Los resultados (media ± SEM; $n=3-5$) fueron normalizados frente a la expresión de GAPDH y representados como expresión relativa respecto a la observada en las células tratadas con vehículo, que se consideró el 100 %. Para el análisis estadístico, se realizó el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni en el caso del tratamiento del fármaco respecto a PDGF-ββ.

IV.B.3. EFECTO EN LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE MAPK

Dado que la vía de señalización de MAPK juega un papel crucial en la respuesta de las HSC a la estimulación con PDGF-ββ, y considerando que RPV modula la actividad de estas células, se decidió investigar el impacto de este fármaco en la cascada de señalización de MAPK y en la fosforilación de Akt, otra proteína efectora de este factor de crecimiento. En el análisis de expresión proteica se observó un aumento notable en la fosforilación de Akt, JNK1/2 y ERK1/2 en las HSC expuestas a PDGF-ββ. Cuando las células se

cotrataron con RPV, se observó una tendencia a disminuir la fosforilación de Akt inducida por PDGF-β de manera dependiente de la concentración. En el caso de pJNK1/2, RPV indujo una disminución con la concentración más alta (8 μM), mientras no indujo cambios en pp38 ni afectó a la fosforilación de ERK1/2 inducida por PDGF-β (Figura IV.B.4).

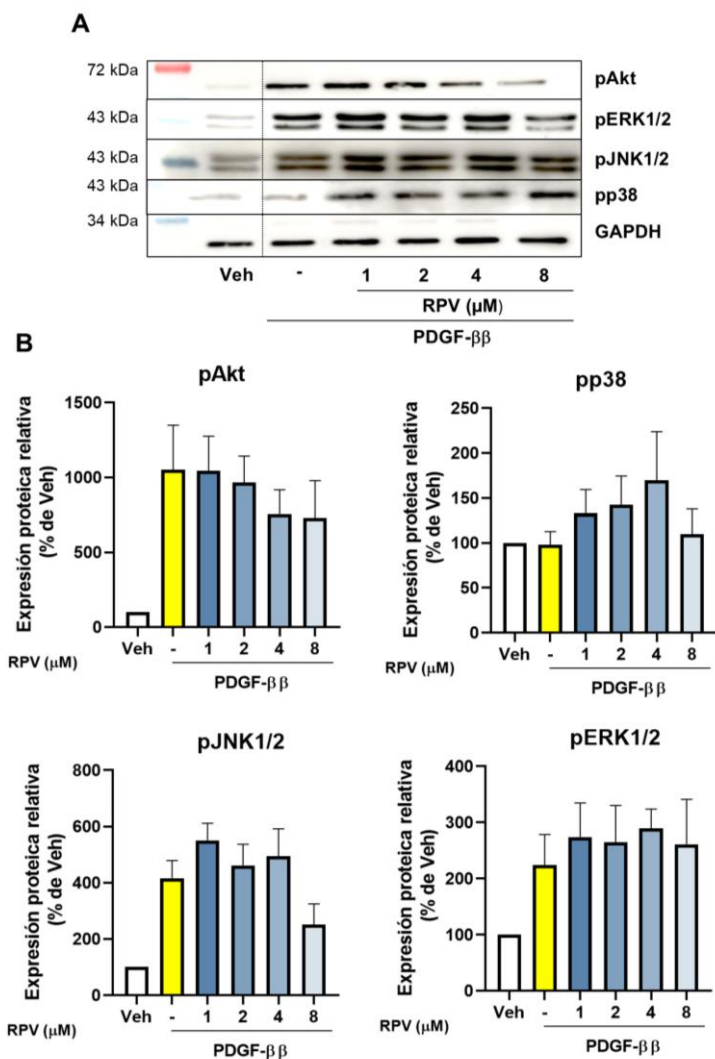


Figura IV.B.4. (Página anterior) Efecto de RPV en la expresión de proteínas clave en la vía de señalización de las MAPK. Las hHSC se trataron con Veh, PDGF- $\beta\beta$ (10 ng/mL), o PDGF- $\beta\beta$ + RPV (1-8 μ M) durante 48 h. **A)** Imágenes representativas de WB para pAkt, pERK1/2, pJNK1/2 y pp38. **B)** Cuantificación de la expresión de proteínas mediante análisis densitométrico de las imágenes de WB. Los resultados (representados como media \pm SEM; $n=5$) fueron normalizados frente a la expresión de GAPDH y representados como expresión relativa respecto a la observada en las células tratadas con vehículo, que se consideró el 100 %. Para el análisis estadístico, se realizó el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para el tratamiento del fármaco respecto a PDGF- $\beta\beta$.

V.B.4. EFECTO EN LA MIGRACIÓN CELULAR

La ruta de señalización MAPK juega un papel fundamental en la migración celular, un proceso clave en la activación de las HSC. Considerando que RPV parecía modular esta ruta, se decidió investigar el efecto del fármaco en la capacidad migratoria de HSC en respuesta a PDGF- $\beta\beta$. Para ello, se realizaron dos ensayos *in vitro*: un ensayo de quimiotaxis y un ensayo de cierre de herida. En el ensayo de quimiotaxis, el tratamiento con PDGF- $\beta\beta$ durante 48 h aumentó notablemente la respuesta migratoria, observándose un mayor número de células en la cámara inferior. Sin embargo, el cotratamiento con RPV contrarrestó este efecto de manera concentración dependiente, estableciendo una clara diferencia con las células tratadas con vehículo en presencia de PDGF- $\beta\beta$. Contrariamente, sin el tratamiento con PDGF- $\beta\beta$, no se observaron cambios en la migración de las HSC con las dos concentraciones de RPV empleadas (Figura IV.B.5 A, B).

Por otro lado, en el ensayo de cierre de herida, aunque no se observaron diferencias significativas con o sin el tratamiento con PDGF- $\beta\beta$ al final del experimento (48 h), sí se apreció un cierre más acelerado a las 24 h en presencia de este estímulo. En línea con los resultados del ensayo de quimiotaxis, el tratamiento conjunto con RPV, con las dos concentraciones empleadas (2 y 4 μ M), tendió a disminuir el cierre de la herida en todos los tiempos estudiados, siendo este efecto más pronunciado a las 24 y 48 h (Figura IV.B.5 C, D).

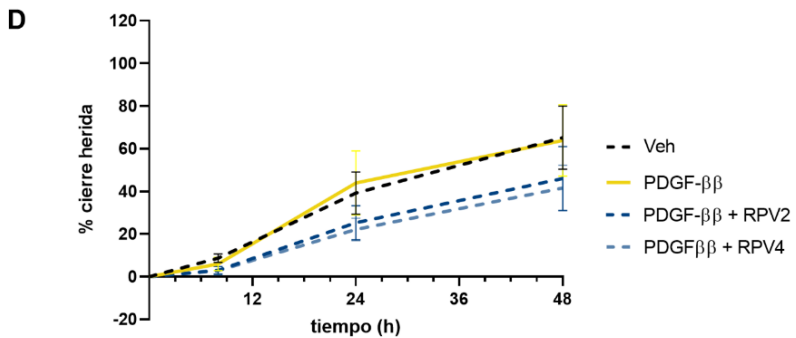
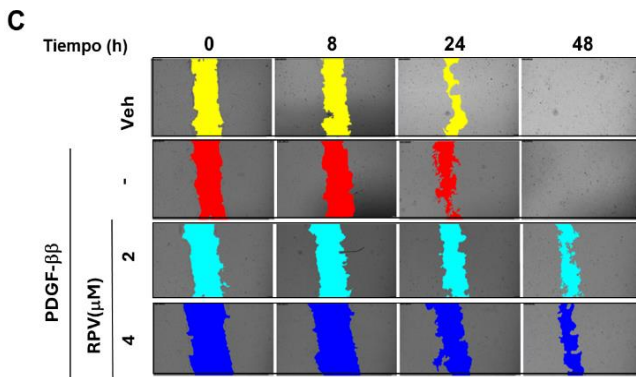
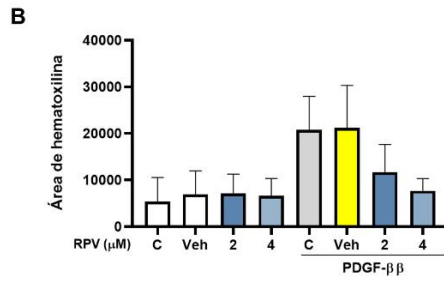
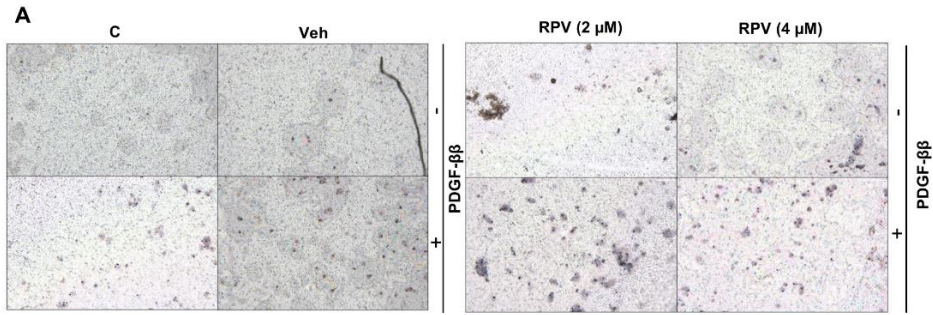


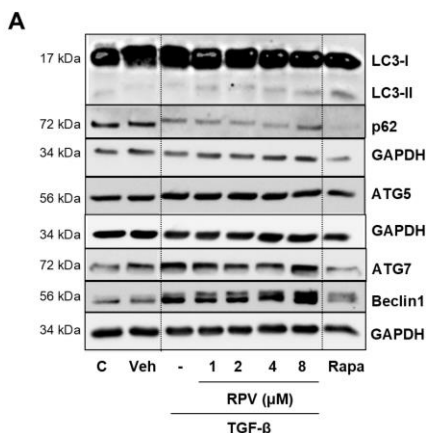
Figura IV.B.5. (Página anterior) Efecto de RPV en la migración inducida por PDGF-ββ en HSC. Las células hHSC se trataron con RPV (2 y 4 μM), RPV (2 y 4 μM) + PDGF-ββ (10 ng/mL) o PDGF-ββ (10 ng/mL) durante 48 h. Posteriormente, 30.000 de cada condición se incubaron en el compartimento superior de cámara de Boyden en presencia de PDGF-ββ (10 ng/mL) en el compartimento inferior durante 6 h. **A)** Visualización microscópica de las membranas. **B)** Representación del área de hematoxilina en los diferentes tratamientos. La cuantificación se realizó con Image J. Los datos (media ± SEM, $n=4$) se expresan como el área de hematoxilina calculada. Para el análisis estadístico se realizó un test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para el tratamiento de RPV (con y sin PDGF-ββ) respecto a cada vehículo (con y sin PDGF-ββ), y un test t de Student para el control sin PDGF-ββ frente a control con PDGF-ββ. **C)** Imágenes capturadas del ensayo de cierre de la herida en LX-2 tratadas con PDGF-ββ (10 ng/mL) o PDGF-ββ (10 ng/mL) + RPV (2 o 4 μM). Las imágenes se capturaron en diferentes puntos temporales (0, 8, 24 y 48 h). **D)** Cuantificación de las imágenes del cierre de la herida. Los datos se presentan como la media ± SEM ($n=4$) y se expresan como % de cierre, considerando 0 % el tiempo 0 h para cada condición. Para el análisis estadístico, se realizó de manera independiente para cada punto temporal un test ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni en el caso del tratamiento del fármaco respecto PDGF-ββ y un test t de Student en el caso del estímulo respecto al vehículo.

SECCIÓN C. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RILPIVIRINA EN LA AUTOFAGIA EN HSC ACTIVADAS POR TGF- β

Considerando que la autofagia juega un papel fundamental en la transdiferenciación de las HSC, esta sección se centró en evaluar el impacto específico de RPV sobre este proceso en HSC estimuladas con TGF- β .

IV.C.1. EFECTO EN LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE MARCADORES AUTOFÁGICOS

En primer lugar, se evaluó la expresión proteica de varios marcadores clásicos de la autofagia: LC3, Beclin1, ATG5, ATG7 y p62. Tras 24 h de tratamiento con TGF- β , se observó un ligero aumento en todos los marcadores, siendo más evidente en ATG5 y Beclin1 (Fig. IV.C.1 A, B). Cuando las células se cotrataron con RPV, se potenció aún más este efecto en la relación LC3II/I y Beclin1 (con RPV 8 μ M), se observó una disminución moderada en la expresión de p62 (indicativo de incremento de autofagia) en las concentraciones de 1, 4 y 8 μ M, y una disminución de ATG5 en la concentración de 4 μ M. En cuanto al control positivo (rapamicina) en relación con el vehículo, se observó un aumento en la expresión de LC3-II y ATG5, y una disminución en p62 y ATG7 (Figura IV.C.1).



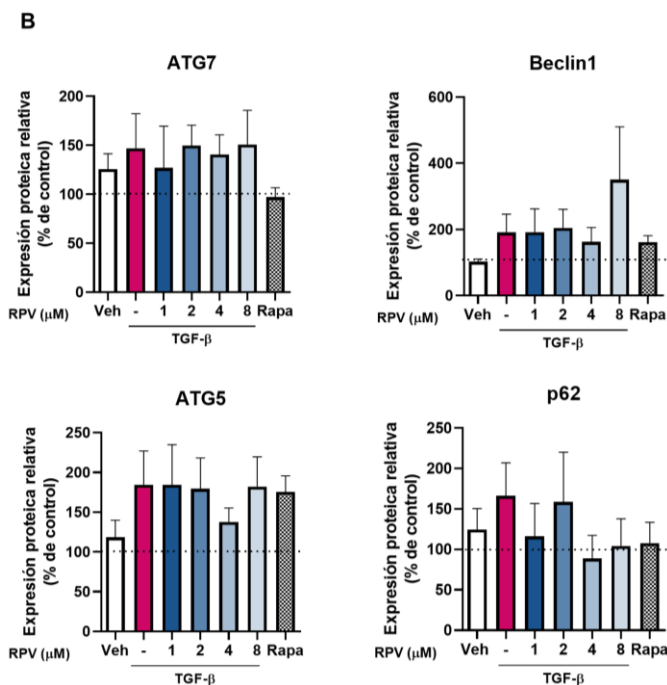


Figura IV.C.1. Análisis del efecto de RPV sobre la expresión proteica de marcadores autofágicos en células LX-2 tratadas 24 h. Las células se trataron (24 h) con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) o TGF- β + RPV (1, 2, 4 y 8 μ M). **A)** Imágenes representativas de WB para LC3, p62, ATG5, ATG7 y Beclin1. **B)** Cuantificación de las imágenes de WB por densitometría. La expresión de cada proteína se normalizó respecto a la de expresión de GAPDH. Los datos representan la media \pm SEM ($n=3-6$) y se expresan en relación con los de las células no tratadas (control) en cada experimento, que se consideraron el 100 %. El análisis estadístico se realizó con el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF- β frente a TGF- β , y con la prueba t de Student para TGF- β frente a Veh o rapamicina frente a Veh.

En el tratamiento a 48 h, la expresión de ATG5 y Beclin1 tendió a normalizarse en las células expuestas únicamente a TGF- β (Figura IV.C.2), mientras que se observó un aumento en la relación LC3II/LC3I y una disminución en p62, ambos efectos indicando un incremento en la autofagia. Al igual que a 24 h, el cotratamiento con RPV potenció la disminución de los niveles de p62, mientras que ATG5 y ATG7 no mostraron cambios notables con RPV, salvo una disminución de la última a 8 μ M. El control positivo indujo

los cambios esperados, disminuyendo significativamente p62 y aumentando ATG7 y LC3-II, aunque no se observaron cambios significativos en ATG5.

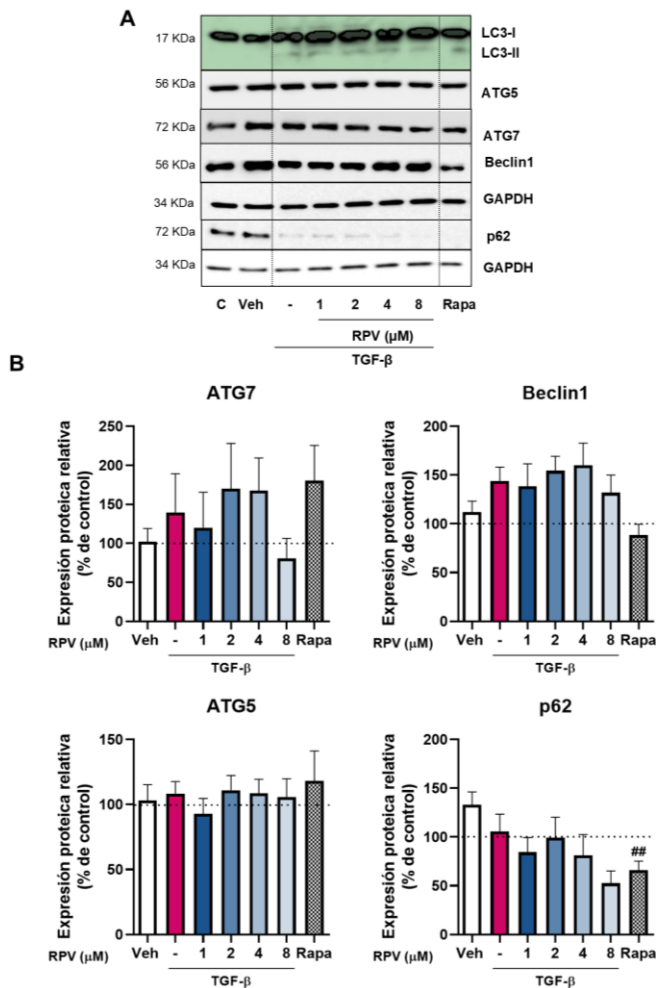


Figura IV.C.2. Análisis del efecto de RPV sobre la expresión proteica de marcadores autofágicos en células LX-2 tratadas 48 h. Las células se trataron (48 h) con Veh, TGF-β (2,5 ng/mL) o TGF-β + RPV (1, 2, 4 y 8 μM). **A)** Imágenes representativas de WB para LC3, p62, ATG5, ATG7 y Beclin1. **B)** Cuantificación de las imágenes de WB por densitometría. La expresión de cada proteína se normalizó respecto a la de GAPDH. Los datos representan la media ± SEM (n=3–6), y se expresan en relación con los de las células no tratadas (control) en cada experimento, que se consideraron el 100 %. El análisis estadístico se realizó con el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF-β frente a TGF-β, y con la prueba t de Student para TGF-β frente a Veh o rapamicina frente a Veh (## p<0,01).

Para determinar si la disminución en los niveles proteicos de p62 observada con RPV se debía a cambios en la cantidad de su ARNm, se analizó la expresión génica de *SQSTM1* por RT-qPCR tras el tratamiento de 24 y 48 h (Figura IV.C.3). Los resultados mostraron que TGF- β disminuyó significativamente los niveles de ARNm a las 48 h mientras que el cotratamiento con RPV no modificó la expresión de *SQSTM1* en ninguno de los tiempos estudiados. Este resultado sugiere que el efecto de RPV sobre p62 se produce a nivel postraduccional, probablemente a través del aumento de la degradación autofágica de p62, y no por una alteración en la transcripción del gen. Por último, a diferencia de lo observado a nivel de expresión proteica, el control positivo mostró, a las 24 h, un aumento en la expresión de *SQSTM1* respecto al vehículo.

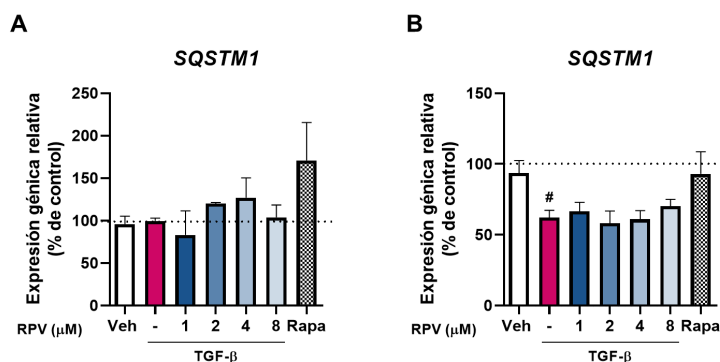


Figura IV.C.3. Análisis del efecto de RPV sobre la expresión génica de *SQSTM1*.

Las células LX-2 se trataron con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) o TGF- β + RPV (1, 2, 4 y 8 μ M) durante 24 o 48 h. Se muestra la expresión génica relativa de *SQSTM1* a las 24 h (A) o 48 h (B), que se analizó mediante RT-qPCR. Los resultados (representados como media \pm SEM; $n=4-5$) fueron normalizados considerando la expresión del gen de referencia *ACTB* y representados como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control), que se consideró el 100 %. El análisis estadístico se llevó a cabo con el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF- β frente a TGF- β , y con la prueba t de Student para TGF- β frente a Veh, o rapamicina frente a Veh (# $p<0,05$).

IV.C.2. EFECTO EN LA FORMACIÓN DE LISOSOMAS Y ESTRUCTURAS AUTOFÁGICAS

Dado que el aumento de la autofagia conlleva un incremento en el contenido lisosomal, se analizó este parámetro mediante microscopía de células vivas utilizando el fluorocromo LysoTracker Red (Figura IV.C.4 A). Como era de esperar, el tratamiento con TGF- β indujo un incremento significativo en la señal lisosomal, lo que sugiere una mayor actividad autofágica. Este efecto se vio potenciado aún más por el cotratamiento con RPV, mostrando un aumento significativo en todas las concentraciones del fármaco empleadas. Para confirmar el aumento de la actividad autofágica inducido por RPV, se analizó el contenido de autofagosomas mediante la tinción con Cyto-ID, una técnica que permite visualizar específicamente estas vacuolas en células vivas (Figura IV.C.4 B). En concordancia con el incremento del contenido lisosomal observado previamente, el tratamiento con TGF- β durante 48 h indujo un aumento en la señal fluorescente emitida por las vacuolas autofágicas, confirmando la activación de la autofagia por este estímulo. Este efecto se vio potenciado por el cotratamiento con RPV de manera dependiente de la concentración, siendo particularmente evidente en las concentraciones de 4 y 8 μ M.

Por último, con el objetivo de descartar que el aumento de la autofagia inducido por RPV fuera un artefacto del proceso de immortalización durante la generación de la línea celular LX-2, se replicó el experimento en hHSC, obteniendo resultados similares (Figura IV.C.4 C). Se observó un aumento significativo de la señal con TGF- β , que fue potenciado con el cotratamiento con RPV, especialmente en las concentraciones de 1 y 8 μ M. El control positivo mostró un aumento significativo en la señal respecto al vehículo en los 3 parámetros evaluados.

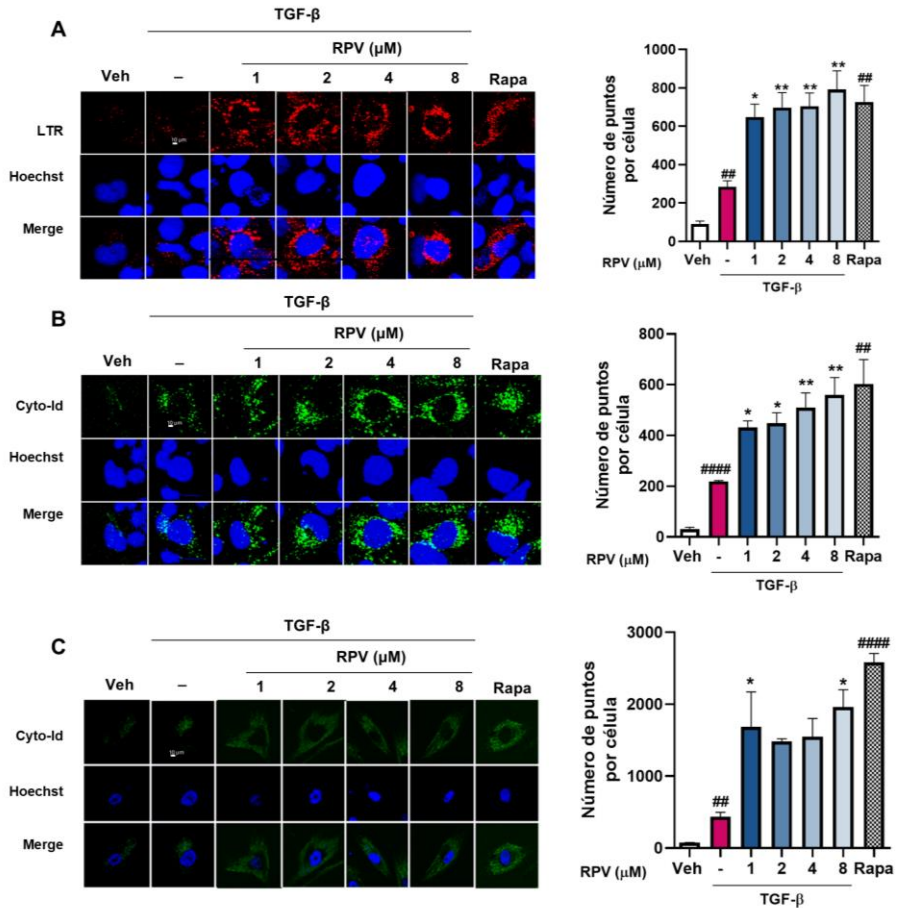


Figura IV.C.4. Análisis del efecto de RPV en la acumulación de lisosomas y estructuras autofágicas en HSC activadas por TGF-β. Las células LX-2 /hHSC se trataron con Veh, TGF-β (2,5 ng/mL) o TGF-β y RPV (1, 2, 4 y 8 μM) 48 h. **A)** Las células LX-2 se tiñeron con LysoTracker (LTR, lisosomas) y Hoechst (núcleos), y se tomaron imágenes de fluorescencia de células vivas con un microscopio confocal. Se muestran imágenes representativas y la cuantificación de la señal de LTR. **B)** Las células LX-2 se tiñeron con Cyto-Id (estructuras autofágicas) y Hoechst (núcleos), y se tomaron imágenes de fluorescencia de células vivas con un microscopio confocal. Se muestran imágenes representativas y la cuantificación de la señal de Cyto-Id. **C)** Imágenes representativas de Cyto-Id y Hoechst y cuantificación de la señal de Cyto-Id en hHSC. Todas las imágenes se analizaron con CellProfiler para obtener el número de puntos por célula. Los datos representan la media ± SEM (n=3). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF-β frente a TGF-β (* p<0,05 y ** p<0,01), y mediante la prueba t de Student para TGF-β frente a Veh o rapamicina frente a Veh (## p<0,01 y #### p<0,0001).

Para profundizar en el análisis del flujo autofágico, se utilizaron sistemas de monitorización basados en la expresión de proteínas clave del proceso (LC3 y p62), fusionadas a proteínas fluorescentes. En concreto, se empleó un sistema de fluorescencia dual que combina la proteína fluorescente roja mCherry, estable en ambientes ácidos, con la proteína verde GFP, sensible al pH y cuya fluorescencia se extingue en ambientes ácidos como el de los lisosomas. Esta estrategia permite diferenciar entre autofagosomas, (marcados por la presencia de ambas fluorescencias (naranja)) y autolisosomas (identificables por la presencia exclusiva de la señal roja de mCherry debido a la acidificación del interior del lisosoma). El análisis de colocalización de LC3 mostró que, tras 24 h, RPV incrementó el número de autolisosomas (señal roja), especialmente en las concentraciones de 2 y 4 μM . Como era de esperar, el tratamiento con rapamicina también indujo un aumento significativo en la formación de autolisosomas. En línea con estos resultados, el análisis de la proteína p62, también fusionada al sistema de fluorescencia dual mCherry-GFP, mostró un aumento en su señal, tanto en autofagosomas como en autolisosomas (de manera significativa), en las células tratadas con RPV en todas las concentraciones estudiadas. Nuevamente, la rapamicina indujo un aumento significativo en la señal de p62 en la señal roja (autolisosomas). Es importante destacar que, a diferencia de los análisis previos de contenido lisosomal y de autofagosomas, la exposición a TGF- β no produjo cambios significativos en la señal de LC3 y p62 en este experimento (Figura IV.C.5 A, B, C, D).

Por último, para confirmar que el aumento en la formación de autofagosomas inducido por RPV se traduce en un incremento del flujo autofágico, se analizaron los niveles de LC3-II en presencia de cloroquina (CQ), un inhibidor de la fusión lisosoma-autofagosoma. La adición de CQ produjo una acumulación significativa de LC3-II en las células LX-2 activadas con TGF- β tras 48 h de tratamiento conjunto con RPV, en comparación con TGF- β +RPV en ausencia de CQ. Este resultado, consistente con la mayor formación de

vacuolas autofágicas observada previamente, confirma que RPV promueve el flujo autofágico en células HSC tratadas con TGF- β (Figura IV.C.5 E).

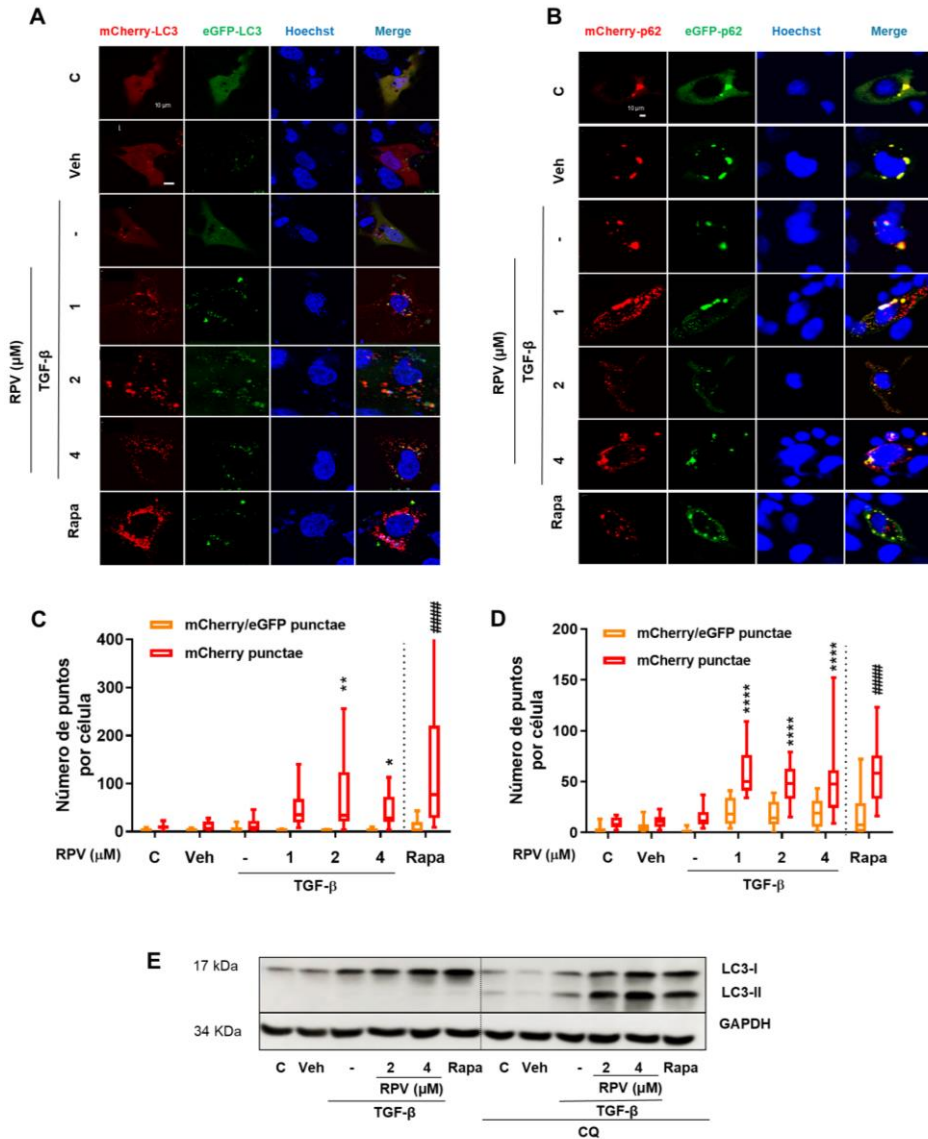


Figura IV.C.5. (Página anterior) Evaluación del efecto de RPV sobre el flujo autofágico en LX-2 tratadas con TGF- β . Las células se trataron con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) o TGF- β + RPV (1, 2 y 4 μ M) durante 24 h. Imágenes representativas de microscopía confocal de células LX-2 que expresan mCherry-eGFP-LC3 **(A)** o mCherry-GFP-p62 **(B)**. Las células se tiñeron con Hoechst para detectar los núcleos. La señal roja indica la presencia de la proteína de interés en estructuras autofágicas tardías (autofagolisosomas) y la señal naranja (fluorescencia roja + verde) indica su presencia en estructuras autofágicas tempranas (autofagosomas). **(C), (D)** Cuantificación de los datos de la señal de fluorescencia (a nivel de célula individual). Las imágenes se analizaron con CellProfiler para detectar señales fluorescentes rojas (diagramas de caja rojos) y verdes, y para relacionar ambas señales fluorescentes (doble positiva roja/verde — diagramas de caja naranjas). Las barras representan la mediana \pm rango intercuartil (IQR, $n=3$); todos los valores se analizaron mediante el test ANOVA de dos vías seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF- β frente a TGF- β (*, ** y **** $p<0,05$, $<0,01$ y $<0,0001$, respectivamente) y test t de Student de para TGF- β frente a Veh o rapamicina frente a Veh (##### $p<0,0001$). **(E)** Análisis del flujo autofágico en células LX-2 tratadas con Veh, TGF- β o TGF- β junto con RPV (2 y 4 μ M) durante 48 h bajo condiciones de autofagia normal o con inhibición de la fusión autofagosoma-lisosoma (cotratamiento con cloroquina (CQ)). Las imágenes de WB de LC3 y GAPDH (como proteína de referencia) son representativas de tres experimentos independientes.

SECCIÓN D. CARACTERIZACIÓN DE LA SINERGIA DE RPV-SV EN HSC EXPUESTAS A TGF- β

Tras observar los efectos de RPV sobre las HSC activadas y considerando los beneficios previamente reportados de SV en el contexto de la fibrosis hepática, este estudio evaluó el potencial efecto de sinergia/potenciación de la combinación de ambos sobre la activación de las HSC.

IV.D.1. EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

En el ensayo de MTT, RPV disminuyó la viabilidad celular a 48 y 72 h, mientras que a 24 h no se observaron cambios. En cuanto a la combinación de SV-RPV, se observó que en todos los tiempos de estudio se potenciaba significativamente el efecto citotóxico de RPV, especialmente después de 48 y 72 h de tratamiento. Por su parte, la administración individual de SV no produjo ningún cambio en la viabilidad celular en ninguno de los tiempos evaluados. Estaurosporina (STS), un control positivo de apoptosis, disminuyó la viabilidad celular en los tres tiempos evaluados (Figura IV.D.1).

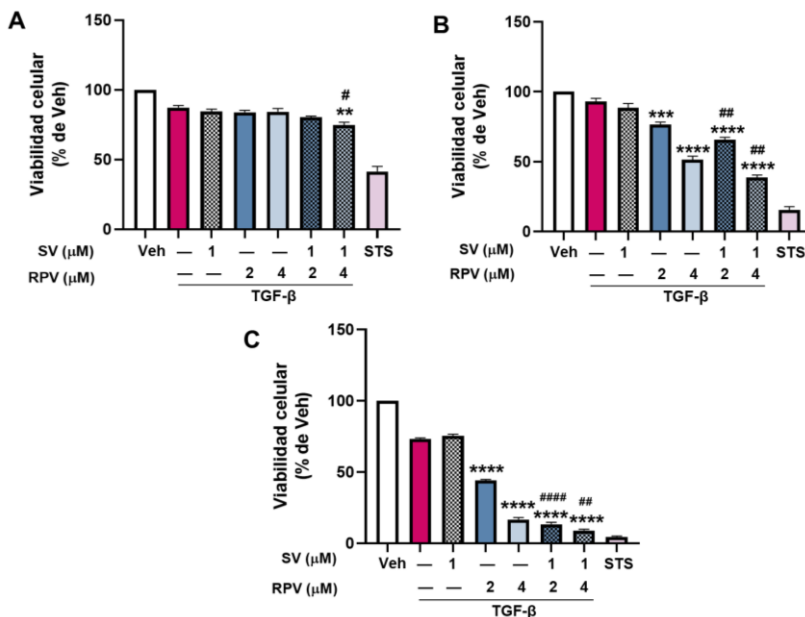
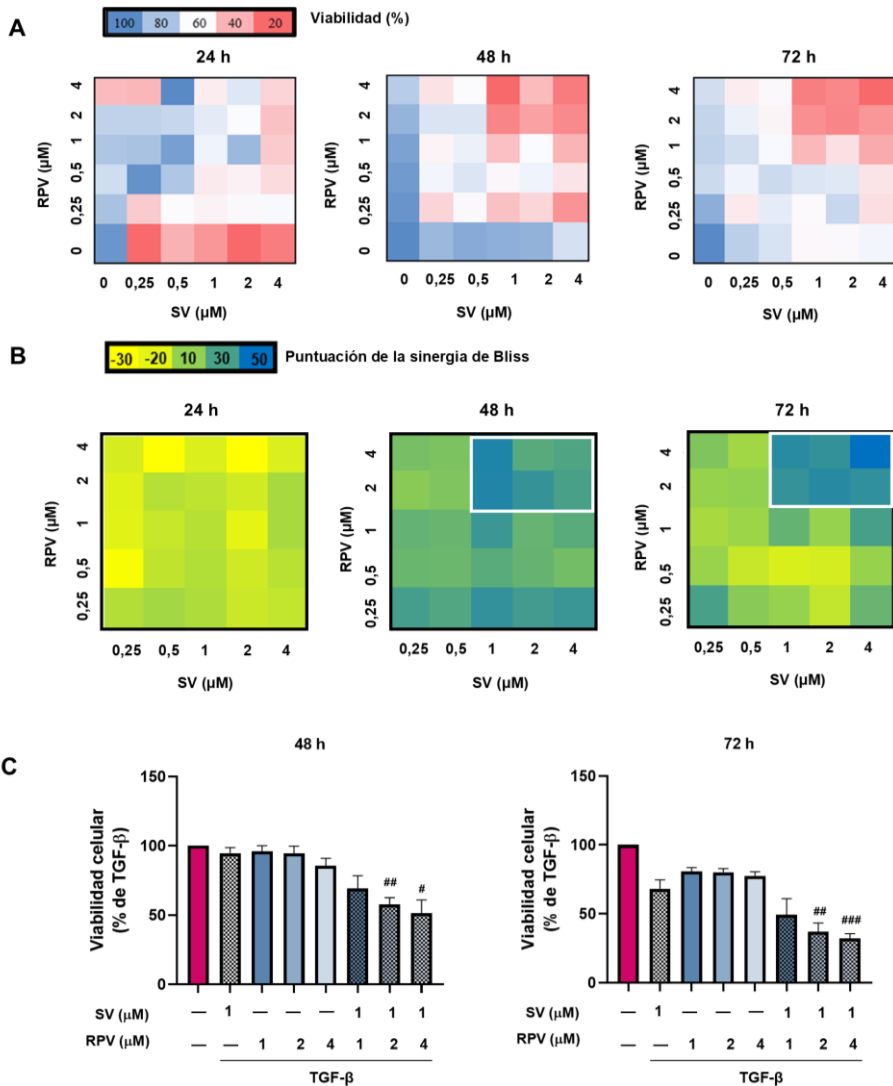


Figura IV.D.1. (Página anterior) Análisis del efecto de la combinación de RPV y SV en la viabilidad celular mediante MTT. Las células LX-2 se estimularon con TGF- β (2,5 ng/mL) y se trataron con SV (1 μ M), RPV (2 y 4 μ M) o la combinación de ambos fármacos durante 24 (A) 48 (B) o 72 h (C). Se representan los datos de la viabilidad celular analizada mediante el ensayo de MTT. Los datos (media \pm SEM ($n=5$)) se relativizaron respecto a los del Veh, que se consideró el 100 %. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para SV + TGF- β , RPV + TGF- β y RPV + SV + TGF- β frente a TGF- β (** $p<0,01$, *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$) y con la prueba t de Student para RPV + TGF- β + SV frente a RPV + TGF- β (# $p<0,05$, ## $p<0,01$ y #### $p<0,0001$).

Adicionalmente, se realizó un ensayo de matriz de concentración de 6 x 6 para evaluar cualquier actividad sinérgica en la viabilidad celular medida por el ensayo de fosfatasa ácida entre SV y RPV después de tratamientos de 24, 48 y 72 h. Tras la incubación con concentraciones crecientes de SV en combinación con concentraciones crecientes de RPV, los datos de supervivencia celular se analizaron mediante el análisis de Bliss para evaluar las interacciones entre los dos fármacos (Fig. IV.D.2 A). Este análisis se basa en la idea de que, si dos fármacos actúan de forma independiente, el efecto combinado debería ser igual a la suma de los efectos individuales. Por el contrario, si el efecto combinado es mayor que la suma de los efectos individuales, se considera que existe una interacción sinérgica (217). Se observó que la combinación de los dos fármacos durante 48 y 72 h ejerció una actividad sinérgica en todas las concentraciones, mientras que los tratamientos de 24 h no mostraron sinergia en ninguna de las concentraciones probadas. De manera similar, se observaron puntuaciones de Bliss altas a 48 y 72 h con el tratamiento de RPV (1-4 μ M) en combinación con SV (1-4 μ M) (Fig. IV.D.2 B - cuadro blanco). Por otro lado, el análisis cuantitativo del ensayo de la fosfatasa ácida mostró que la combinación de RPV y SV, tras 48 y 72 h de tratamiento, disminuyó significativamente la viabilidad celular en comparación con RPV o SV administrados individualmente (Figura IV.D.2 C). En este ensayo, a diferencia del realizado mediante MTT, SV mostró una disminución notable de la viabilidad celular a las 72 h de tratamiento, mientras que RPV no mostró una reducción de la

viabilidad ni a 48 ni a 72 h. Finalmente, esta actividad sinérgica observada en LX-2 se confirmó analizando los efectos de SV y RPV en la viabilidad de hHSC (Figura IV.D.2 D), donde se detectó una clara reducción de este parámetro en las células tratadas con la combinación de ambos fármacos. Contrariamente, no se obtuvieron diferencias apreciables cuando los fármacos se administraron de manera individual.



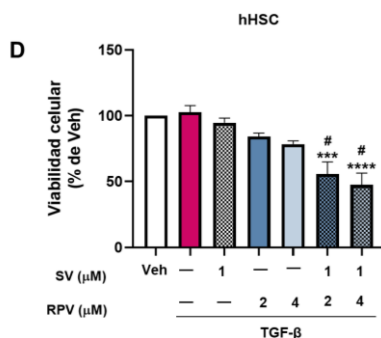
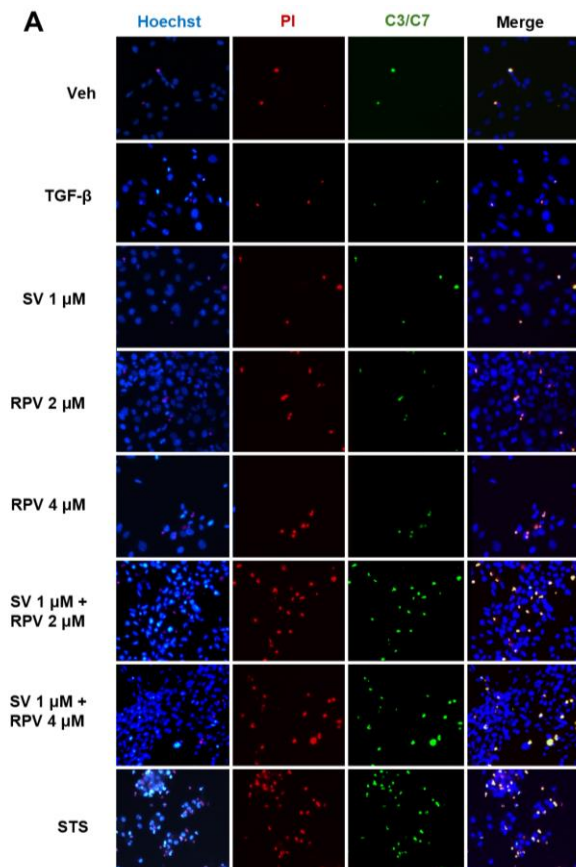


Figura IV.D.2. Análisis del efecto de la combinación de RPV y SV en la viabilidad celular mediante el ensayo de fosfatasa ácida. Las HSC (LX-2 o hHSC) se estimularon con TGF- β (2,5 ng/mL) y se trataron con SV (1 μ M), RPV (1,2,4 μ M) o la combinación de ambos fármacos durante 24, 48 o 72 h. Se realizó un ensayo de matriz de concentración de 6×6 en células LX-2. La viabilidad celular se evaluó después de 24, 48 y 72 h de tratamiento mediante un ensayo de fosfatasa ácida. Los experimentos se realizaron por triplicado (2 pocillos por repetición). **A)** Mapa de calor de los valores de viabilidad, normalizados con respecto a TGF- β (solo) para RPV en combinación con SV después de cada punto temporal. **B)** Las puntuaciones de sinergia de Bliss se calcularon utilizando SynergyFinder para cada punto temporal y se representaron como un mapa de calor. Una puntuación de sinergia superior a 10 indica que es probable que la interacción entre los dos fármacos sea sinérgica. Las casillas blancas representan el área del mapa de calor con la puntuación de sinergia más alta. **C)** Valores de viabilidad celular extrapolados de la matriz para las puntuaciones de sinergia más altas entre RPV y SV después de 48 y 72 h. **D)** Efecto sobre la viabilidad celular en hHSC. Los datos representan la media \pm SEM ($n=3$) y se expresan en relación con los de las células tratadas con TGF- β (para LX-2) o Veh (para hHSC) en cada experimento, que se consideró el 100 %. El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF- β , SV + TGF- β y RPV + SV + TGF- β frente a TGF- β (** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$) (para las hHSC) y con la prueba t de Student para RPV + TGF- β + SV frente a RPV + TGF- β (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$) para LX-2 y hHSC.

IV.D.2. EFECTO EN LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

Para determinar si la reducción en la viabilidad celular observada previamente estaba relacionada con la inducción de apoptosis, se analizó la activación de caspasas 3/7 mediante el reactivo CellEvent™ Caspase-3/7 Green ReadyProbes™ y microscopía de fluorescencia. Este ensayo detecta la actividad de las caspasas 3/7 (C3/C7) (enzimas efectoras clave en la apoptosis) mediante una sonda fluorescente que se activa al ser escindida por ellas. Adicionalmente, se empleó yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés) para identificar células con membrana plasmática permeabilizada,

un indicador general de muerte celular. Los resultados revelaron un aumento significativo y dependiente de la concentración de RPV en el número de células positivas para la actividad de caspasas 3/7 tras el tratamiento combinado de SV y RPV. Sin embargo, los tratamientos individuales no indujeron cambios notables en la actividad de estas caspasas (Figura IV.D.3). En cuanto a la tinción con PI, se detectó únicamente un ligero aumento sin significancia estadística en la cantidad de células positivas tras la combinación de los dos fármacos. Por último, el control positivo de apoptosis empleado, estaurosporina (STS), indujo, en ambos marcadores, un aumento significativo respecto al vehículo.



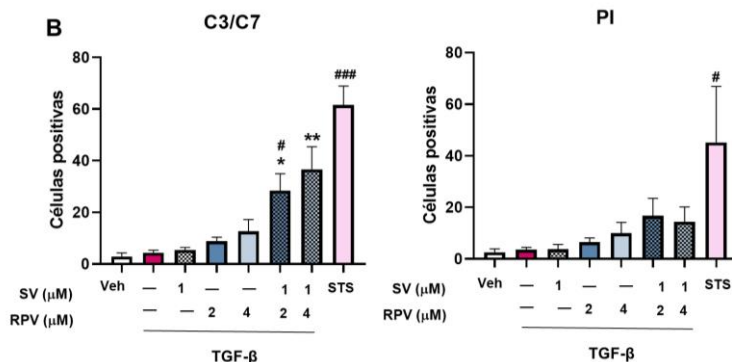


Figura IV.D.3. Efecto de la combinación de RPV y SV en la actividad de las caspasas 3/7 en células LX-2. Las células se estimularon con TGF- β (2,5 ng/mL) y se trataron con RPV (2 y 4 μ M), SV (1 μ M) o la combinación de ambos fármacos durante 48 h. **A)** Imágenes representativas de la tinción doble con CellEvent Caspase-3/7 (verde) y yoduro de propidio (PI, rojo). **B)** Cuantificación automatizada de células positivas para CellEvent y PI a partir de imágenes teñidas. Los datos representan la media \pm SEM ($n=3$). El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF- β , SV + TGF- β y RPV + SV + TGF- β frente a TGF- β (* $p<0,05$ y ** $p<0,01$) y con la prueba t de Student para RPV + TGF- β + SV frente a RPV + TGF- β , o TGF- β frente a Veh (# $p<0,05$ y ### $p<0,001$).

IV.D.3. EFECTO EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE FIBROGÉNESIS

Con el objetivo de determinar si la combinación de RPV y SV potenciaba el efecto antifibrogénico de RPV, se analizó el impacto de ambos compuestos sobre la expresión génica de marcadores de fibrogénesis en células activadas por TGF- β . Tras 48 h de tratamiento, únicamente la expresión de *SERPINE1* mostró un aumento notable en las células estimuladas con TGF- β . El cotratamiento con RPV disminuyó la expresión de *PDGFR β* de manera dependiente de la concentración, alcanzando significancia estadística a 4 μ M. Si bien SV por sí solo no afectó la expresión de este gen, su combinación con RPV (4 μ M) potenció, de manera significativa, la disminución de este marcador. De manera similar, RPV, pero no SV, disminuyó significativamente la expresión de *SERPINE1* de forma dependiente de la concentración. La combinación de ambos fármacos también potenció la disminución observada

con RPV 2 μM . En cuanto a los marcadores relacionados con la ECM (*TIMP1* y *MMP-2*), no se observaron cambios en la expresión génica en ninguna de las condiciones experimentales empleadas a este tiempo de tratamiento (Figura IV.D.4)

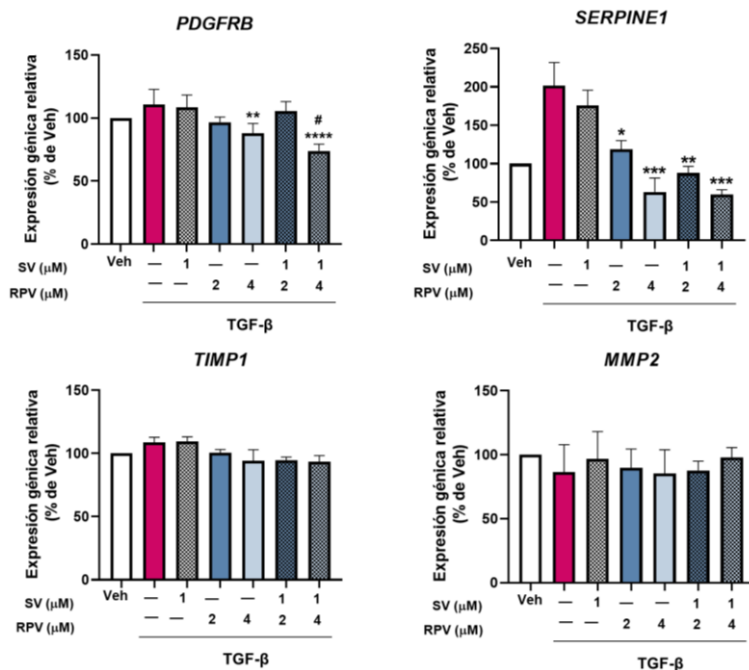


Figura IV.D.4. Efecto de la adición de SV en los efectos reguladores de RPV en mediadores de fibrogénesis en células LX-2 (48 h). Las células se estimularon con TGF- β (2,5 ng/mL) y se trataron con SV (1 μM), RPV (2 y 4 μM), SV + TGF- β + RPV + SV + TGF- β frente a TGF- β (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$) y con el test t de Student para RPV + SV + TGF- β frente a RPV + TGF β (# $p < 0,05$).

Por otro lado, tras 72 h de tratamiento no se detectaron cambios en la expresión de ningún marcador con los tratamientos individuales, y se observó un aumento en la expresión en *MMP2* y una disminución de *TIMP1*

solo en la combinación de SV con la concentración más alta de RPV (Figura IV.D.5). En este tiempo de incubación, todos los marcadores exhibieron una tendencia ligera a aumentar con TGF- β , mientras que *MMP2* disminuyó de manera notable tras la exposición a este estímulo.

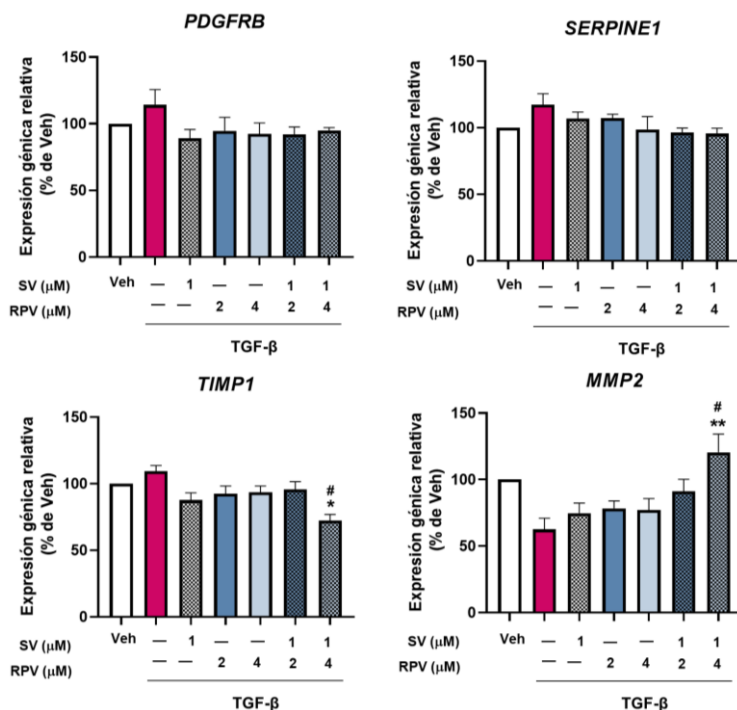


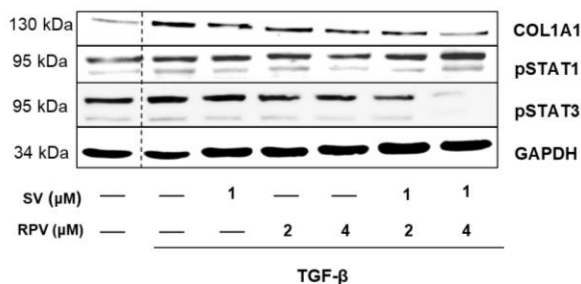
Figura IV.D.5. Efecto de la adición de SV en los efectos reguladores de RPV en mediadores de fibrogénesis en células LX-2 (72 h). Las células se estimularon con TGF- β (2,5 ng/mL) y se trataron con SV (1 μ M), RPV (2 y 4 μ M) o la combinación de ambos fármacos durante 72 h. Expresión génica relativa de marcadores profibróticos (*PDGFR- β* y *SERPINE1*) y mediadores de la ECM (*TIMP1* y *MMP2*) analizados mediante RT-qPCR a 48 h. Los datos fueron normalizados considerando la expresión del gen de referencia *ACTB*. Se representa la media \pm SEM ($n=4-5$) y se expresan en relación con los de las células tratadas con Veh en cada experimento, que se consideró el 100 %. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF- β , SV + TGF- β y RPV + SV + TGF- β frente a TGF- β (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) y con el test t de Student para RPV + SV + TGF- β frente a RPV + TGF- β (# $p < 0,05$).

IV.D.4. MODULACIÓN DE LAS VÍAS STAT3/STAT1 Y LA EXPRESIÓN DE COL1A1

En este estudio se quiso evaluar el papel de la combinación de los fármacos sobre tres parámetros clave en la activación y función de las HSC: pSTAT1 (relacionado con la activación de la apoptosis en este tipo celular), pSTAT3 (efecto profibrótico en HSC) y Col1a1.

Por un lado, el tratamiento con RPV durante 48 h indujo un aumento significativo en la fosforilación de STAT1 a la concentración más alta (4 μM). En línea con los resultados obtenidos en el ensayo de actividad de caspasa 3/7, la combinación con SV aumentó de manera significativa la fosforilación de STAT1 (indicativo de una mayor apoptosis) cuando se trataron las células con ambos fármacos. Por otro lado, la expresión de pSTAT3 y COL1A1 se vio significativamente disminuida por el tratamiento con RPV. Si bien en COL1A1 esta reducción se observó en ambas concentraciones de RPV (2 y 4 μM), en el caso de pSTAT3 solo se evidenció a la concentración más alta (4 μM). Es importante destacar que, a pesar de que SV de manera individual no produjo cambios significativos, su combinación con RPV aumentó significativamente la reducción en la expresión de estas dos proteínas observada solo con RPV (Figura IV.D.6). Estos resultados, en conjunto, evidencian una clara potenciación del efecto antifibrótico de RPV en combinación con SV.

A



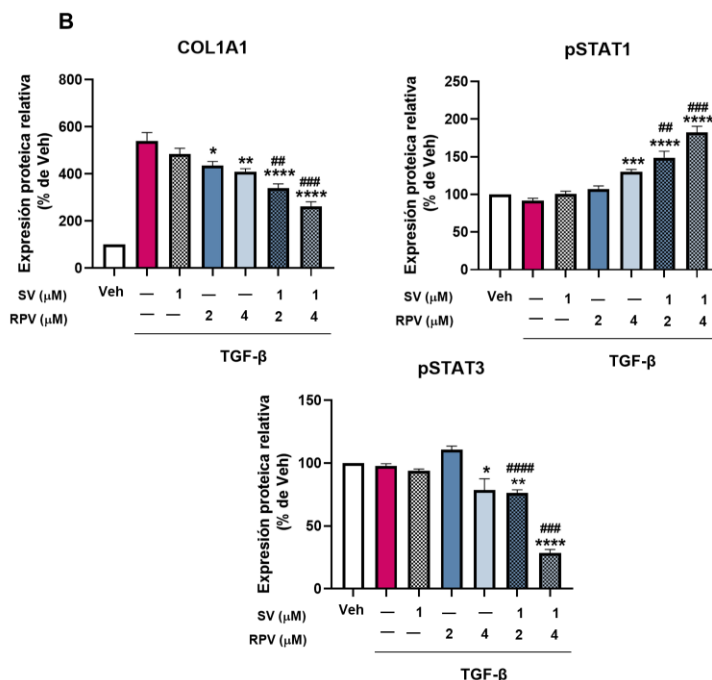


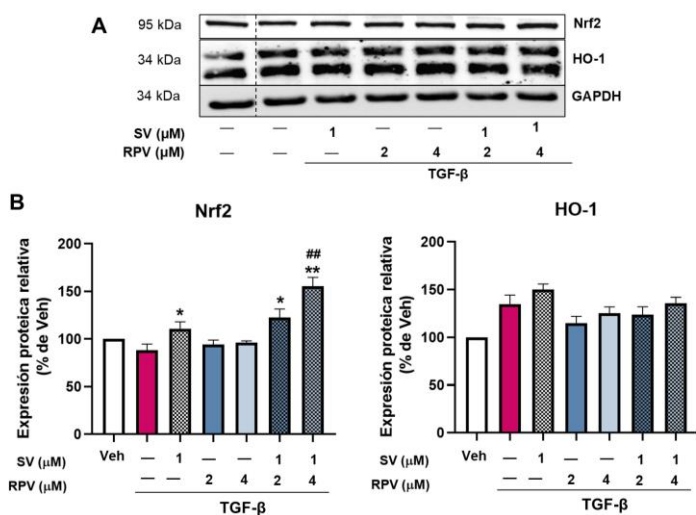
Figura IV.D.6. Efecto del cotratamiento con SV en los efectos reguladores de RPV sobre STAT1/STAT3 y Col1A1 en células LX-2. Las células se estimularon con TGF-β (2,5 ng/mL) y se trataron con SV (1 μM), RPV (2 y 4 μM) o la combinación de ambos fármacos durante 48 h. **A)** Imágenes representativas de WB para COL1A1, pSTAT3 y pSTAT1. **B)** Cuantificación de la expresión de proteínas mediante análisis densitométrico de las imágenes de WB. La expresión se normalizó frente a la expresión de GAPDH. Los datos representan la media ± SEM (n=5) y se expresan en relación con los de las células tratadas con Veh en cada experimento, que se consideró como 100 %. El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF-β, SV + TGF-β y RPV + SV + TGF-β frente a TGF-β (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 y **** p<0,0001) y con el test t de Student para comparar RPV + SV + TGF-β frente a RPV + TGF-β (## p<0,01, ### p<0,001 y #### p<0,0001).

IV.D.5. EFECTO SOBRE LA VÍA NRF2/ARE

Dado que la ruta Nrf2/ARE juega un papel crucial en el mecanismo de acción de SV, se propuso evaluar si RPV ejercía un papel de potenciación en esta vía de señalización. Para ello, se estudió tanto la expresión de Nrf2, como la de dos de sus dianas más relevantes: HO-1 y NQO1. Tal y como se observa en la Figura IV.D.7 A, B, la administración de SV indujo un aumento

significativo en la expresión proteica de Nrf2. Si bien RPV sola no produjo cambios en la expresión de esta proteína, la combinación de los fármacos potenció significativamente el efecto inductor de SV sobre Nrf2, especialmente a la concentración más alta de RPV (4 μM). Por el contrario, la expresión de HO-1 no se vio afectada a nivel de expresión proteica con RPV, SV o la combinación de fármacos.

Por otro lado, el análisis de la expresión génica reveló que, si bien RPV en monoterapia no inducía cambios tras 48 y 72 h de tratamiento, la combinación de RPV y SV sí inducía un aumento significativo en la expresión de *NQO1* en ambos tiempos de tratamiento. En cuanto a *HO1*, únicamente SV indujo un aumento significativo en su expresión, tanto a las 48 h como a las 72 h. Cabe destacar, finalmente, que la exposición a TGF- β durante 48 h provocó una disminución notable en la expresión de ambos genes (*NQO1* y *HO1*), mientras que a las 72 h este efecto solo se mantuvo en *NQO1* (Figura IV.D.7 C, D). Por tanto, los resultados de ambos análisis revelan un papel potenciador de RPV sobre el efecto antioxidante de SV en las HSC activadas.



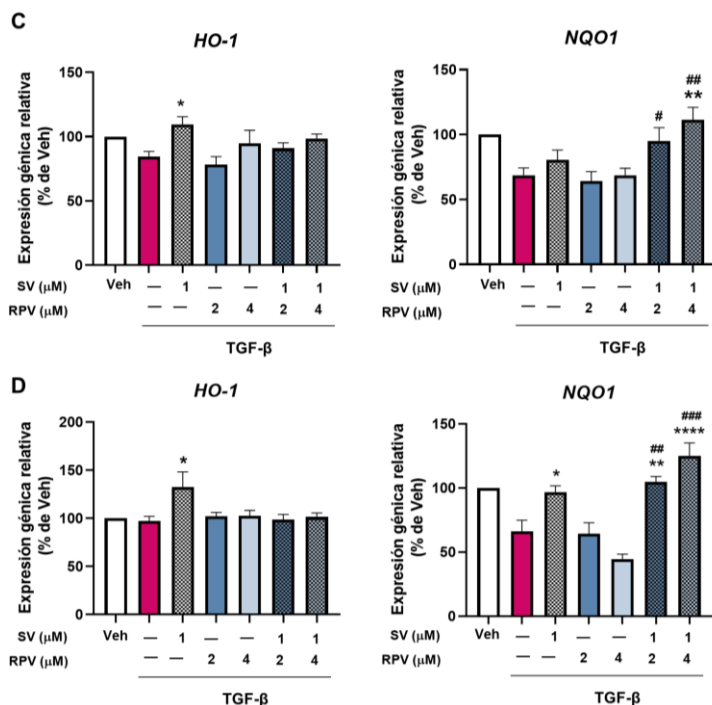


Figura IV.D.7. Efecto de la combinación de SV con RPV sobre la expresión de Nrf2, HO-1 y NQO1 en LX-2. Las células se estimularon con TGF-β (2,5 ng/mL) y se trataron con SV (1 μM), RPV (2 y 4 μM) o combinación de ambos fármacos. **A)** Imágenes representativas de WB de las proteínas Nrf2 y HO-1 a las 48 h de tratamiento. **B)** Cuantificación de la expresión de proteínas mediante análisis densitométrico de las imágenes de WB para Nrf2 y HO-1. La expresión se normalizó frente a la de GAPDH. **C), D)** Expresión génica relativa de los genes diana de la vía Nrf2 (*NQO1* y *HO1*) analizada mediante RT-qPCR a 48 y 72 h, respectivamente. Los datos fueron normalizados considerando la expresión del gen de referencia *ACTB*. Se representa la media ± SEM ($n=4-5$) y se expresan en relación con los de las células tratadas con Veh en cada experimento, que se consideró el 100 %. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF-β, SV+ TGF-β o RPV + SV + TGF-β frente a TGF-β (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ y **** $p<0,0001$) y con la prueba t de Student para RPV + SV + TGF-β frente a RPV + TGF-β (# $p<0,05$, ## $p<0,01$ y ### $p<0,001$).

Para confirmar estos resultados, se analizó la expresión de Nrf2 mediante inmunofluorescencia. Se observó que, SV y RPV, contrario a lo esperado, inducían una disminución significativa de la señal de Nrf2 cuando se administraron de manera individual. Sin embargo, la combinación de los fármacos aumentó de manera significativa la señal, de acuerdo con lo observado en el análisis de expresión proteica (Figura IV.D.8).

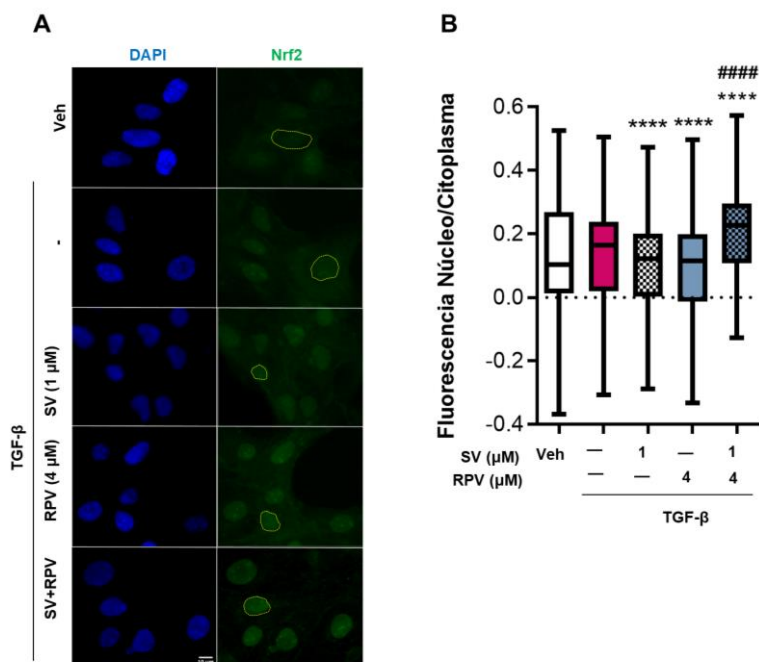


Figura IV.D.8. Efecto de SV en combinación con RPV sobre la expresión de Nrf2 mediante inmunofluorescencia. Las células LX-2 se estimularon con TGF- β (2,5 ng/mL) y se trataron con SV (1 μ M), RPV (4 μ M) o la combinación de ambos fármacos (48 h). **A)** Tinción de inmunofluorescencia que muestra la localización de Nrf2 (verde). Se utilizó DAPI para visualizar los núcleos. Las imágenes son representativas de la inmunofluorescencia realizada en $n=3$ experimentos independientes. **B)** Cuantificación de la señal de fluorescencia, que muestra el ratio de fluorescencia entre el núcleo y el citoplasma; se representan los valores de células individuales de todos los experimentos. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF- β , SV+ TGF- β o RPV + SV+ TGF- β frente a TGF- β (**** $p<0,0001$) y con la prueba t de Student para RPV + SV + TGF- β frente a RPV + TGF- β , o TGF- β frente a Veh (#### $p<0,0001$).

Con el propósito de dilucidar el efecto sinérgico de SV-RPV sobre la respuesta antioxidante en HSC estimuladas con TGF- β , se realizó un análisis de la expresión génica de un panel de enzimas con un papel fundamental en la protección celular frente al estrés oxidativo (Figura IV.D.9) Los resultados revelaron que TGF- β indujo una disminución notable en la expresión de *GSR*, *GPX*, *CAT* y *SOD1*, y una tendencia en *PDRX1*, mientras que la expresión de *GCLC* no experimentó alteraciones significativas. En cuanto a los tratamientos individuales, no se observaron cambios apreciables en la expresión de ninguno de los genes estudiados. Sin embargo, la combinación de ambos fármacos indujo un incremento significativo en la expresión de *GSR*, *GPX* y *CAT*, observándose una clara dependencia de la concentración de RPV en el efecto sinérgico. En el caso de *SOD1*, el aumento en su expresión únicamente se evidenció al combinar SV con RPV (4 μ M), mientras que la expresión de *GCLC* y *PDRX1* no mostró cambios con el tratamiento combinado.

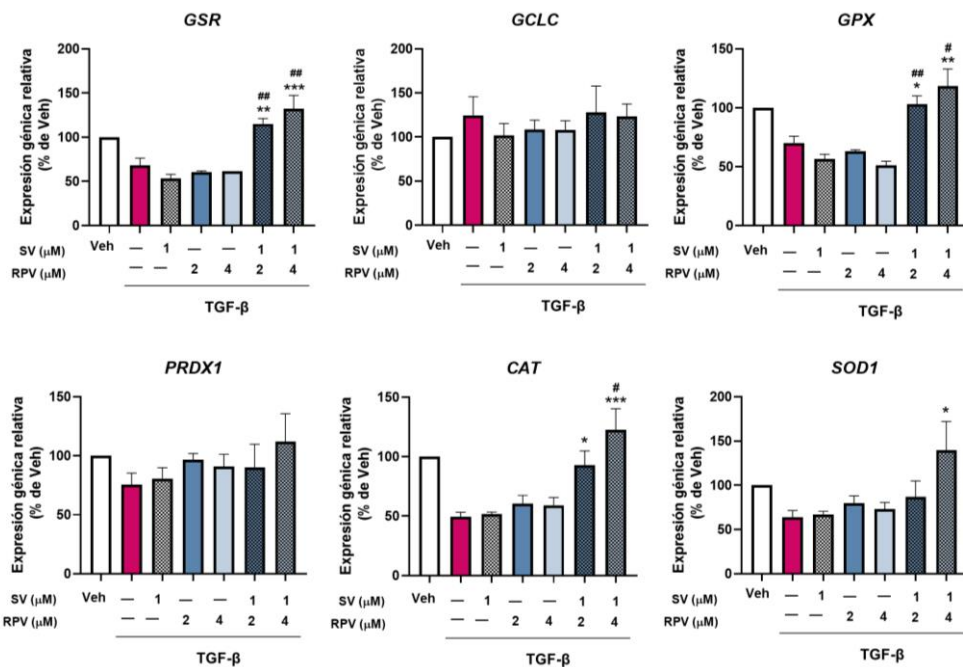
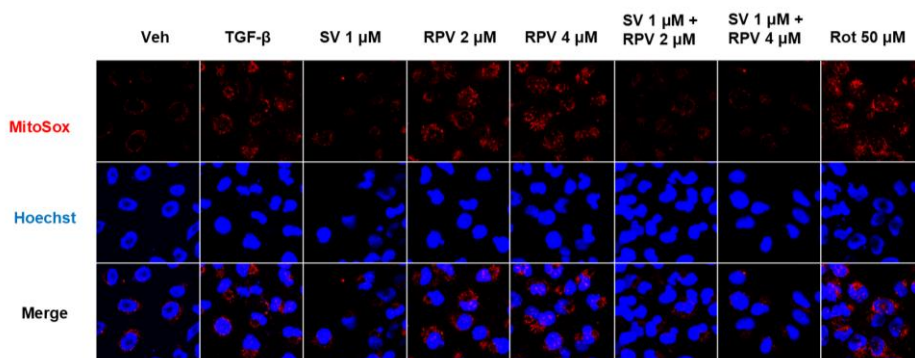


Figura IV.D.9. (Página anterior) Efecto de la combinación de SV con RPV sobre la expresión génica de enzimas relacionadas con la protección frente al estrés oxidativo. Las células LX-2 se estimularon con TGF- β (2,5 ng/mL) y se trataron con SV (1 μ M), RPV (2 y 4 μ M) o la combinación de ambos fármacos. Expresión génica relativa de *GSR*, *GCLC*, *GPX*, *CAT*, *PRDX1*, *SOD1* analizada mediante RT-qPCR. Los datos fueron normalizados considerando la expresión del gen de referencia *ACTB*. Se representa la media \pm SEM ($n=3$) y se expresan en relación con los de las células tratadas con vehículo en cada experimento, que se consideró el 100 %. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF- β , SV+ TGF- β o RPV + SV + TGF- β frente al tratamiento con TGF- β (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$) y con la prueba t de Student para RPV + SV + TGF- β frente a RPV + TGF- β (# $p<0,05$ y ## $p<0,01$).

Tras observar la potenciación del efecto antioxidante de SV por RPV, se decidió confirmar estos resultados mediante la evaluación de la producción de superóxido mitocondrial. Para ello se empleó el fluorocromo MitoSox y rotenona como control positivo. La exposición a TGF- β indujo un aumento en la intensidad de la señal de MitoSox, indicando una mayor producción de superóxido mitocondrial. En contraste, el tratamiento con SV provocó una disminución significativa en la fluorescencia de MitoSox. Si bien no se observaron cambios con el tratamiento único de RPV, la combinación con SV mostró una disminución significativa en la señal en ambas concentraciones de RPV empleadas, evidenciando el papel de RPV en la potenciación del efecto antioxidante de SV (Figura IV.D.10).

A



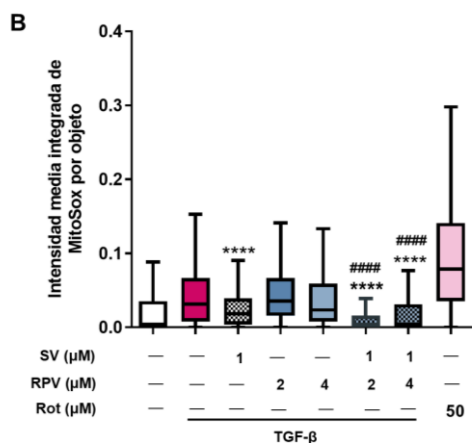


Figura IV.D.10. Impacto de la combinación de RPV y SV sobre la producción de superóxido mitocondrial. Las células LX-2 se estimularon con TGF- β (2,5 ng/mL) y se trataron con SV (1 μ M), RPV (2 y 4 μ M) o la combinación de ambos fármacos durante 48 h. **A)** Imágenes de fluorescencia de LX-2 teñidas con MitoSox (red) y Hoechst (núcleo). Como control positivo se encuentran las células no estimuladas y tratadas con rotenona (Rot). Las imágenes son representativas de experimentos independientes ($n=3$). **B)** Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de MitoSox a nivel de célula individual. Los gráficos representan la distribución de los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos de todas las células analizadas en los experimentos. En todos los casos, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF- β , SV+ TGF- β o RPV + SV+ TGF- β frente a TGF- β (**** $p<0,0001$) y con un test t de Student para RPV + TGF- β frente a RPV + SV + TGF- β o TGF- β frente a Veh (##### $p<0,00001$).

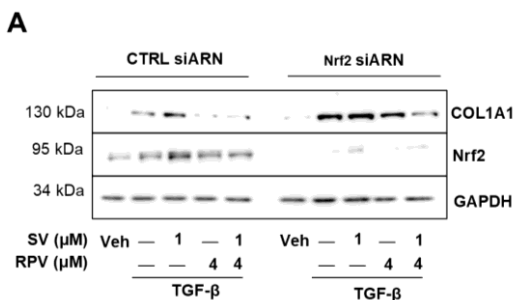
IV.D.6. IMPACTO DE LA TERAPIA COMBINADA SV-RPV Y SILENCIAMIENTO DE NRF2 EN LA EXPRESIÓN DE COLÁGENO, PRODUCCIÓN DE ROS Y VIABILIDAD CELULAR

Los experimentos previos revelaron que RPV era capaz de potenciar el efecto antioxidante de SV a través de la ruta de Nrf2. Para confirmar esta interacción, se silenció la expresión de Nrf2 mediante ARN de interferencia y se evaluó el impacto del silenciamiento en la expresión de colágeno, la producción de ROS y la viabilidad celular.

Como se observa en la Figura IV.D.11 A, B, el silenciamiento de Nrf2 incrementó la expresión de colágeno en todas las condiciones experimentales, confirmando la influencia del factor de transcripción en la expresión de este marcador de fibrogénesis. A pesar de que tanto las células

silenciadas como las no silenciadas exhibieron una reducción de la expresión de Col1a1 con RPV, y una potenciación de este efecto al combinar RPV con SV, el silenciamiento de Nrf2 eliminó la significancia estadística de la disminución observada con la terapia combinada (con la concentración más alta de RPV).

Por otro lado, el análisis de producción de ROS con MitoSox reveló que, en células con ARN de interferencia control, RPV disminuyó significativamente la señal de MitoSox respecto a las células activadas con TGF- β , efecto potenciado al combinar RPV con SV. En contraste, en células con Nrf2 silenciado, RPV aumentó significativamente la producción de ROS en comparación con el tratamiento con TGF- β , un efecto intensificado de manera significativa al añadir SV (Figura IV.D.11 C, D). Por último, la viabilidad celular fue reducida por la combinación de fármacos en células cuyo Nrf2 no se encontraba silenciado, mientras que, tras el silenciamiento, no se observaron cambios en la viabilidad celular con la combinación de SV-RPV (Figura IV.D.11 E). Estos resultados, en conjunto, demuestran el papel protector de Nrf2 en la viabilidad celular y la producción de ROS tras el tratamiento combinado.



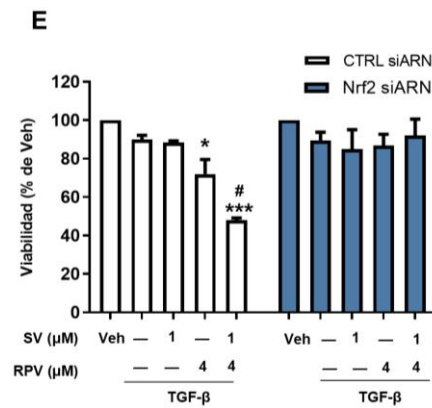
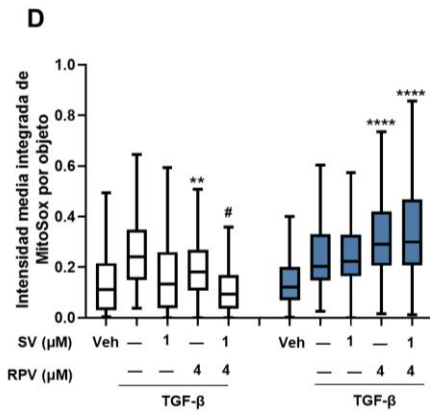
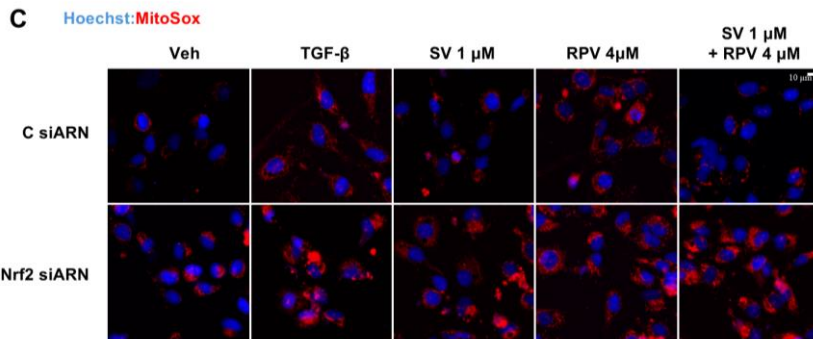
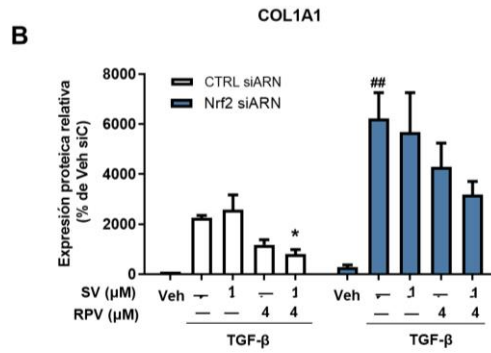


Figura IV.D.11. (Página anterior) Análisis del efecto del tratamiento combinado SV-RPV y el silenciamiento de Nrf2 en la expresión proteica de colágeno, producción de ROS y viabilidad celular. Las células LX-2 se expusieron a siARN control y siNrf2 en presencia de TGF- β (2,5 ng/mL) y se trataron con SV (1 μ M), RPV (4 μ M) o la combinación de ambos fármacos durante 48 h. **A)** Imágenes representativas de WB para COL1A1 y Nrf2. **B)** Cuantificación de la expresión de COL1A1 mediante análisis densitométrico de las imágenes de WB. La expresión de la proteína se relativizó frente a la expresión de GAPDH. Los datos representan la media \pm SEM ($n=5$) y se expresan en relación con los de las células tratadas con Veh (siARN control), que se consideró el 100 %. **C)** Imágenes de fluorescencia de células marcadas con MitoSox (rojo) y Hoechst (núcleos), representativas de la tinción realizada en experimentos independientes ($n=3$). **D)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de MitoSox a nivel de célula única realizada con CellProfiler. Los diagramas de cajas representan los valores de célula única de todos los experimentos. **E)** Datos de viabilidad celular. Los datos representan la media \pm SEM ($n=5$) y se expresan en relación con los de las células tratadas con Veh (siARN control o siNrf2). En todos los casos, el análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para RPV + TGF- β , SV+ TGF- β y RPV + SV+ TGF- β frente a TGF- β (* $p<0,05$ ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$) y con prueba t de Student para RPV + SV + TGF- β frente a RPV + TGF- β o TGF- β frente a Veh (# $p<0,04$ y ## $p < 0,01$).

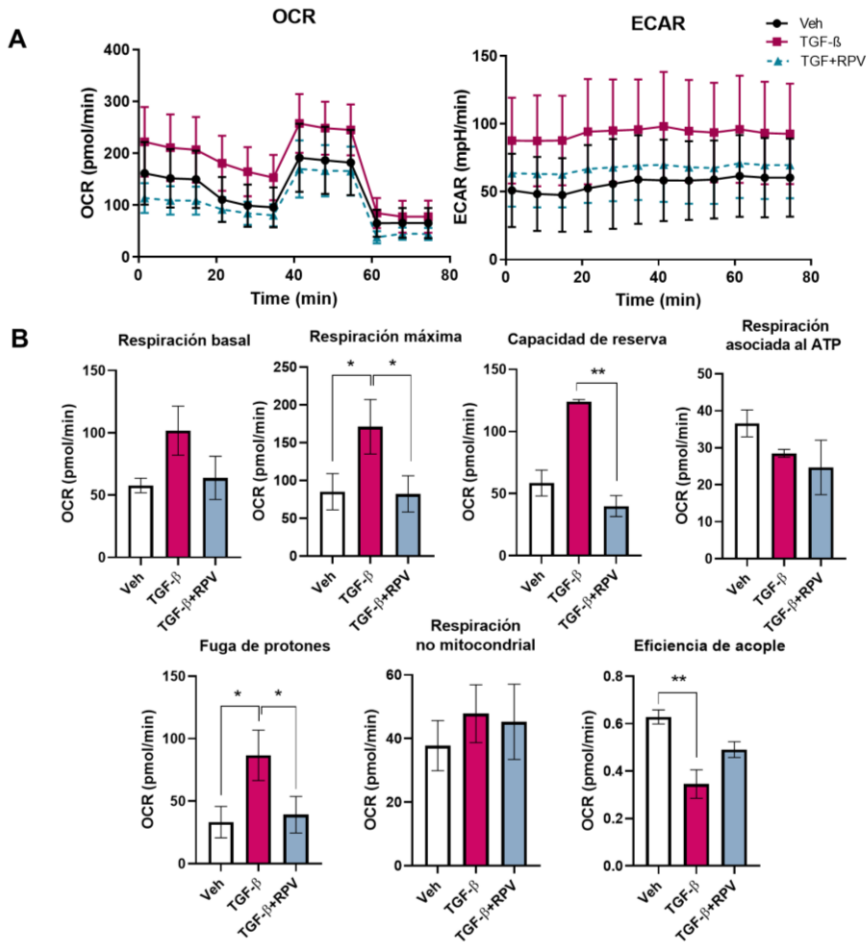
SECCIÓN E. CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE RPV SOBRE LA MITOCONDRIA EN HSC ACTIVADAS CON TGF- β

Para comprender de manera integral el efecto de RPV sobre las HSC activadas, se analizaron diversos parámetros mitocondriales, dada la importancia de la función mitocondrial en su activación, proliferación y supervivencia.

IV.E.1. MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL

En primer lugar, se analizó el perfil bioenergético de las células tras 48 h de tratamiento con TGF- β , en presencia o ausencia de RPV 4 μ M. Esta concentración de RPV se seleccionó por mostrar efectos antifibróticos evidentes sin generar toxicidad significativa. Los datos del analizador de flujo Seahorse revelaron que TGF- β incrementaba tanto el OCR como la ECAR, mientras que este efecto se prevenía por la coadministración de RPV (Figura IV.E.1 A). En un análisis más detallado del OCR, se observó que la respiración basal (la demanda energética de las células en condiciones basales), la respiración máxima (la capacidad máxima que puede alcanzar la cadena respiratoria de electrones) y la capacidad de reserva (calculada como la diferencia entre la respiración máxima y basal) se encontraban aumentadas con TGF- β . No obstante, RPV contrarrestó dicho aumento restaurando los niveles a valores comparables a los del vehículo. La respiración basal está compuesta por el OCR utilizado para la síntesis de ATP y el que resulta de la fuga protónica mitocondrial. Sorprendentemente, se detectó que el aumento en el OCR inducido por TGF- β se debió a una fuga protónica incrementada y no a un aumento asociado a la producción de ATP (Figura IV.E.1 B). Al igual que en los parámetros anteriores, RPV disminuyó significativamente la fuga de protones hasta niveles similares al vehículo. En cuanto a la respiración no mitocondrial (el consumo de oxígeno debido a componentes celulares distintos de las mitocondrias), ninguna condición mostró cambios significativos, mientras que la eficiencia de acople

(refleja la capacidad de la mitocondria para generar ATP a partir del oxígeno consumido, minimizando la pérdida de energía en forma de calor) disminuyó de manera significativa con TGF- β y tendió a recuperarse con RPV. Por último, se evaluó el $\Delta\psi_m$ (un indicador crucial de la función mitocondrial) mediante microscopía de fluorescencia con la sonda TMRM, sensible a las fluctuaciones del $\Delta\psi_m$. Se observó una disminución significativa del $\Delta\psi_m$ en las células expuestas a TGF- β (48 h), efecto que fue atenuado por RPV (Figura IV.E.1 C, D). Este hallazgo concuerda con el dato de la fuga de protones observado en el analizador de flujo Seahorse.



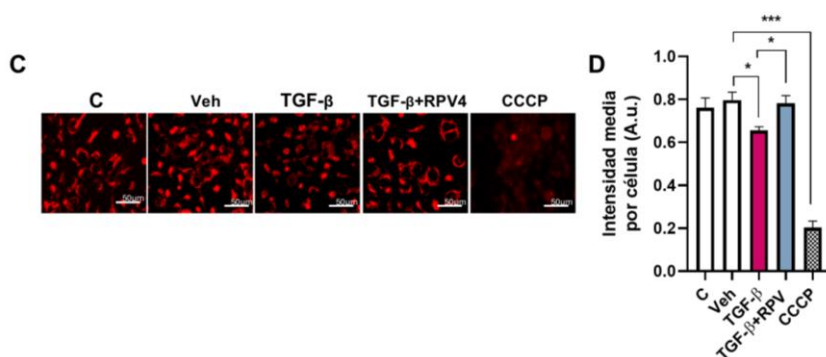


Figura IV.E.1. Análisis del efecto de RPV en la función mitocondrial en células LX-2. Las células se trataron durante 48 h con Veh, TGF-β (2,5 ng/mL), o TGF-β en presencia de RPV 4 μM. **A)** Datos de la tasa de OCR y ECAR. **B)** Cuantificación de varios parámetros estándar en el análisis de Seahorse. Los datos se normalizaron según la cantidad total de proteína de la muestra, se representaron como media ± SEM ($n=3$, excepto para TGF-β en “Capacidad de reserva” donde $n=2$) y se analizaron mediante el test t de Student para TGF-β frente a vehículo, o TGF-β + RPV4 frente a TGF-β (* $p < 0,05$ y $p^{**} < 0,01$). **C)** El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se estudió mediante microscopía de fluorescencia de células vivas y se empleó el desacoplador mitocondrial CCCP como condición de control para la pérdida de $\Delta\Psi_m$. Se muestran imágenes representativas (20X) de células teñidas con rodamina tetrametilo, utilizada para evaluar el $\Delta\Psi_m$ (señal roja). **D)** La cuantificación de los datos de fluorescencia se realizó con CellProfiler y los datos (media ± SEM, $n=3$) se analizaron mediante el test t de Student para TGF-β frente a vehículo, TGF-β + RPV4 frente a TGF-β, o CCCP frente a vehículo (* $p < 0,05$ y $*** p < 0,001$).

Considerando que la disfunción mitocondrial observada tras el tratamiento con TGF-β podría asociarse a un aumento en la producción de ROS, se decidió evaluar el impacto del tratamiento con RPV en este proceso. Para ello, se analizó la generación de superóxido mitocondrial mediante microscopía de fluorescencia utilizando el fluorocromo MitoSox. Como se observa en la Figura IV.E.2., la estimulación con TGF-β durante 48 h indujo un aumento significativo en la fluorescencia de MitoSox (similar al observado con el control positivo rotenona), lo que indica una mayor producción de superóxido mitocondrial. Sin embargo, el tratamiento con RPV en un rango de concentraciones de 1 a 8 μM, no logró prevenir el aumento de la fluorescencia de MitoSox inducida por TGF-β.

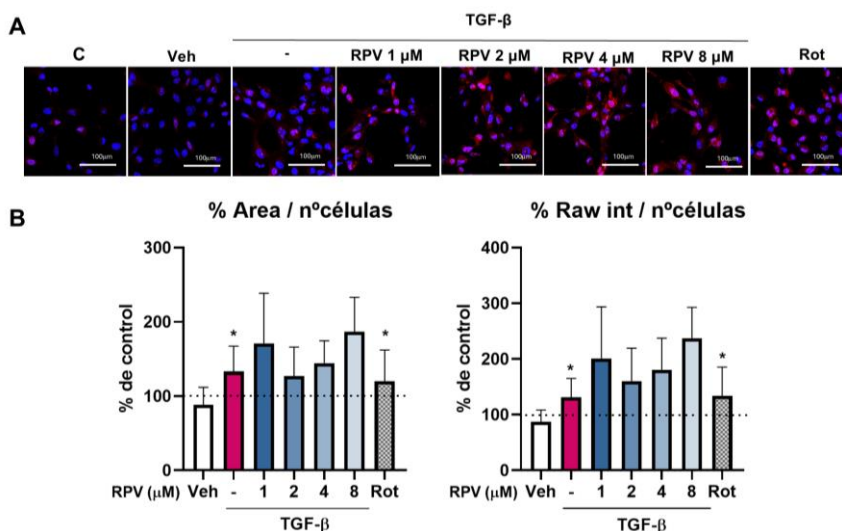
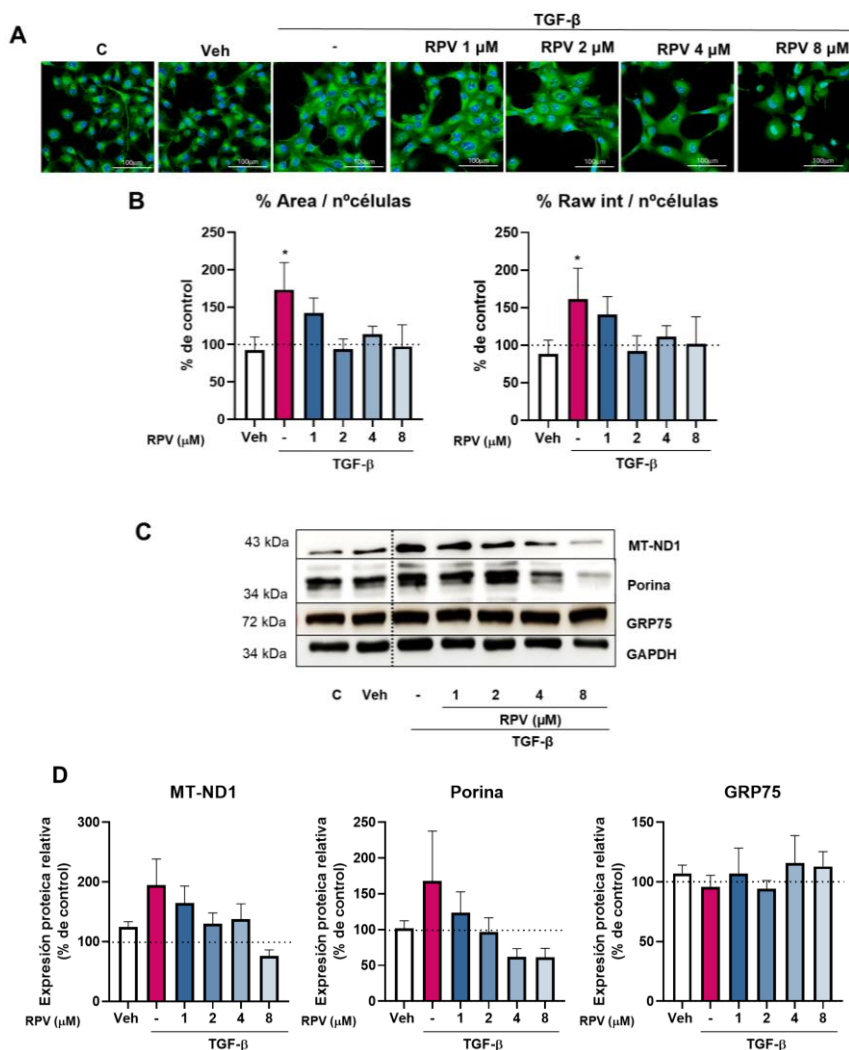


Figura IV.E.2. Análisis del efecto de RPV en la producción de superóxido mitocondrial en células LX-2. Las células se trataron durante 48 h con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) solo o TGF- β en presencia de concentraciones crecientes de RPV (1-8 μ M). El tratamiento con el inhibidor del complejo I mitocondrial rotenona (Rot) se utilizó como control positivo. **A)** Imágenes representativas de microcopía confocal de células vivas (aumento: 40X) marcadas con MitoSox (para detectar superóxido mitocondrial, fluorescencia roja) y Hoechst (para marcar núcleos, señal azul). **B)** La cuantificación de los datos de fluorescencia se realizó con ImageJ y se muestran como media \pm SEM ($n=6$). La señal fluorescente en las células no tratadas (control) se consideró el 100 %. Los datos fueron analizados mediante el test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para TGF- β + RPV frente a TGF- β y un test t de Student para TGF- β frente a vehículo, o rotenona (Rot) frente a vehículo (* $p<0,05$).

IV.E.2. EFECTO EN LA MASA MITOCONDRIAL

Dada la importancia de la masa y la dinámica mitocondrial para la función celular, se investigó el impacto de RPV sobre estos parámetros en células tratadas con TGF- β . Mediante microscopía de fluorescencia utilizando la sonda NAO (verde), se observó que la exposición a TGF- β durante 48 h inducía un aumento significativo en esta señal (indicativo de un incremento en la masa mitocondrial), tanto en términos de área como de intensidad. Este efecto se vio contrarrestado por la coadministración de RPV, particularmente a concentraciones de 2, 4 y 8 μ M, donde la señal se asemejó a la del grupo vehículo (Figura IV.E.3 A, B). Para complementar este hallazgo, se evaluó

la expresión de varias proteínas mitocondriales: MT-ND1, porina y GRP75 como marcadores de la IMM, matriz mitocondrial y OMM, respectivamente. Mientras que la expresión de GRP75 no fue alterada en ninguna de las condiciones experimentales, TGF- β indujo un aumento en la expresión de MT-ND1 y porina. Cuando las células se cotrataron con RPV, se observó una tendencia a contrarrestar este efecto de manera concentración dependiente (Figura IV.E.3 C, D).



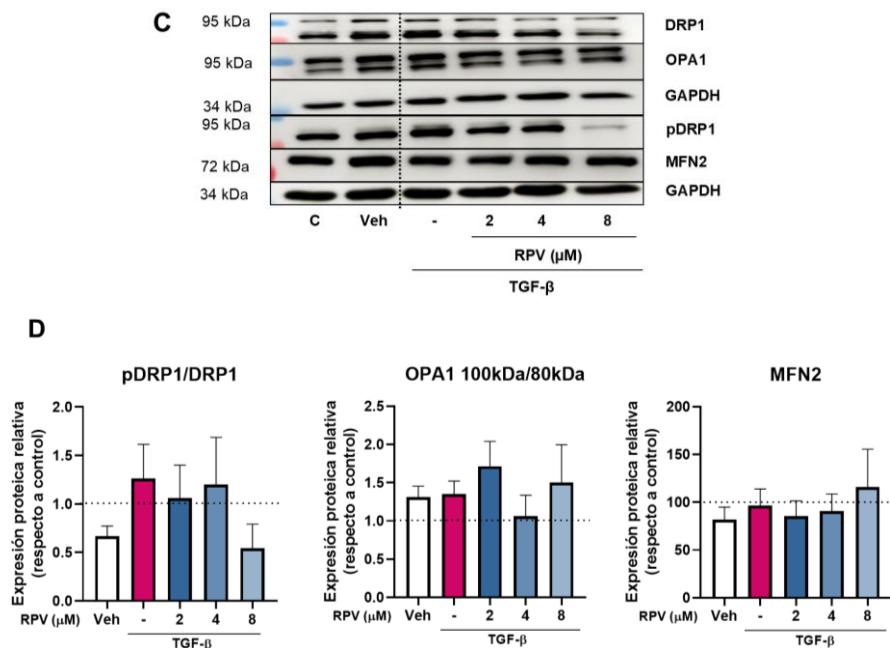
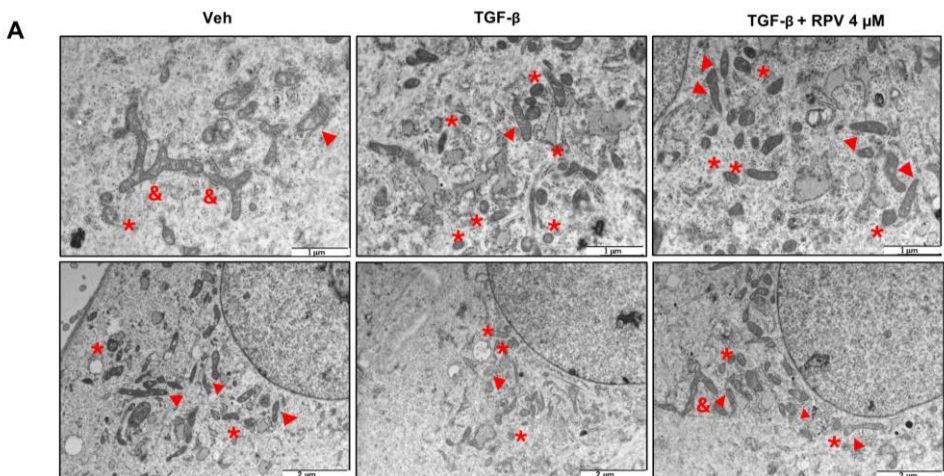


Figura IV.E.4. Análisis del efecto de RPV en la morfología y dinámica mitocondrial en células LX-2. Las células se trataron durante 48 h con Veh, TGF-β (2,5 ng/mL) solo o TGF-β en presencia de concentraciones crecientes de RPV (1-8 μM). **A)** Imágenes representativas de microscopía confocal de células vivas (aumento: 63X) teñidas con el colorante mitocondrial Mitoview 1 (rojo) para estudiar la morfología mitocondrial. **B)** La fluorescencia se cuantificó con ImageJ y los datos (media ± SEM, $n=4$) se analizaron mediante el test t de Student para TGF-β frente a vehículo, o TGF-β + RPV frente a TGF-β (* $p<0,05$). **C)** Imágenes representativas del análisis de la dinámica mitocondrial (fisión y fusión) mediante la evaluación de las proteínas pDRP1, OPA1 y MFN2 por WB. **D)** Cuantificación por densitometría de las imágenes de WB. Los datos se muestran como la media ± SEM ($n=5-7$). GAPDH se utilizó como control de carga y los datos se relativizaron a los de las células no tratadas (control), que se consideraron el 100 %. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para TGF-β + RPV frente a TGF-β y un test de Student para TGF-β frente a vehículo.

A continuación, se realizó un análisis morfométrico de imágenes de TEM de las mitocondrias en las células LX-2 (Figura IV.E.5 A). En este estudio, las células expuestas a TGF-β exhibieron mitocondrias más pequeñas con una forma más redondeada, efecto que se atenuó con el cotratamiento con RPV.

El análisis de los parámetros morfométricos (Figura IV.E.5 B) reveló que el tratamiento con TGF- β se asoció con una disminución en la superficie y el perímetro mitocondrial (indicadores del tamaño mitocondrial) y se relacionó específicamente con una disminución en la longitud del eje mayor, sin afectar a la longitud del eje menor. Además, se observó una reducción en la complejidad/compacidad de la forma mitocondrial, evidenciada por una disminución en el factor de forma (la relación inversa entre el cuadrado del perímetro de un objeto y el cuadrado del perímetro de un círculo con la misma superficie). También se cuantificaron la redondez y la circularidad, y los datos obtenidos de estos parámetros, así como los del ratio de aspecto (relación entre longitud y anchura), mostraron que las células expuestas a TGF- β presentaban mitocondrias más redondeadas, mientras que su forma tendía a ser más alargada tras cotratarse con RPV. En conjunto, estos datos indican que las alteraciones de parámetros asociados a la morfología mitocondrial producidas por la estimulación con TGF- β son prevenidas por el cotratamiento con RPV.



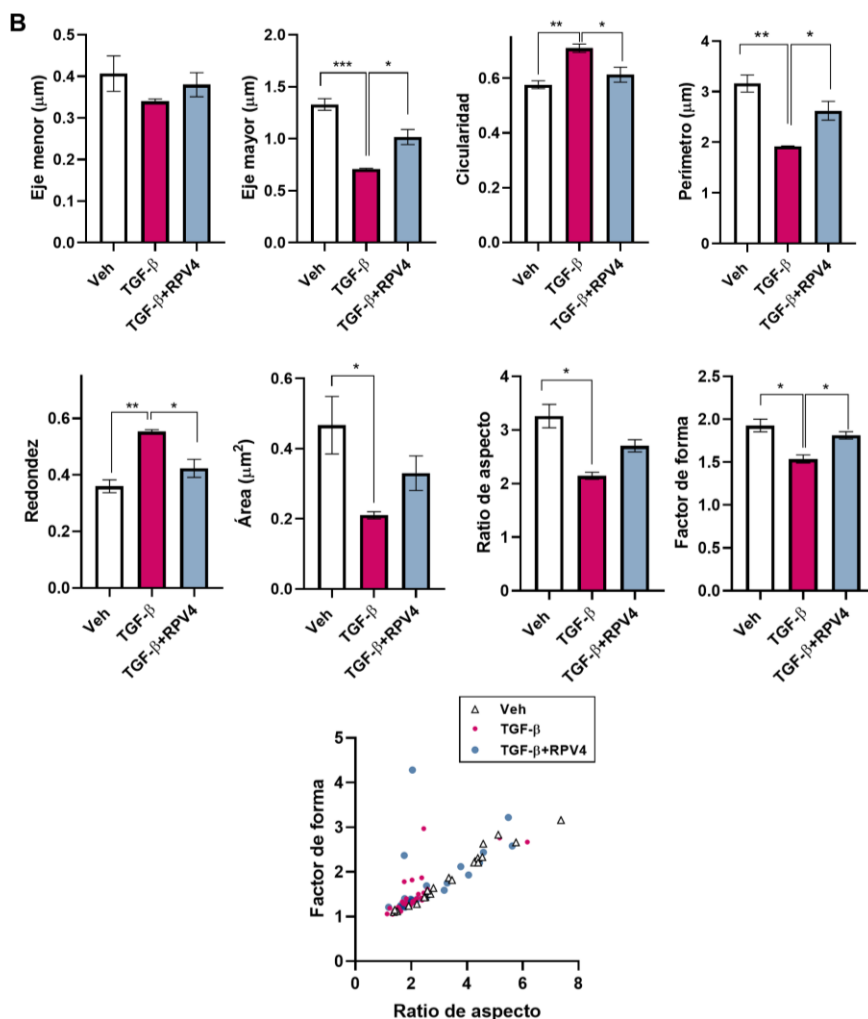


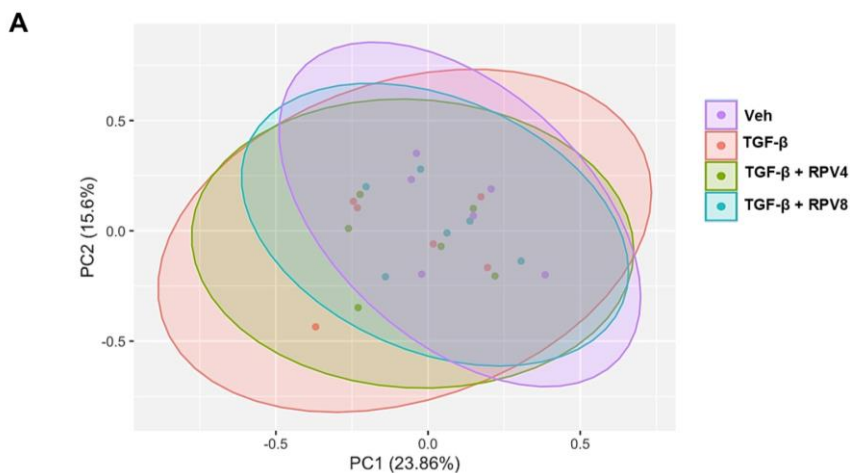
Figura IV.E.5. Análisis del efecto de RPV en la forma y tamaño mitocondrial mediante TEM en células LX-2. Las células se trataron durante 48 h con Veh, TGF-β (2,5 ng/mL) solo o TGF-β en presencia de RPV 4 μM. Se muestran imágenes representativas (A) y cuantificación de datos (por ImageJ) relacionados con descriptores de forma y tamaño mitocondrial (área, perímetro, eje mayor, eje menor, circularidad, redondez, factor de forma y ratio de aspecto) de una mitocondria individual (B). Los resultados se expresan como media ± SEM de al menos 50 mitocondrias por condición (4-5 imágenes por condición), excepto en el gráfico de “ratio de aspecto” frente a “factor de forma”, que muestra mitocondrias estudiadas individualmente en un experimento independiente. Los datos (n=3) se analizaron estadísticamente mediante el test t de Student para TGF-β frente a vehículo o TGF-β + RPV4 frente a TGF-β (* p<0,05, ** p<0,01 y *** p<0,001). * mitocondrias redondas, Δ mitocondrias alargadas, & mitocondrias ramificadas.

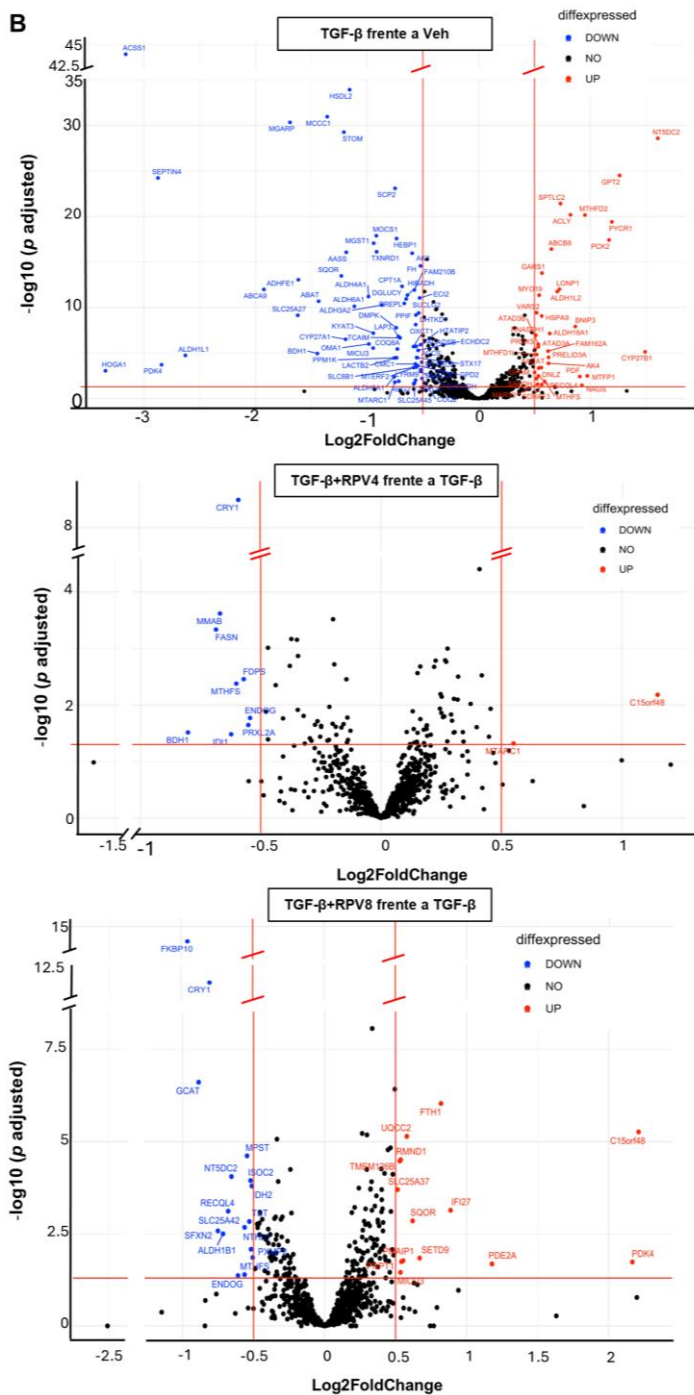
IV.E.4. EFECTO EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES MITOCONDRIALES MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN

Para evaluar el efecto de RPV sobre las mitocondrias en las HSC a gran escala, se realizó un análisis de secuenciación de ARN utilizando hHSC expuestas a vehículo o TGF- β (solo o en presencia de RPV 4 o 8 μ M) durante 48 h, lo que resultó en datos de expresión de 13156 secuencias codificantes de proteínas (tal y como se mencionó en el apartado Capítulo IV Sección A). Posteriormente, con el fin de analizar específicamente el impacto sobre las mitocondrias, se realizó una búsqueda de genes que codifican proteínas mitocondriales entre los DEGs identificados en el estudio. Para ello, se utilizó MitoCarta 3.0 (218), un catálogo de 1036 genes humanos responsables de la codificación del proteoma mitocondrial. De estos, 1016 genes se encontraron presentes en los resultados de secuenciación de ARN en nuestro estudio. Los patrones de expresión se evaluaron mediante PCA (Figura IV.E.6. (I) A), donde se observó que no existía una clara separación entre los diferentes tratamientos, sugiriendo que los perfiles de expresión génica no difieren significativamente entre las condiciones experimentales evaluadas. Los patrones de expresión de los mito-DEGs de cada muestra se encuentran representados en el mapa de calor (Figura IV.E.6. (I) C). En este gráfico se observa una notable distinción entre el grupo vehículo y el grupo tratado con TGF- β y, además, destaca la capacidad del tratamiento con RPV para atenuar el cambio en la expresión génica inducido por el estímulo, asemejando el patrón de expresión al grupo vehículo (especialmente a la concentración más alta del fármaco).

Complementariamente, se analizaron los datos mediante un gráfico de volcán. Este análisis reveló cambios importantes en los patrones de expresión, tanto de genes sobreexpresados como infraexpresados, particularmente en células tratadas con TGF- β en comparación con el vehículo (Figura IV.E.6 (I) B). En concreto, la comparación entre las células expuestas a TGF- β y las tratadas con el vehículo mostró 139 genes

sobreexpresados y 199 genes infraexpresados que codifican proteínas mitocondriales (mito-DEGs) (p ajustado $<0,05$) (Tabla IV.2). Entre los DEGs sobreexpresados con mayor cambio de expresión génica y menor p valor destacaron *NT5DC2* (dominio que contiene nucleotidasa 2), el cual ha sido ampliamente asociado con enfermedades hepáticas y considerado un marcador pronóstico novedoso en el HCC humano (219) y *GPT2* (glutámico-pirúvico transaminasa 2 o también conocida como alanina aminotransaminasa 1, ALT1). Los mito-DEGs infraexpresados con mayor cambio en la expresión génica y menor p valor fueron la acetil-CoA sintetasa de cadena corta miembro de la familia 1 (*ACSS1*), un gen crucial en la síntesis de lípidos, y *SERPIN1*, previamente asociado a la activación de HSC (220,221)





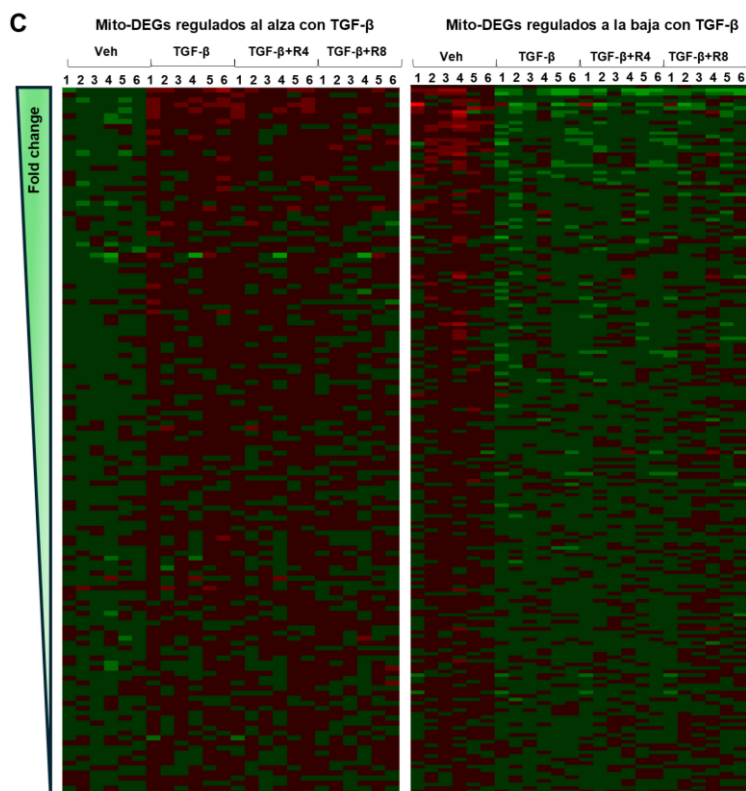


Figura IV.E.6. Análisis de secuenciación de ARN de los mito-DEGs en hHSC (I).

Las células se trataron con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) ($n=6$). Se detectaron un total de 13157 secuencias, de las cuales 13156 fueron genes codificantes de proteínas, y se filtraron las secuencias para genes que codifican proteínas mitocondriales (mito-DEGs). **A)** Análisis de PCA de los mito-DEGs en los cuatro grupos: TGF- β , vehículo, TGF- β + RPV4 y TGF- β + RPV8. Las variables 1 y 2 conjuntamente explican el 39,46 % de la varianza total. **B)** Gráficos de volcán con las siguientes comparaciones: TGF- β frente a vehículo, TGF- β + RPV4 frente a TGF- β y TGF- β + RPV8 frente a TGF- β . **C)** Mapas de calor que muestran los mito-DEGs que fueron regulados al alza (izquierda) o regulados a la baja (derecha) en células tratadas con TGF- β frente a vehículo, listados según el cambio en la expresión génica.

La co-exposición a RPV 4 μ M mostró niveles de ARNm significativamente alterados de 90 mito-DEGs ($p<0,05$) en comparación con la exposición individual a TGF- β , con 47 sobreexpresados y 43 infraexpresados (Tabla IV.3). De ellos, 16 (34 %) de los mito-DEGs significativamente sobreexpresados y 15 (34,9 %) de los mito-DEGs infraexpresados mostraron

expresión en sentido contrario a los mito-DEGs encontrados en las células tratadas con TGF- β . Por último, la co-exposición a RPV 8 μ M identificó 110 mito-DEGs con expresión significativamente aumentada y 76 con expresión disminuida en comparación con TGF- β solo (p ajustado $<0,05$) (Tabla IV.4). Cabe destacar que, 49 (44,5 %) de los mito-DEGs sobreexpresados y 31 (40,8 %) de los mito-DEGs infraexpresados mostraron expresión en sentido contrario a los mito-DEGs encontrados en las células tratadas con TGF- β (Figura IV.E.6 (II)).

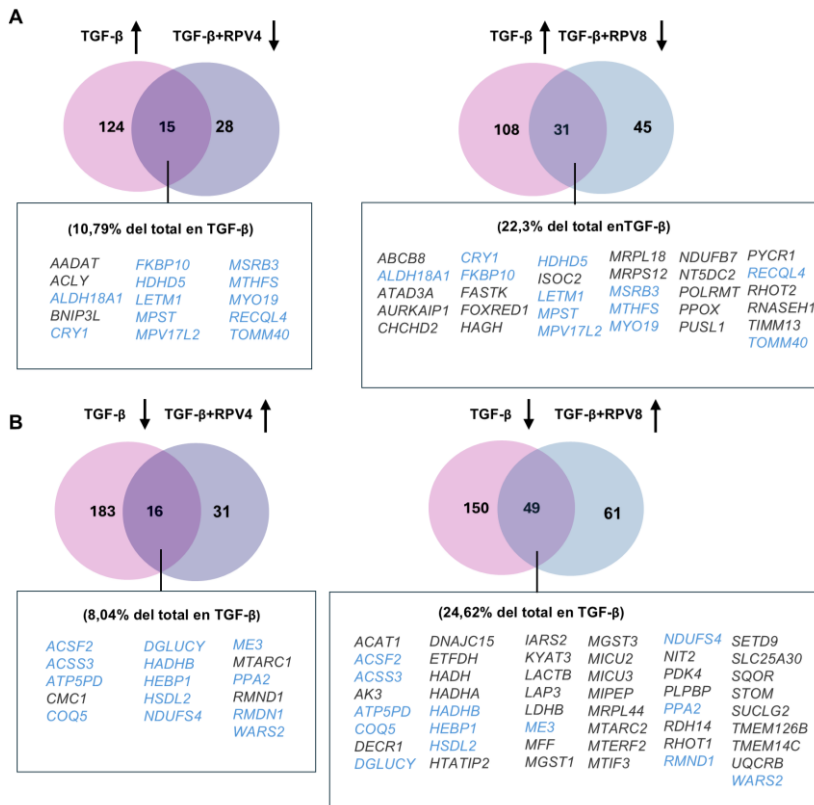


Figura IV.E.6. (Página anterior) Análisis de secuenciación de ARN de los mito-DEGs en hHSC (II). Las hHSC se trataron con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) ($n=6$). Diagramas de Venn que muestran los mito-DEGs significativamente regulados al alza **A**) o significativamente regulados a la baja **B**) en células expuestas a TGF- β frente a vehículo y los genes cuyo cambio en la expresión fue prevenido por el cotratamiento con TGF- β + RPV4 o TGF- β + RPV8 (listados en orden alfabético en los recuadros). Los nombres de los mito-DEGs atenuados respecto a TGF- β comunes para TGF- β + RPV4 y TGF- β + RPV8 se muestran en azul.

La comparación de los perfiles de expresión de los mito-DEGs observados en TGF- β + RPV4 con los de TGF- β + RPV8 identificó 35 mito-DEGs sobreexpresados (28,69 %) y 22 mito-DEGs infraexpresados (22,68 %) frente a TGF- β , comunes en ambos tratamientos (Figura IV.E.6 (III)), independientemente de si contrarrestaron la expresión respecto a TGF- β .

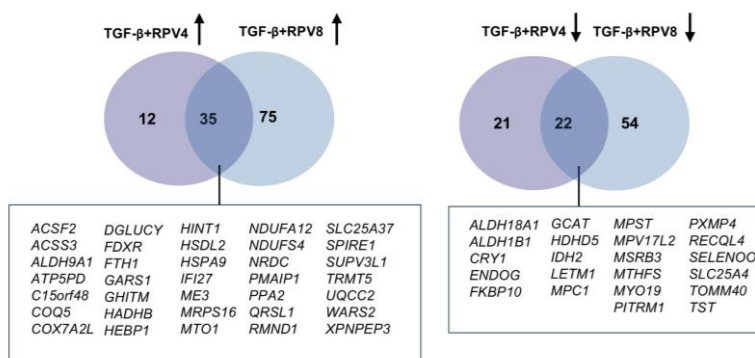


Figura IV.E.6. Análisis de secuenciación de ARN de los mito-DEGs en hHSC (III). Las hHSC se trataron con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) ($n=6$). Diagramas de Venn que muestran los mito-DEGs significativamente regulados al alza **A**) o significativamente regulados a la baja **B**) en células expuestas al cotratamiento con TGF- β + RPV4 o TGF- β + RPV8, independientemente de si atenuaron la expresión respecto a TGF- β .

También se contrastaron los mito-DEGs en TGF- β + RPV4 que mostraron expresión atenuada en comparación con TGF- β , con respecto a aquellos de TGF- β + RPV8 que mostraron también atenuación con respecto a TGF- β . Se obtuvieron 25 mito-DEGs. Específicamente, 12 de los 15 mito-DEGs infraexpresados (respecto a TGF- β) y 13 de los 16 mito-DEGs sobreexpresados observados en las células tratadas con TGF- β + RPV4

frente a TGF- β también estaban presentes en el tratamiento TGF- β + RPV8 (Figura IV.E.6 (II) en azul). Según MitoCarta 3.0, de estos 25 mito-DEGs, 11 estaban descritos y se preveía su presencia en la matriz mitocondrial, 7 en la IMM, 2 en la OMM, 1 en el espacio intermembrana y para 2 la localización estaba definida como "desconocida".

El siguiente objetivo fue evaluar qué vías mitocondriales se vieron afectadas por el cotratamiento TGF- β +RPV, específicamente para los 12 mito-DEGs infraexpresados y los 13 mito-DEGs sobreexpresados encontrados en las células tratadas con TGF- β + RPV4 o TGF- β + RPV8 respecto a TGF- β . Para esto, se analizó *MitoPathways*, que forma parte del conjunto de datos MitoCarta 3.0, una base de datos que incluye 149 vías mitocondriales con diferentes jerarquías. 4 de los mito-DEGs analizados (*CRY1*, *HDHD5*, *HSDL2* y *HEBP1*) no se encontraron en la base de datos *MitoPathways*, mientras que, para el resto, la Jerarquía de *MitoPathways* se muestra en la Tabla IV.1 A, B. Las vías de mayor jerarquía enriquecidas en el conjunto de genes mitocondriales sobreexpresados por RPV fueron "Dogma central mitocondrial", "Metabolismo", "Importación, clasificación y homeostasis de proteínas" y "Señalización, dinámica mitocondrial y vigilancia". Por otro lado, las vías enriquecidas en el conjunto de mito-DEGs infraexpresados por RPV fueron "Dogma central mitocondrial", "Metabolismo" y "Fosforilación oxidativa".

Tabla IV.1. (Página siguiente) Análisis de la jerarquía de los *Mitopathways* en los genes diferencialmente expresados que codifican proteínas mitocondriales (mito-DEGs), utilizando datos de secuenciación de ARN de hHSC tratadas con TGF- β + RPV8 o TGF- β + RPV4 frente a hHSC tratadas solo con TGF- β . Los mito-DEGs analizados son aquellos comunes entre TGF- β + RPV4 y TGF- β + RPV8 cuya expresión fue prevenida en comparación con el tratamiento solo con TGF- β . Las hHSC se trataron con TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de 4 μ M de RPV o 8 μ M de RPV durante 48 h ($n=6$), con un p valor ajustado o p valor <0,05. Las tablas muestran los *Mitopathways* de los mito-DEGs que se regularon significativamente al alza (A) o a la baja (B) en células expuestas a TGF- β , cuya expresión fue prevenida en células tratadas con TGF- β + RPV4 o TGF- β + RPV8.

A

<i>MitoPathway</i>	<i>Jerarquía de MitoPathways</i>
Dogma central mitocondrial	Dogma central mitocondrial > Traducción > Ensamblaje del ribosoma mitocondrial >Mantenimiento del mtDNA >Reparación del mtDNA
Metabolismo	Metabolismo > Metabolismo de vitaminas> Metabolismo de 1-C y folato >Metabolismo de aminoácidos > Metabolismo de prolina >Metabolismo del azufre >Detoxificación > Metabolismo de xenobióticos >Metabolismo de ROS y glutatión
Importación, clasificación y homeostasis de proteínas	Importación, clasificación y homeostasis de proteínas > Homeostasis de proteínas >Chaperonas >TOM
Señalización	Señalización > Homeostasis del calcio > Ciclo del calcio
Dinámica mitocondrial y vigilancia	Dinámica mitocondrial y vigilancia > Tráfico

B

<i>MitoPathway</i>	<i>Jerarquía de MitoPathways</i>
Dogma central mitocondrial	Dogma central mitocondrial >Metabolismo del mtRNA > Metabolismo del mtRNA>gránulos mtRNA > Traducción > Sintetasas de mt-tRNA >Mantenimiento de mtDNA
Metabolismo	Metabolismo > Metabolismo de nucleótidos > Síntesis y procesamiento de nucleótidos > Metabolismo lipídico > Oxidación de ácidos grasos > Metabolismo de aminoácidos > Metabolismo de lisina > Metabolismo de carbohidratos > Asociado al TCA > Metabolismo de carbohidratos > Metabolismo de cetonas > Metales y cofactores > Metabolismo de coenzima Q
OXPHOS	OXPHOS > Complejo I > Subunidades de CI > Complejo V > Subunidades de CV

Finalmente, también se identificó la presencia de 5 (3,6 %) mito-DEGs sobreexpresados y 6 (3,02 %) mito-DEGs infraexpresados en las células bajo tratamiento con TGF- β cuya alteración se vio aún más potenciada después de la exposición a TGF- β + RPV4. Los números equivalentes en el caso de TGF- β + RPV8 fueron 5 (3,6 %) y 8 (4,02 %) mito-DEGs.

Tabla IV.2. Análisis de expresión diferencial de genes que codifican proteínas mitocondriales (mito-DEGs) utilizando datos de secuenciación de ARN de hHSC activadas con TGF- β frente al tratamiento con vehículo (Veh). Se muestran los mito-DEGs regulados al alza y a la baja. Las hHSC se trataron con vehículo o TGF- β (2,5 ng/mL) durante 48 h ($n=6$), p valor ajustado $<0,05$. Los genes se listan según el valor de FC (*fold change*, magnitud de cambio).

TGF- β frente a Veh REGULADO AL ALZA				
hgnc_ símbolo	Descripción	HGNC símbolo. Acc.	Log 2FC	p valor ajustado
NT5DC2	5'-nucleotidase domain containing 2	HGNC:25717	1.606	2.59E-29
CYP27B1	Cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1	HGNC:2606	1.491	7.33E-06
GPT2	Glutamic-pyruvic transaminase 2	HGNC:18062	1.263	3.10E-25
PYCR1	Pyrraline-5-carboxylate reductase 1	HGNC:9721	1.193	3.91E-20
PCK2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, mitochondrial	HGNC:8725	1.168	3.80E-18
MTFP1	Mitochondrial fission process 1	HGNC:26945	0.973	3.18E-03
MTHFD2	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	HGNC:7434	0.952	6.87E-21
NAGS	N-acetylglutamate synthase	HGNC:17996	0.925	3.41E-02
PDF	Peptide deformylase, mitochondrial	HGNC:30012	0.906	3.77E-03
BNIP3	BCL2 interacting protein 3	HGNC:1084	0.866	1.22E-08
ACLY	ATP citrate lyase	HGNC:115	0.822	6.54E-21
SPTLC2	Serine palmitoyltransferase long chain base subunit 2	HGNC:11278	0.733	3.84E-22
LONP1	Ion peptidase 1, mitochondrial	HGNC:9479	0.723	9.85E-13
ALDH1L2	Aldehyde dehydrogenase 1 family member L2	HGNC:26777	0.704	1.75E-12
ABCB8	ATP binding cassette subfamily B member 8	HGNC:49	0.652	3.81E-17
ALDH18A1	Aldehyde dehydrogenase 18 family member A1	HGNC:9722	0.637	6.96E-08
PRELID3A	PRELI domain containing 3A	HGNC:24639	0.626	2.96E-05
AK4	Adenylate kinase 4	HGNC:363	0.625	1.33E-04
FAM162A	Family with sequence similarity 162 member A	HGNC:17865	0.622	6.04E-06
MTHFS	Methenyltetrahydrofolate synthetase	HGNC:7437	0.591	1.31E-02
GARS1	Glycyl-tRNA synthetase 1	HGNC:4162	0.568	1.65E-14
SDHAF3	Succinate dehydrogenase complex assembly factor 3	HGNC:21752	0.565	2.85E-02
HSPA9	Heat shock protein family A (Hsp70) member 9	HGNC:5244	0.565	8.40E-10

<i>DNLZ</i>	DNL-type zinc finger	HGNC:33879	0.561	3.87E-04
<i>MYO19</i>	Myosin XIX	HGNC:26234	0.542	4.37E-12
<i>AADAT</i>	Amino adipate aminotransferase	HGNC:17929	0.538	4.39E-04
<i>RECQL4</i>	RecQ like helicase 4	HGNC:9949	0.535	3.19E-03
<i>ATAD3A</i>	ATPase family AAA domain containing 3A	HGNC:25567	0.534	2.04E-06
<i>ATAD3B</i>	ATPase family AAA domain containing 3B	HGNC:24007	0.534	1.06E-06
<i>MARS2</i>	Methionyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	HGNC:25133	0.528	2.63E-02
<i>MTHFD1L</i>	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1 like	HGNC:21055	0.520	1.46E-05
<i>VARS2</i>	Valyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	HGNC:21642	0.519	3.66E-10
<i>SARDH</i>	Sarcosine dehydrogenase	HGNC:10536	0.518	6.47E-03
<i>RNASEH1</i>	Ribonuclease H1	HGNC:18466	0.513	1.10E-07
<i>PRDX5</i>	Peroxiredoxin 5	HGNC:9355	0.506	3.73E-06
<i>GPAM</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	HGNC:24865	0.501	1.31E-03
<i>CMC2</i>	C-X9-C motif containing 2	HGNC:24447	0.500	5.06E-06
<i>PAM16</i>	Presequence translocase associated motor 16	HGNC:29679	0.489	3.14E-04
<i>HDHD5</i>	Haloacid dehalogenase like hydrolase domain containing 5	HGNC:1843	0.482	1.06E-04
<i>MPV17L2</i>	MPV17 mitochondrial inner membrane protein like 2	HGNC:28177	0.480	5.93E-05
<i>AHCYL1</i>	Adenosylhomocysteinase like 1	HGNC:344	0.477	5.38E-08
<i>FKBP10</i>	FKBP prolyl isomerase 10	HGNC:18169	0.472	6.88E-05
<i>PUS1</i>	Pseudouridine synthase 1	HGNC:15508	0.471	1.71E-05
<i>ISOC2</i>	Isochorismatase domain containing 2	HGNC:26278	0.463	1.33E-04
<i>GTPBP3</i>	GTP binding protein 3, mitochondrial	HGNC:14880	0.458	3.37E-03
<i>COQ4</i>	Coenzyme Q4	HGNC:19693	0.428	1.47E-05
<i>MRPL17</i>	Mitochondrial ribosomal protein L17	HGNC:14053	0.427	4.36E-04
<i>SHMT2</i>	Serine hydroxymethyltransferase 2	HGNC:10852	0.413	7.04E-10
<i>TOMM40</i>	Translocase of outer mitochondrial membrane 40	HGNC:18001	0.412	1.64E-05
<i>PLSCR3</i>	Phospholipid scramblase 3	HGNC:16495	0.410	2.40E-05
<i>TIMM44</i>	Translocase of inner mitochondrial membrane 44	HGNC:17316	0.409	4.19E-07
<i>PRELID3B</i>	PRELI domain containing 3B	HGNC:15892	0.406	2.16E-04
<i>MRPL52</i>	Mitochondrial ribosomal protein L52	HGNC:16655	0.405	9.89E-06
<i>PET117</i>	PET117 cytochrome c oxidase chaperone	HGNC:40045	0.402	4.04E-02
<i>ACADVL</i>	Acyl-CoA dehydrogenase very long chain	HGNC:92	0.401	1.65E-04
<i>POLRMT</i>	RNA polymerase mitochondrial	HGNC:9200	0.399	9.93E-07
<i>AURKAIP1</i>	Aurora kinase A interacting protein 1	HGNC:24114	0.397	1.14E-05
<i>LIG3</i>	DNA ligase 3	HGNC:6600	0.395	3.54E-07
<i>UQCRC1</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	HGNC:12585	0.393	1.45E-07
<i>CPOX</i>	Coproporphyrinogen oxidase	HGNC:2321	0.391	3.33E-04
<i>GRPEL2</i>	GrpE like 2, mitochondrial	HGNC:21060	0.384	5.25E-03
<i>AK2</i>	Adenylate kinase 2	HGNC:362	0.382	3.49E-06
<i>FLAD1</i>	Flavin adenine dinucleotide synthetase 1	HGNC:24671	0.377	4.27E-04
<i>MTFR1</i>	Mitochondrial fission regulator 1	HGNC:29510	0.377	1.13E-03
<i>EC11</i>	Enoyl-CoA delta isomerase 1	HGNC:2703	0.369	3.54E-04

<i>PAICS</i>	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase and phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase	HGNC:8587	0.364	1.79E-02
<i>PRELID1</i>	PRELI domain containing 1	HGNC:30255	0.363	3.22E-05
<i>FAM210A</i>	Family with sequence similarity 210 member A	HGNC:28346	0.362	1.38E-02
<i>POLG</i>	DNA polymerase gamma, catalytic subunit	HGNC:9179	0.355	1.00E-07
<i>CHCHD6</i>	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6	HGNC:28184	0.352	3.48E-02
<i>PUSL1</i>	Pseudouridine synthase like 1	HGNC:26914	0.350	4.42E-03
<i>COQ10A</i>	Coenzyme Q10A	HGNC:26515	0.348	4.72E-02
<i>MRPL37</i>	Mitochondrial ribosomal protein L37	HGNC:14034	0.347	1.87E-03
<i>SFXN4</i>	Sideroflexin 4	HGNC:16088	0.346	1.52E-02
<i>FOXRED1</i>	FAD dependent oxidoreductase domain containing 1	HGNC:26927	0.345	2.86E-03
<i>NOCT</i>	Nocturnin	HGNC:14254	0.338	4.45E-02
<i>MRPL2</i>	Mitochondrial ribosomal protein L2	HGNC:14056	0.336	1.98E-03
<i>TRMT1</i>	tRNA methyltransferase 1	HGNC:25980	0.335	7.42E-04
<i>FASTK</i>	Fas activated serine/threonine kinase	HGNC:24676	0.333	1.07E-05
<i>CHCHD2</i>	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	HGNC:21645	0.324	8.42E-04
<i>HINT3</i>	Histidine triad nucleotide binding protein 3	HGNC:18468	0.323	7.57E-03
<i>TRMU</i>	tRNA mitochondrial 2-thiouridylase	HGNC:25481	0.322	2.00E-03
<i>COX10</i>	Cytochrome c oxidase assembly factor heme A: farnesyltransferase COX10	HGNC:2260	0.322	1.84E-02
<i>BAK1</i>	BCL2 antagonist/killer 1	HGNC:949	0.322	1.86E-03
<i>GHITM</i>	Growth hormone inducible transmembrane protein	HGNC:17281	0.321	1.73E-08

TGF- β frente a Veh REGULADO A LA BAJA				
hgnc_símbolo	Descripción	HGNC símbolo. Acc.	Log 2FC	p valor ajustado
<i>HOGA1</i>	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1	HGNC:25155	-3.344	8.79E-04
<i>ACSS1</i>	Acyl-CoA synthetase short chain family member 1	HGNC:16091	-3.163	1.20E-44
<i>SEPTIN4</i>	Septin 4	HGNC:9165	-2.874	5.82E-25
<i>PDK4</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase 4	HGNC:8812	-2.842	1.89E-04
<i>ALDH1L1</i>	Aldehyde dehydrogenase 1 family member L1	HGNC:3978	-2.628	1.81E-05
<i>ABCA9</i>	ATP binding cassette subfamily A member 9	HGNC:39	-1.925	1.02E-12
<i>MGARP</i>	Mitochondria localized glutamic acid rich protein	HGNC:29969	-1.691	4.61E-31
<i>SLC25A27</i>	Solute carrier family 25 member 27	HGNC:21065	-1.621	7.07E-10
<i>ADHFE1</i>	Alcohol dehydrogenase iron containing 1	HGNC:16354	-1.616	8.84E-14
<i>BDH1</i>	3-hydroxybutyrate dehydrogenase 1	HGNC:1027	-1.445	1.12E-05
<i>ABAT</i>	4-aminobutyrate aminotransferase	HGNC:23	-1.434	2.04E-11
<i>MCCC1</i>	Methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit 1	HGNC:6936	-1.357	1.10E-31
<i>SQOR</i>	Sulfide quinone oxidoreductase	HGNC:20390	-1.231	3.35E-14
<i>STOM</i>	Stomatin	HGNC:3383	-1.208	5.48E-30
<i>CYP27A1</i>	Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1	HGNC:2605	-1.192	3.07E-07
<i>AASS</i>	Amino adipate-semialdehyde synthase	HGNC:17366	-1.186	8.49E-17
<i>HSDL2</i>	Hydroxysteroid dehydrogenase like 2	HGNC:18572	-1.156	1.19E-34
<i>ALDH6A1</i>	Aldehyde dehydrogenase 6 family member A1	HGNC:7179	-1.114	7.32E-11

<i>ALDH4A1</i>	Aldehyde dehydrogenase 4 family member A1	HGNC:406	-0.987	6.18E-12
<i>OMA1</i>	OMA1 zinc metallopeptidase	HGNC:29661	-0.984	1.01E-06
<i>MICU3</i>	Mitochondrial calcium uptake family member 3	HGNC:27820	-0.946	2.80E-06
<i>KYAT3</i>	Kynurenine aminotransferase 3	HGNC:33238	-0.944	6.46E-08
<i>MGST1</i>	Microsomal glutathione S-transferase 1	HGNC:7061	-0.941	8.58E-18
<i>MOCS1</i>	Molybdenum cofactor synthesis 1	HGNC:7190	-0.917	1.29E-18
<i>TXNRD1</i>	Thioredoxin reductase 1	HGNC:12437	-0.915	7.52E-17
<i>ALDH3A2</i>	Aldehyde dehydrogenase 3 family member A2	HGNC:403	-0.866	5.34E-11
<i>ALDH5A1</i>	Aldehyde dehydrogenase 5 family member A1	HGNC:408	-0.759	4.14E-03
<i>PPM1K</i>	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent 1K	HGNC:25415	-0.755	3.40E-05
<i>MTARC1</i>	Mitochondrial amidoxime reducing component 1	HGNC:26189	-0.751	1.57E-02
<i>SCP2</i>	Sterol carrier protein 2	HGNC:10606	-0.749	8.11E-24
<i>DMPK</i>	DM1 protein kinase	HGNC:2933	-0.738	1.65E-08
<i>HEBP1</i>	Heme binding protein 1	HGNC:17176	-0.735	2.64E-18
<i>LACTB2</i>	Lactamase beta 2	HGNC:18512	-0.735	3.25E-05
<i>COQ8A</i>	Coenzyme Q8A	HGNC:16812	-0.728	3.55E-06
<i>LAP3</i>	Leucine aminopeptidase 3	HGNC:18449	-0.720	1.50E-07
<i>ARG2</i>	Arginase 2	HGNC:664	-0.716	1.23E-02
<i>TCAIM</i>	T cell activation inhibitor, mitochondrial	HGNC:25241	-0.704	2.16E-07
<i>CPT1A</i>	Carnitine palmitoyltransferase 1A	HGNC:2328	-0.687	4.65E-13
<i>PREPL</i>	Prolyl endopeptidase like	HGNC:30228	-0.667	3.50E-11
<i>DGLUCY</i>	D-glutamate cyclase	HGNC:20498	-0.649	1.13E-11
<i>HIBADH</i>	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	HGNC:4907	-0.638	4.32E-12
<i>AK3</i>	Adenylate kinase 3	HGNC:17376	-0.596	1.08E-16
<i>OXCT1</i>	3-oxoacid CoA-transferase 1	HGNC:8527	-0.584	1.93E-06
<i>MTERF2</i>	Mitochondrial transcription termination factor 2	HGNC:30779	-0.582	3.94E-04
<i>SLC25A45</i>	Solute carrier family 25 member 45	HGNC:27442	-0.582	2.39E-02
<i>FAM210B</i>	Family with sequence similarity 210 member B	HGNC:16102	-0.576	1.17E-12
<i>SETD9</i>	SET domain containing 9	HGNC:28508	-0.575	1.91E-02
<i>CMC1</i>	C-X9-C motif containing 1	HGNC:28783	-0.567	1.58E-04
<i>LYRM9</i>	LYR motif containing 9	HGNC:27314	-0.566	9.45E-03
<i>DHTKD1</i>	Dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1	HGNC:23537	-0.564	7.48E-09
<i>PPIF</i>	Peptidylprolyl isomerase F	HGNC:9259	-0.563	6.60E-10
<i>ACADSB</i>	Acyl-CoA dehydrogenase short/branched chain	HGNC:91	-0.561	1.82E-06
<i>SLC8B1</i>	Solute carrier family 8 member B1	HGNC:26175	-0.557	3.41E-04
<i>ACCS</i>	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homolog (inactive)	HGNC:23989	-0.556	3.07E-05
<i>STX17</i>	Syntaxin 17	HGNC:11432	-0.550	3.22E-05
<i>GPD2</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	HGNC:4456	-0.547	2.39E-04
<i>ECHDC2</i>	Enoyl-CoA hydratase domain containing 2	HGNC:23408	-0.542	5.04E-06
<i>SUCLG2</i>	Succinate-CoA ligase GDP-forming subunit beta	HGNC:11450	-0.537	3.91E-10
<i>ECI2</i>	Enoyl-CoA delta isomerase 2	HGNC:14601	-0.529	8.86E-12
<i>FH</i>	Fumarate hydratase	HGNC:3700	-0.521	2.68E-15
<i>EHHADH</i>	Enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase	HGNC:3247	-0.520	1.04E-03
<i>HTATIP2</i>	HIV-1 Tat interactive protein 2	HGNC:16637	-0.519	1.17E-06
<i>DMAC2L</i>	Distal membrane arm assembly component 2 like	HGNC:18799	-0.518	6.85E-04
<i>MTARC2</i>	Mitochondrial amidoxime reducing component 2	HGNC:26064	-0.509	1.01E-04
<i>COQ2</i>	Coenzyme Q2, polyprenyltransferase	HGNC:25223	-0.507	6.00E-03
<i>MRPS24</i>	Mitochondrial ribosomal protein S24	HGNC:14510	-0.499	1.20E-07
<i>SLC25A29</i>	Solute carrier family 25 member 29	HGNC:20116	-0.490	1.94E-02

<i>MGST3</i>	Microsomal glutathione S-transferase 3	HGNC:7064	-0.489	1.16E-09
<i>DECR1</i>	2,4-dienoyl-CoA reductase 1	HGNC:2753	-0.485	1.75E-12
<i>GSTK1</i>	Glutathione S-transferase kappa 1	HGNC:16906	-0.483	4.34E-07
<i>SFXN2</i>	Sideroflexin 2	HGNC:16086	-0.470	2.29E-02
<i>UQCC1</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex assembly factor 1	HGNC:15891	-0.463	5.06E-16
<i>PPA2</i>	Inorganic pyrophosphatase 2	HGNC:28883	-0.462	2.11E-05
<i>ETFDH</i>	Electron transfer flavoprotein dehydrogenase	HGNC:3483	-0.451	1.57E-06
<i>SLC25A1</i>	Solute carrier family 25 member 1	HGNC:10979	-0.451	1.02E-02
<i>MSRA</i>	Methionine sulfoxide reductase A	HGNC:7377	-0.447	2.36E-04
<i>PDP1</i>	Pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 1	HGNC:9279	-0.445	9.29E-05
<i>ACAT1</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase 1	HGNC:93	-0.441	2.38E-07
<i>CAT</i>	Catalase	HGNC:1516	-0.440	3.41E-06
<i>BCL2L1</i>	BCL2 like 1	HGNC:992	-0.437	8.27E-05
<i>OSBPL1A</i>	Oxysterol binding protein like 1A	HGNC:16398	-0.436	8.48E-05
<i>NDUFC1</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit C1	HGNC:7705	-0.435	1.63E-05
<i>SPR</i>	Sepiapterin reductase	HGNC:11257	-0.432	1.67E-03
<i>HIGD1A</i>	HIG1 hypoxia inducible domain family member 1A	HGNC:29527	-0.431	4.67E-02

Tabla IV.3. Análisis de expresión diferencial de genes que codifican proteínas mitocondriales (mito-DEGs) utilizando datos de secuenciación de ARN de hHSC tratadas con TGF- β + RPV4 frente a TGF- β . Se muestran los mito-DEGs regulados al alza y a la baja. Las hHSC se trataron con TGF- β solo (2,5 ng/mL) o en presencia de RPV 4 μ M durante 48 h ($n=6$), p valor <0,05. Los genes se listan según el valor de FC (*fold change*, magnitud de cambio).

TGF- β + RPV4 frente a TGF- β REGULADO AL ALZA				
hgnc_símbolo	Descripción	HGNC símbolo. Acc.	Log 2FC	p valor ajustado
<i>C15orf48</i>	Chromosome 15 open reading frame 48	HGNC:29898	1.149	6.60E-03
<i>MTARC1</i>	Mitochondrial amidoxime reducing component 1	HGNC:26189	0.551	4.80E-02
<i>PMAIP1</i>	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	HGNC:9108	0.455	1.17E-02
<i>IFI27</i>	Interferon alpha inducible protein 27	HGNC:5397	0.448	3.64E-02
<i>FTH1</i>	Ferritin heavy chain 1	HGNC:3976	0.419	3.00E-03
<i>FDXR</i>	Ferredoxin reductase	HGNC:3642	0.409	3.96E-05
<i>CPT1B</i>	Carnitine palmitoyltransferase 1B	HGNC:2329	0.397	2.47E-02
<i>ABHD11</i>	Abhydrolase domain containing 11	HGNC:16407	0.372	9.57E-03
<i>C15orf61</i>	Chromosome 15 open reading frame 61	HGNC:34453	0.343	4.44E-02
<i>NDUFA4</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 4	HGNC:21034	0.340	3.02E-02
<i>RMND1</i>	Required for meiotic nuclear division 1 homolog	HGNC:21176	0.320	3.15E-03
<i>TRMT61B</i>	tRNA methyltransferase 61B	HGNC:26070	0.318	8.03E-03
<i>CMC1</i>	C-X9-C motif containing 1	HGNC:28783	0.305	3.02E-02
<i>SLC25A37</i>	Solute carrier family 25 member 37	HGNC:29786	0.303	7.79E-03
<i>ACSS3</i>	Acyl-CoA synthetase short chain family member 3	HGNC:24723	0.302	3.07E-02
<i>ACSF2</i>	Acyl-CoA synthetase family member 2	HGNC:26101	0.295	1.90E-02
<i>TRMT5</i>	tRNA methyltransferase 5	HGNC:23141	0.291	1.47E-02

<i>ALDH9A1</i>	Aldehyde dehydrogenase 9 family member A1	HGNC:412	0.276	1.01E-03
<i>WARS2</i>	Tryptophanyl tRNA synthetase 2, mitochondrial	HGNC:12730	0.275	4.40E-02
<i>HSPA9</i>	Heat shock protein family A (Hsp70) member 9	HGNC:5244	0.270	1.72E-03
<i>ME3</i>	Malic enzyme 3	HGNC:6985	0.266	1.62E-03
<i>UQCC2</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex assembly factor 2	HGNC:21237	0.262	1.59E-02
<i>QRSL1</i>	Glutamyl-tRNA amidotransferase subunit QRSL1	HGNC:21020	0.258	1.64E-02
<i>DGLUCY</i>	D-glutamate cyclase	HGNC:20498	0.252	7.14E-03
<i>PPA2</i>	Inorganic pyrophosphatase 2	HGNC:28883	0.250	1.38E-02
<i>MTO1</i>	Mitochondrial tRNA translation optimization 1	HGNC:19261	0.247	6.42E-03
<i>XPNPEP3</i>	X-prolyl aminopeptidase 3	HGNC:28052	0.245	1.16E-02
<i>RMDN1</i>	Regulator of microtubule dynamics 1	HGNC:24285	0.227	1.64E-03
<i>NDUFS4</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit S4	HGNC:7711	0.220	2.11E-03
<i>HSDL2</i>	Hydroxysteroid dehydrogenase like 2	HGNC:18572	0.206	3.35E-02
<i>SUPV3L1</i>	Suv3 like RNA helicase	HGNC:11471	0.192	3.52E-02
<i>SPIRE1</i>	Spire type actin nucleation factor 1	HGNC:30622	0.190	2.29E-02
<i>NDUFA12</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A12	HGNC:23987	0.189	2.66E-02
<i>HEBP1</i>	Heme binding protein 1	HGNC:17176	0.189	2.37E-02
<i>GFM2</i>	GTP dependent ribosome recycling factor mitochondrial 2	HGNC:29682	0.178	4.72E-02
<i>COQ5</i>	Coenzyme Q5, methyltransferase	HGNC:28722	0.177	2.74E-02
<i>MRPS16</i>	Mitochondrial ribosomal protein S16	HGNC:14048	0.163	1.78E-02
<i>GHITM</i>	Growth hormone inducible transmembrane protein	HGNC:17281	0.163	2.09E-03
<i>GARS1</i>	Glycyl-tRNA synthetase 1	HGNC:4162	0.152	3.11E-02
<i>HADHB</i>	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta	HGNC:4803	0.152	2.73E-03
<i>BAX</i>	BCL2 associated X, apoptosis regulator	HGNC:959	0.149	4.77E-02
<i>HINT1</i>	Histidine triad nucleotide binding protein 1	HGNC:4912	0.149	4.46E-02

TGF- β + RPV4 frente a TGF- β REGULADO A LA BAJA				
hgnc_símbolo	Descripción	HGNC símbolo. Acc.	Log 2FC	p valor ajustado
<i>BDH1</i>	3-hydroxybutyrate dehydrogenase 1	HGNC:1027	-0.802	3.06E-02
<i>FASN</i>	Fatty acid synthase	HGNC:3594	-0.686	4.62E-04
<i>MMAB</i>	Metabolism of cobalamin associated B	HGNC:19331	-0.669	2.41E-04
<i>IDI1</i>	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	HGNC:5387	-0.623	3.29E-02
<i>MTHFS</i>	Methenyltetrahydrofolate synthetase	HGNC:7437	-0.602	4.19E-03
<i>CRY1</i>	Cryptochrome circadian regulator 1	HGNC:2384	-0.591	3.24E-09
<i>FDPS</i>	Farnesyl diphosphate synthase	HGNC:3631	-0.571	3.49E-03
<i>PRXL2A</i>	Peroxiredoxin like 2A	HGNC:28651	-0.551	2.26E-02
<i>ENDOG</i>	Endonuclease G	HGNC:3346	-0.544	1.70E-02
<i>ALDH1B1</i>	Aldehyde dehydrogenase 1 family member B1	HGNC:407	-0.478	1.32E-02
<i>GCAT</i>	Glycine C-acetyltransferase	HGNC:4188	-0.470	9.73E-04
<i>ABAT</i>	4-aminobutyrate aminotransferase	HGNC:23	-0.470	4.07E-02

<i>SLC25A1</i>	Solute carrier family 25 member 1	HGNC:10979	-0.438	4.46E-03
<i>PXMP4</i>	Peroxisomal membrane protein 4	HGNC:15920	-0.407	1.73E-02
<i>SLC25A4</i>	Solute carrier family 25 member 4	HGNC:10990	-0.379	2.04E-03
<i>MPV17L2</i>	MPV17 mitochondrial inner membrane protein like 2	HGNC:28177	-0.373	6.81E-04
<i>SLC25A23</i>	Solute carrier family 25 member 23	HGNC:19375	-0.349	7.02E-04
<i>AADAT</i>	Amino adipate aminotransferase	HGNC:17929	-0.346	1.22E-02
<i>FKBP10</i>	FKBP prolyl isomerase 10	HGNC:18169	-0.345	1.36E-03
<i>TST</i>	Thiosulfate sulfurtransferase	HGNC:12388	-0.322	1.56E-02
<i>RECQL4</i>	RecQ like helicase 4	HGNC:9949	-0.317	4.81E-02
<i>ALDH4A1</i>	Aldehyde dehydrogenase 4 family member A1	HGNC:406	-0.296	3.88E-02
<i>PDK1</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase 1	HGNC:8809	-0.289	4.29E-02
<i>BOLA3</i>	BolA family member 3	HGNC:24415	-0.274	2.24E-02
<i>HDHD5</i>	Haloacid dehalogenase like hydrolase domain containing 5	HGNC:1843	-0.264	1.93E-02
<i>MPC1</i>	Mitochondrial pyruvate carrier 1	HGNC:21606	-0.253	3.64E-02
<i>ALDH18A1</i>	Aldehyde dehydrogenase 18 family member A1	HGNC:9722	-0.249	2.34E-02
<i>IDH2</i>	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2	HGNC:5383	-0.249	2.45E-02
<i>SELENOO</i>	Selenoprotein O	HGNC:30395	-0.223	4.27E-02
<i>MPST</i>	Mercaptopyruvate sulfurtransferase	HGNC:7223	-0.216	4.14E-02
<i>ACLY</i>	ATP citrate lyase	HGNC:115	-0.215	1.08E-02
<i>DBI</i>	Diazepam binding inhibitor, acyl-CoA binding protein	HGNC:2690	-0.201	2.15E-02
<i>SFXN3</i>	Sideroflexin 3	HGNC:16087	-0.199	3.05E-04
<i>LETM1</i>	Leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 1	HGNC:6556	-0.194	1.91E-03
<i>ACACA</i>	Acetyl-CoA carboxylase alpha	HGNC:84	-0.188	2.43E-02
<i>TOMM40</i>	Translocase of outer mitochondrial membrane 40	HGNC:18001	-0.186	3.37E-02
<i>MYO19</i>	Myosin XIX	HGNC:26234	-0.165	2.51E-02
<i>MSRB3</i>	Methionine sulfoxide reductase B3	HGNC:27375	-0.156	2.18E-02
<i>PITRM1</i>	Pitriylsin metalloproteinase 1	HGNC:17663	-0.144	3.51E-03
<i>BNIP3L</i>	BCL2 interacting protein 3 like	HGNC:1085	-0.142	4.61E-02
<i>PISD</i>	Phosphatidylserine decarboxylase	HGNC:8999	-0.140	1.67E-02
<i>CYB5B</i>	Cytochrome b5 type B	HGNC:24374	-0.137	4.15E-02
<i>PDHB</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta	HGNC:8808	-0.127	2.85E-02

Tabla IV.4. Análisis de expresión diferencial de genes que codifican proteínas mitocondriales (mito-DEGs) utilizando datos de secuenciación de ARN de hHSC tratadas con TGF- β + RPV8 frente a TGF- β . Se muestran los mito-DEGs regulados al alza y a la baja. Las hHSC se trataron con TGF- β solo (2,5 ng/mL) o en presencia de RPV 8 μ M durante 48 h ($n=6$), p valor ajustado $<0,05$. Los genes se listan según el valor de FC (*fold change*, magnitud de cambio).

TGF- β +RPV8 frente a TGF- β REGULADO AL ALZA				
hgnc_ símbolo	Descripción	HGNC símbolo. Acc.	Log 2FC	p valor ajustado
<i>C15orf48</i>	Chromosome 15 open reading frame 48	HGNC:29898	2.210	5.38E-06
<i>PK4</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase 4	HGNC:8812	2.166	1.84E-02
<i>PDE2A</i>	Phosphodiesterase 2A	HGNC:8777	1.178	2.07E-02
<i>IFI27</i>	Interferon alpha inducible protein 27	HGNC:5397	0.887	7.25E-04
<i>FTH1</i>	Ferritin heavy chain 1	HGNC:3976	0.820	9.11E-07
<i>SETD9</i>	SET domain containing 9	HGNC:28508	0.669	1.44E-02
<i>SQOR</i>	Sulfide quinone oxidoreductase	HGNC:20390	0.620	1.40E-03
<i>UQCC2</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex assembly factor 2	HGNC:21237	0.579	7.09E-06
<i>PMAIP1</i>	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	HGNC:9108	0.553	1.69E-02
<i>PNPT1</i>	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	HGNC:23166	0.541	1.80E-02
<i>RMND1</i>	Required for meiotic nuclear division 1 homolog	HGNC:21176	0.536	3.07E-05
<i>MICU3</i>	Mitochondrial calcium uptake family member 3	HGNC:27820	0.534	3.52E-02
<i>TMEM126B</i>	Transmembrane protein 126B	HGNC:30883	0.529	3.31E-05
<i>SLC25A37</i>	Solute carrier family 25 member 37	HGNC:29786	0.514	1.98E-04
<i>SPIRE1</i>	Spire type actin nucleation factor 1	HGNC:30622	0.495	3.72E-07
<i>MTERF2</i>	Mitochondrial transcription termination factor 2	HGNC:30779	0.486	1.19E-02
<i>PPA2</i>	Inorganic pyrophosphatase 2	HGNC:28883	0.480	7.61E-05
<i>SLC25A30</i>	Solute carrier family 25 member 30	HGNC:27371	0.477	8.46E-03
<i>RHOT1</i>	Ras homolog family member T1	HGNC:21168	0.467	7.81E-04
<i>SUPV3L1</i>	Suv3 like RNA helicase	HGNC:11471	0.464	1.45E-05
<i>KYAT3</i>	Kynurenine aminotransferase 3	HGNC:33238	0.459	3.50E-02
<i>MTERF3</i>	Mitochondrial transcription termination factor 3	HGNC:24258	0.453	1.75E-02
<i>HSPA9</i>	Heat shock protein family A (Hsp70) member 9	HGNC:5244	0.446	1.65E-05
<i>FASTKD2</i>	FAST kinase domains 2	HGNC:29160	0.431	4.97E-02
<i>ACSS3</i>	Acyl-CoA synthetase short chain family member 3	HGNC:24723	0.429	1.61E-02
<i>WARS2</i>	Tryptophanyl tRNA synthetase 2, mitochondrial	HGNC:12730	0.425	1.32E-02

<i>ETFDH</i>	Electron transfer flavoprotein dehydrogenase	HGNC:3483	0.422	7.19E-05
<i>PHYH</i>	Phytanoyl-CoA 2-hydroxylase	HGNC:8940	0.415	6.75E-03
<i>TRIAF1</i>	TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1	HGNC:26937	0.412	1.55E-03
<i>METTL15</i>	Methyltransferase like 15	HGNC:26606	0.411	2.63E-03
<i>LRPPRC</i>	Leucine rich pentatricopeptide repeat containing	HGNC:15714	0.408	6.56E-04
<i>MTARC2</i>	Mitochondrial amidoxime reducing component 2	HGNC:26064	0.406	8.31E-03
<i>DGLUCY</i>	D-glutamate cyclase	HGNC:20498	0.403	3.75E-04
<i>MIPEP</i>	Mitochondrial intermediate peptidase	HGNC:7104	0.402	1.98E-04
<i>MICU2</i>	Mitochondrial calcium uptake 2	HGNC:31830	0.401	7.94E-04
<i>HADH</i>	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	HGNC:4799	0.400	5.41E-05
<i>TRMT5</i>	tRNA methyltransferase 5	HGNC:23141	0.396	8.08E-03
<i>MMAA</i>	Metabolism of cobalamin associated A	HGNC:18871	0.390	1.46E-02
<i>TRMT10C</i>	tRNA methyltransferase 10C, mitochondrial RNase P subunit	HGNC:26022	0.386	9.73E-03
<i>FDXR</i>	Ferredoxin reductase	HGNC:3642	0.384	1.91E-03
<i>HSDL2</i>	Hydroxysteroid dehydrogenase like 2	HGNC:18572	0.376	1.56E-03
<i>LYRM1</i>	LYR motif containing 1	HGNC:25074	0.375	1.33E-03
<i>LAP3</i>	Leucine aminopeptidase 3	HGNC:18449	0.373	2.51E-02
<i>ME2</i>	Malic enzyme 2	HGNC:6984	0.369	4.47E-03
<i>MGST1</i>	Microsomal glutathione S-transferase 1	HGNC:7061	0.365	6.43E-03
<i>HEBP1</i>	Heme binding protein 1	HGNC:17176	0.365	2.93E-04
<i>CHPT1</i>	Choline phosphotransferase 1	HGNC:17852	0.359	1.19E-02
<i>ME3</i>	Malic enzyme 3	HGNC:6985	0.354	5.57E-04
<i>PTRH2</i>	Peptidyl-tRNA hydrolase 2	HGNC:24265	0.351	5.92E-03
<i>SLC25A13</i>	Solute carrier family 25 member 13	HGNC:10983	0.345	2.06E-02
<i>ACSF2</i>	Acyl-CoA synthetase family member 2	HGNC:26101	0.343	3.72E-02
<i>XPNPEP3</i>	X-prolyl aminopeptidase 3	HGNC:28052	0.341	4.48E-03
<i>HTATIP2</i>	HIV-1 Tat interactive protein 2	HGNC:16637	0.339	7.49E-03
<i>HADHB</i>	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta	HGNC:4803	0.335	8.35E-09
<i>ACAT1</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase 1	HGNC:93	0.333	7.25E-04
<i>AK3</i>	Adenylate kinase 3	HGNC:17376	0.331	1.21E-04
<i>QRSL1</i>	Glutaminyl-tRNA amidotransferase subunit QRSL1	HGNC:21020	0.330	1.59E-02
<i>MTO1</i>	Mitochondrial tRNA translation optimization 1	HGNC:19261	0.325	4.04E-03
<i>NDUFS4</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit S4	HGNC:7711	0.324	1.89E-04

<i>SERAC1</i>	Serine active site containing 1	HGNC:21061	0.324	1.70E-02
<i>ECHDC1</i>	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase 1	HGNC:21489	0.324	1.95E-04
<i>MTPAP</i>	Mitochondrial poly(A) polymerase	HGNC:25532	0.319	1.71E-02
<i>MRPS10</i>	Mitochondrial ribosomal protein S10	HGNC:14502	0.318	1.91E-03
<i>RDH14</i>	Retinol dehydrogenase 14	HGNC:19979	0.312	1.91E-02
<i>COQ5</i>	Coenzyme Q5, methyltransferase	HGNC:28722	0.309	1.68E-03
<i>STOM</i>	Stomatin	HGNC:3383	0.308	2.16E-02
<i>GSR</i>	Glutathione-disulfide reductase	HGNC:4623	0.304	9.26E-03
<i>LDHB</i>	Lactate dehydrogenase B	HGNC:6541	0.298	6.49E-06
<i>UQCRB</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	HGNC:12582	0.297	5.63E-05
<i>ISCU</i>	Iron-sulfur cluster assembly enzyme	HGNC:29882	0.294	4.71E-03
<i>ACOT13</i>	Acyl-CoA thioesterase 13	HGNC:20999	0.290	4.20E-02
<i>COX7A2L</i>	Cytochrome c oxidase subunit 7A2 like	HGNC:2289	0.289	6.63E-04
<i>HINT1</i>	Histidine triad nucleotide binding protein 1	HGNC:4912	0.288	1.76E-03
<i>TMEM126A</i>	Transmembrane protein 126A	HGNC:25382	0.286	3.39E-02
<i>METTL8</i>	Methyltransferase 8, methylcytidine	HGNC:25856	0.281	3.15E-02
<i>TFB1M</i>	Transcription factor B1, mitochondrial	HGNC:17037	0.280	3.11E-02
<i>MRPS22</i>	Mitochondrial ribosomal protein S22	HGNC:14508	0.279	1.43E-03
<i>MTIF3</i>	Mitochondrial translational initiation factor 3	HGNC:29788	0.278	2.92E-02
<i>NDUFA12</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A12	HGNC:23987	0.276	1.05E-02
<i>PLPBP</i>	Pyridoxal phosphate binding protein	HGNC:9457	0.275	4.27E-02
<i>SUCLG2</i>	Succinate-CoA ligase GDP-forming subunit beta	HGNC:11450	0.270	1.03E-02
<i>LACTB</i>	Lactamase beta	HGNC:16468	0.269	2.51E-03
<i>MRPL45</i>	Mitochondrial ribosomal protein L45	HGNC:16651	0.265	3.87E-03
<i>NRDC</i>	Nardilysin convertase	HGNC:7995	0.264	5.92E-06
<i>ALDH9A1</i>	Aldehyde dehydrogenase 9 family member A1	HGNC:412	0.264	1.44E-02
<i>DNAJC15</i>	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C15	HGNC:20325	0.257	1.64E-02
<i>MCUR1</i>	Mitochondrial calcium uniporter regulator 1	HGNC:21097	0.253	4.63E-02
<i>MRPL35</i>	Mitochondrial ribosomal protein L35	HGNC:14489	0.250	4.89E-02
<i>GLOD4</i>	Glyoxalase domain containing 4	HGNC:14111	0.248	9.19E-03
<i>ALAS1</i>	5'-aminolevulinatase synthase 1	HGNC:396	0.247	3.04E-02
<i>TK2</i>	Thymidine kinase 2	HGNC:11831	0.241	4.48E-02
<i>MRPL44</i>	Mitochondrial ribosomal protein L44	HGNC:16650	0.241	3.31E-02
<i>GHITM</i>	Growth hormone inducible transmembrane protein	HGNC:17281	0.241	1.80E-04

<i>MRPL13</i>	Mitochondrial ribosomal protein L13	HGNC:14278	0.238	3.06E-02
<i>TOMM20</i>	Translocase of outer mitochondrial membrane 20	HGNC:20947	0.233	9.23E-03
<i>MGST3</i>	Microsomal glutathione S-transferase 3	HGNC:7064	0.229	2.07E-02
<i>NIT2</i>	Nitrilase family member 2	HGNC:29878	0.224	8.09E-03
<i>ATP5PD</i>	ATP synthase peripheral stalk subunit d	HGNC:845	0.214	5.34E-03
<i>UQCRC2</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2	HGNC:12586	0.212	6.04E-04
<i>MRPS16</i>	Mitochondrial ribosomal protein S16	HGNC:14048	0.210	1.74E-02
<i>PARL</i>	Presenilin associated rhomboid like	HGNC:18253	0.207	3.05E-02
<i>GARS1</i>	Glycyl-tRNA synthetase 1	HGNC:4162	0.199	3.03E-02
<i>DECR1</i>	2,4-dienoyl-CoA reductase 1	HGNC:2753	0.198	2.31E-02
<i>CLPX</i>	Caseinolytic mitochondrial matrix peptidase chaperone subunit X	HGNC:2088	0.196	1.80E-02
<i>HADHA</i>	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha	HGNC:4801	0.192	8.37E-04
<i>MCL1</i>	MCL1 apoptosis regulator, BCL2 family member	HGNC:6943	0.175	6.74E-03
<i>IARS2</i>	Isoleucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	HGNC:29685	0.175	3.65E-02
<i>TMEM14C</i>	Transmembrane protein 14C	HGNC:20952	0.160	1.69E-02
<i>YME1L1</i>	YME1 like 1 ATPase	HGNC:12843	0.158	3.48E-02
<i>MFF</i>	Mitochondrial fission factor	HGNC:24858	0.150	4.73E-02

TGF-β + RPV8 frente a TGF-β REGULADO A LA BAJA				
hgnc_ símbolo	Descripción	HGNC símbolo. Acc.	Log 2FC	p valor ajustado
<i>FKBP10</i>	FKBP prolyl isomerase 10	HGNC:18169	-0.957	2.97E-15
<i>GCAT</i>	Glycine C-acetyltransferase	HGNC:4188	-0.886	2.40E-07
<i>CRY1</i>	Cryptochrome circadian regulator 1	HGNC:2384	-0.802	4.24E-12
<i>SFXN2</i>	Sideroflexin 2	HGNC:16086	-0.751	2.63E-03
<i>ALDH1B1</i>	Aldehyde dehydrogenase 1 family member B1	HGNC:407	-0.715	3.16E-03
<i>RECQL4</i>	RecQ like helicase 4	HGNC:9949	-0.679	7.65E-04
<i>NT5DC2</i>	5'-nucleotidase domain containing 2	HGNC:25717	-0.655	8.79E-05
<i>ENDOG</i>	Endonuclease G	HGNC:3346	-0.609	4.30E-02
<i>MTHFS</i>	Methenyltetrahydrofolate synthetase	HGNC:7437	-0.563	4.05E-02
<i>SLC25A42</i>	Solute carrier family 25 member 42	HGNC:28380	-0.563	2.11E-03
<i>MPST</i>	Mercaptopyruvate sulfurtransferase	HGNC:7223	-0.545	2.41E-05
<i>TST</i>	Thiosulfate sulfurtransferase	HGNC:12388	-0.529	1.46E-03
<i>ISOC2</i>	Isochorismatase domain containing 2	HGNC:26278	-0.521	1.13E-04

<i>NTHL1</i>	Nth like DNA glycosylase 1	HGNC:8028	-0.518	8.29E-03
<i>IDH2</i>	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2	HGNC:5383	-0.512	1.59E-04
<i>PXMP2</i>	Peroxisomal membrane protein 2	HGNC:9716	-0.506	1.39E-02
<i>PXMP4</i>	Peroxisomal membrane protein 4	HGNC:15920	-0.491	2.80E-02
<i>CASP9</i>	Caspase 9	HGNC:1511	-0.474	1.71E-03
<i>SLC25A4</i>	Solute carrier family 25 member 4	HGNC:10990	-0.471	2.14E-03
<i>ROMO1</i>	Reactive oxygen species modulator 1	HGNC:16185	-0.466	1.76E-03
<i>ETFB</i>	Electron transfer flavoprotein subunit beta	HGNC:3482	-0.459	1.61E-03
<i>PYCR1</i>	Pyroline-5-carboxylate reductase 1	HGNC:9721	-0.458	3.33E-03
<i>ALDH18A1</i>	Aldehyde dehydrogenase 18 family member A1	HGNC:9722	-0.454	8.34E-04
<i>MPV17L2</i>	MPV17 mitochondrial inner membrane protein like 2	HGNC:28177	-0.438	1.28E-03
<i>CLPP</i>	Caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit	HGNC:2084	-0.428	3.77E-03
<i>ACP6</i>	Acid phosphatase 6, lysophosphatidic	HGNC:29609	-0.421	3.19E-02
<i>DTYMK</i>	Deoxythymidylate kinase	HGNC:3061	-0.412	4.51E-03
<i>PUSL1</i>	Pseudouridine synthase like 1	HGNC:26914	-0.402	3.76E-03
<i>ALKBH7</i>	AlkB homolog 7	HGNC:21306	-0.398	3.65E-02
<i>PICK1</i>	Protein interacting with PRKCA 1	HGNC:9394	-0.396	2.34E-03
<i>HDHD5</i>	Haloacid dehalogenase like hydrolase domain containing 5	HGNC:1843	-0.395	5.66E-03
<i>MPC1</i>	Mitochondrial pyruvate carrier 1	HGNC:21606	-0.385	1.37E-02
<i>PPOX</i>	Protoporphyrinogen oxidase	HGNC:9280	-0.383	9.96E-03
<i>FOXRED1</i>	FAD dependent oxidoreductase domain containing 1	HGNC:26927	-0.383	3.28E-03
<i>NLRX1</i>	NLR family member X1	HGNC:29890	-0.373	1.68E-02
<i>GFER</i>	Growth factor, augments of liver regeneration	HGNC:4236	-0.367	1.10E-02
<i>SLC25A22</i>	Solute carrier family 25 member 22	HGNC:19954	-0.364	1.23E-02
<i>MIGA2</i>	Mitoguardin 2	HGNC:23621	-0.359	6.17E-03
<i>TOMM40</i>	Translocase of outer mitochondrial membrane 40	HGNC:18001	-0.352	1.21E-03
<i>ATP5F1D</i>	ATP synthase F1 subunit delta	HGNC:837	-0.348	1.49E-02
<i>GPAT2</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 2, mitochondrial	HGNC:27168	-0.346	4.41E-02
<i>SELENOO</i>	Selenoprotein O	HGNC:30395	-0.344	1.53E-02
<i>MRPL28</i>	Mitochondrial ribosomal protein L28	HGNC:14484	-0.344	1.10E-03
<i>TIMM13</i>	Translocase of inner mitochondrial membrane 13	HGNC:11816	-0.342	4.48E-03
<i>ATAD3A</i>	ATPase family AAA domain containing 3A	HGNC:25567	-0.339	1.05E-02
<i>GCDH</i>	Glutaryl-CoA dehydrogenase	HGNC:4189	-0.337	3.41E-02

<i>SPHK2</i>	Sphingosine kinase 2	HGNC:18859	-0.336	3.38E-03
<i>LETM1</i>	Leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 1	HGNC:6556	-0.335	8.47E-06
<i>DMPK</i>	DM1 protein kinase	HGNC:2933	-0.333	4.10E-02
<i>FASTK</i>	Fas activated serine/threonine kinase	HGNC:24676	-0.327	1.19E-04
<i>MRPS12</i>	Mitochondrial ribosomal protein S12	HGNC:10380	-0.323	6.38E-03
<i>NDUFB7</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B7	HGNC:7702	-0.307	1.78E-02
<i>MRPL4</i>	Mitochondrial ribosomal protein L4	HGNC:14276	-0.307	1.28E-03
<i>CYB5R3</i>	Cytochrome b5 reductase 3	HGNC:2873	-0.301	3.83E-03
<i>ABCB8</i>	ATP binding cassette subfamily B member 8	HGNC:49	-0.297	1.10E-03
<i>PRKACA</i>	Protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha	HGNC:9380	-0.295	8.62E-03
<i>MCCC2</i>	Methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit 2	HGNC:6937	-0.287	1.39E-02
<i>FIS1</i>	Fission, mitochondrial 1	HGNC:21689	-0.287	4.23E-02
<i>NDUFA11</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A11	HGNC:20371	-0.283	1.44E-02
<i>ACOT7</i>	Acyl-CoA thioesterase 7	HGNC:24157	-0.279	2.72E-02
<i>BCAT2</i>	Branched chain amino acid transaminase 2	HGNC:977	-0.279	4.06E-02
<i>TSPO</i>	Translocator protein	HGNC:1158	-0.270	4.44E-02
<i>BCKDK</i>	Branched chain keto acid dehydrogenase kinase	HGNC:16902	-0.265	3.89E-02
<i>PRDX2</i>	Peroxiredoxin 2	HGNC:9353	-0.261	1.22E-02
<i>MYO19</i>	Myosin XIX	HGNC:26234	-0.261	4.98E-03
<i>HAGH</i>	Hydroxyacylglutathione hydrolase	HGNC:4805	-0.253	4.29E-02
<i>AURKAIP1</i>	Aurora kinase A interacting protein 1	HGNC:24114	-0.250	1.98E-02
<i>CHCHD2</i>	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	HGNC:21645	-0.248	2.80E-02
<i>RNASEH1</i>	Ribonuclease H1	HGNC:18466	-0.245	3.65E-02
<i>MRPL18</i>	Mitochondrial ribosomal protein L18	HGNC:14477	-0.241	1.86E-02
<i>PITRM1</i>	Pitrilysin metallopeptidase 1	HGNC:17663	-0.241	5.63E-05
<i>RCC1L</i>	RCC1 like	HGNC:14948	-0.240	1.41E-02
<i>DHX30</i>	DEXH-box helicase 30	HGNC:16716	-0.233	8.57E-04
<i>MSRB3</i>	Methionine sulfoxide reductase B3	HGNC:27375	-0.220	1.14E-02
<i>POLRMT</i>	RNA polymerase mitochondrial	HGNC:9200	-0.217	2.73E-02
<i>RHOT2</i>	Ras homolog family member T2	HGNC:21169	-0.207	4.61E-02

SECCIÓN F. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RPV EN EL PROTEOMA DE HSC ACTIVADAS POR TGF- β Y EN LA SECRECIÓN Y COMPOSICIÓN PROTEICA DE EXOSOMAS

Dado que la comunicación intercelular juega un papel crucial en la remodelación del microambiente hepático durante la fibrosis, se propuso evaluar el impacto de RPV en el proteoma y la secreción de exosomas de HSC activadas por TGF- β . En esta sección se evaluaron cuatro condiciones: vehículo, TGF- β , TGF- β + RPV 4 μ M y TGF- β + RPV 8 μ M.

IV.F.1. EFECTO DE RPV EN EL PROTEOMA DE HSC ACTIVADAS POR TGF- β

Junto con el estudio de los exosomas, se realizó un análisis proteómico de las células HSC (LX-2) estimuladas con TGF- β para validar su activación y el efecto previamente descrito de RPV. Este análisis permitió la identificación de un total de 6607 proteínas. Para determinar qué proteínas estaban presentes en cada condición experimental y cuáles coincidían entre ellas, se llevó a cabo un análisis comparativo utilizando un diagrama de Venn. En este análisis, se consideraron solo aquellas proteínas identificadas en al menos tres réplicas de al menos una de las condiciones evaluadas. Según la Figura IV.F.1 (I) A, 5381 proteínas fueron detectadas en las cuatro condiciones experimentales. Este enfoque comparativo permite obtener una visión integral de las similitudes y diferencias en el proteoma celular bajo las distintas condiciones. Además, se realizó un PCA (Figura IV.F.1 (I) B) para visualizar patrones globales de expresión proteica. Los resultados mostraron que los perfiles proteicos de las células tratadas con TGF- β junto con RPV 4 μ M y 8 μ M estaban notablemente superpuestos, sugiriendo que ambas concentraciones inducen cambios similares en la expresión proteica global. Además, estos perfiles se diferenciaron parcialmente del grupo tratado solo con TGF- β y del grupo vehículo, indicando que el tratamiento con RPV induce un perfil proteico distinto.

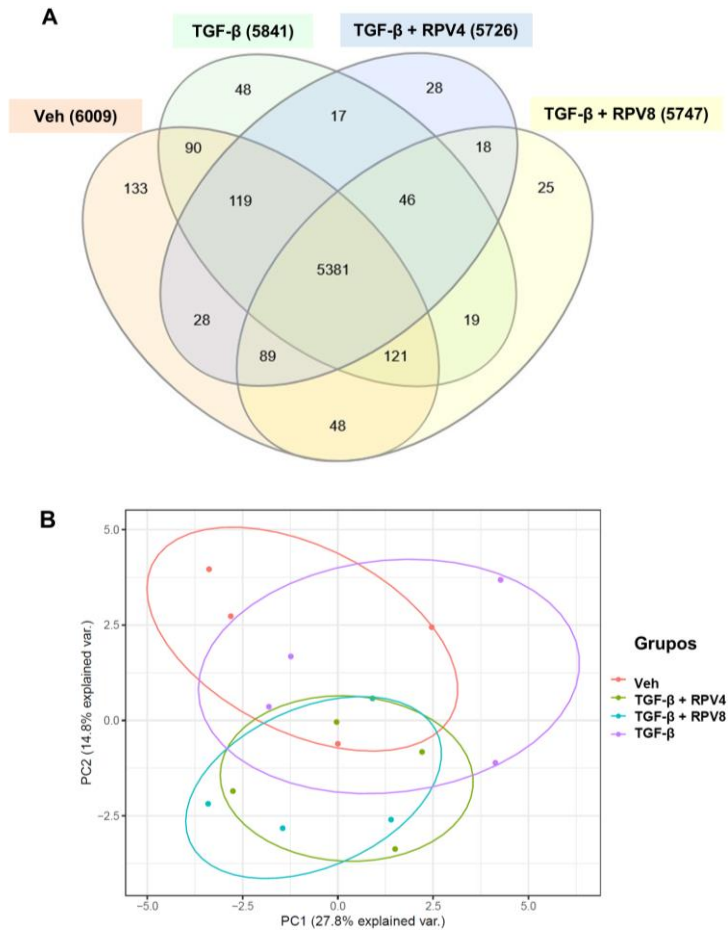


Figura IV.F.1. Efecto de RPV sobre el proteoma de células LX-2 activadas con TGF- β (I). Las células se trataron con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=4$). **A)** Los diagramas de Venn representan las proteínas identificadas en cada condición experimental. **B)** El gráfico PCA muestra los patrones globales de expresión proteica de las cuatro condiciones experimentales.

Para analizar el impacto de la estimulación con TGF- β y el tratamiento con RPV en la composición proteica de las HSC, se generó un mapa de calor con agrupamiento jerárquico de correlaciones de Pearson. El análisis, que incluyó cuatro réplicas por condición, mostró una mínima variación en la expresión proteica entre las condiciones, evidenciado por el estrecho rango

de correlación de Pearson (0,85 a 1). Se observó una distribución heterogénea de las réplicas sin una clara separación entre las condiciones experimentales, sugiriendo que los cambios inducidos por cada condición experimental son moderados y que existe cierta variabilidad en la susceptibilidad a los distintos tratamientos según la réplica (Figura IV.F.1 (II)).

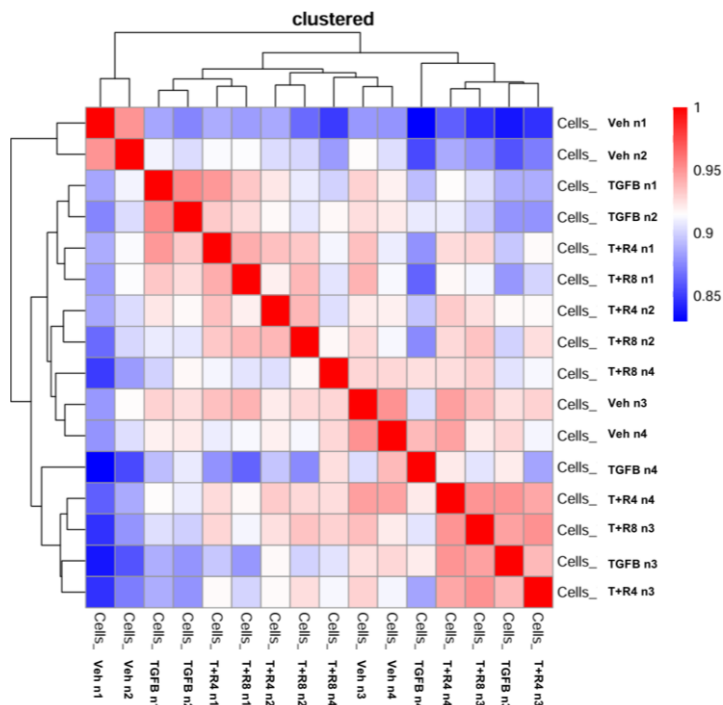


Figura IV.F.1. Efecto de RPV sobre el proteoma de células LX-2 activadas con TGF- β (II). Las células se trataron con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=4$). Mapas de calor con agrupamiento jerárquico de correlaciones de Pearson representando todas las réplicas biológicas en cada condición experimental. La escala de color indica la correlación de Pearson entre las muestras, desde 0,85 (azul, menor correlación) hasta 1 (rojo, máxima correlación).

Posteriormente, se realizó un análisis de expresión proteica diferencial para identificar proteínas y vías moleculares que experimentan una modulación en respuesta a la activación de las HSC y al tratamiento con RPV. La comparación del grupo tratado con TGF- β frente al grupo vehículo reveló 494

proteínas diferencialmente expresadas ($p < 0,05$). De estas, 266 (53,8 %) mostraron sobreexpresión, mientras que 228 (46,2 %) exhibieron infraexpresión en respuesta a la activación por TGF- β (Figura IV.F.1 (IV)). El tratamiento con RPV contrarrestó, de manera significativa, la expresión de un subconjunto de proteínas moduladas por TGF- β . Específicamente, RPV 4 μ M atenuó la expresión de 66 proteínas sobreexpresadas (24,8 %) y 54 proteínas infraexpresadas (23,7 %) por TGF- β . Sin embargo, RPV 8 μ M mostró un efecto más pronunciado, contrarrestando la expresión de 104 proteínas sobreexpresadas (39,1 %) y 43 proteínas infraexpresadas (18,9 %) por el estímulo. Notablemente, se observó una superposición significativa entre las proteínas cuya expresión fue atenuada por ambas concentraciones de RPV, con 50 proteínas (de las sobreexpresadas por TGF β) y 25 proteínas (de las infraexpresadas por TGF- β) (Figura IV.F.1 (III)).

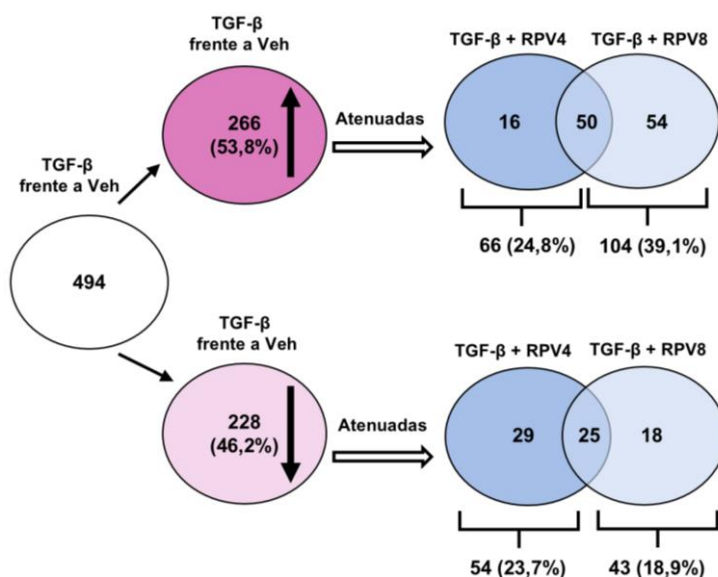
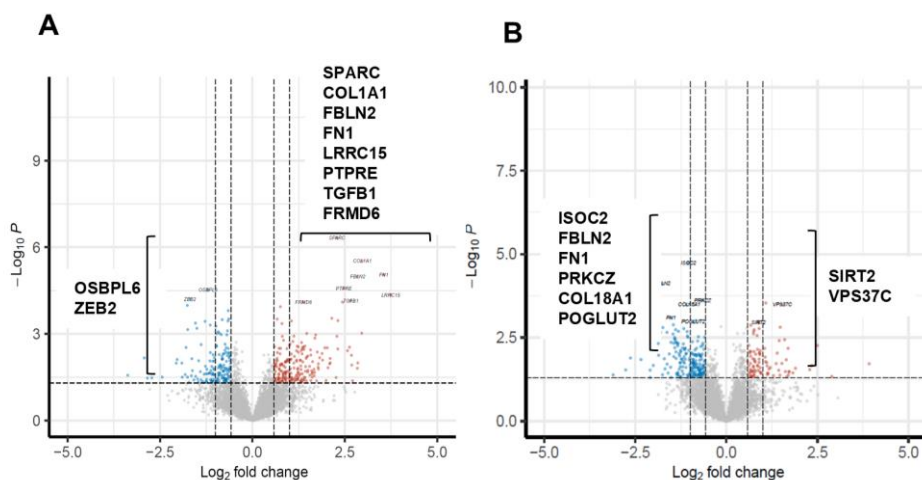


Figura IV.F.1. Efecto de RPV sobre el proteoma de células LX-2 activadas con TGF- β (III). Las células se trataron con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=4$). Los diagramas de Venn representan las proteínas diferencialmente expresadas en la comparación de TGF- β frente a vehículo, y cuya expresión diferencial se atenúa con el tratamiento con TGF- β + RPV (4 o 8 μ M).

De manera complementaria, se analizaron los datos mediante un gráfico de volcán (Figura IV.F.1 (IV)), donde se muestran las proteínas con mayor significancia estadística y mayor magnitud de cambio (al alza o a la baja). Este análisis mostró cambios importantes en los patrones de expresión, tanto de proteínas sobreexpresadas como infraexpresadas en todas las comparaciones. En la comparativa de TGF- β frente a vehículo, se observó una sobreexpresión de proteínas relacionadas con la fibrogénesis y la deposición de ECM, incluyendo SPARC, COL1A1, FBLN2 y TGFB1. Por otro lado, se observó infraexpresada OSBPL6, una proteína involucrada en el tráfico de colesterol. El tratamiento con RPV 4 μ M, en comparación con TGF- β solo, resultó en la infraexpresión de proteínas involucradas en la fibrogénesis (COL18A1 y FN1), la proliferación celular (PRKCZ) y la migración (FBLN2). Curiosamente, también se observó sobreexpresada VPS37C, un componente de ESCRT-I que regula el tráfico de las EV. Con una mayor concentración de RPV (8 μ M) se observó la infraexpresión de FADS3, una enzima implicada en la síntesis de ácidos grasos. Entre las proteínas sobreexpresadas se encontraron ARHGEF11 y ARHGAP18, reguladoras de la actividad de las Rho GTPasas, y GORASP2, implicada en el ensamblaje del aparato de Golgi.



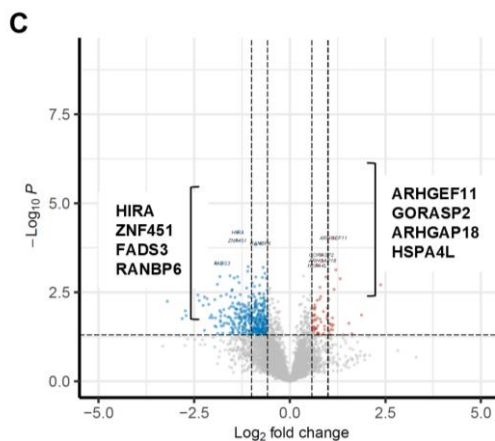


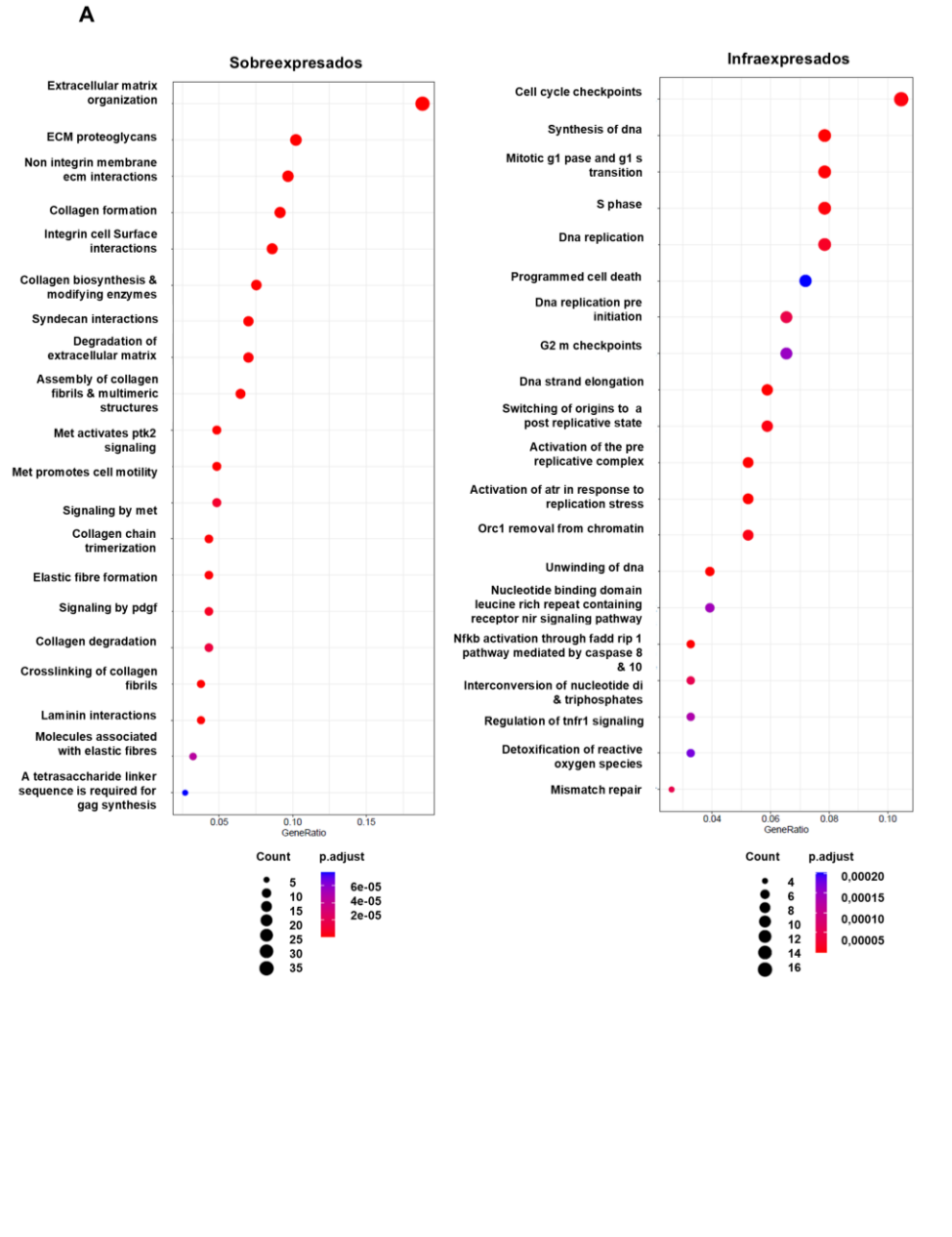
Figura IV.F.1. Efecto de RPV sobre el proteoma de células LX-2 activadas con TGF- β (IV). Las células se trataron con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=4$). Gráficos de volcán de las siguientes comparaciones: TGF- β frente a vehículo (A), TGF- β + RPV4 frente a TGF- β (B) y TGF- β + RPV8 frente a TGF- β (C). En azul se muestran aquellas proteínas infraexpresadas con un p valor <0,05 y un *fold change* por debajo de -1,5. En rojo se muestran las proteínas sobreexpresados con un p valor <0,05 y un *fold change* por encima de 1,5. Se muestran destacadas las proteínas con mayor significancia estadística y mayor magnitud de cambio (al alza o a la baja).

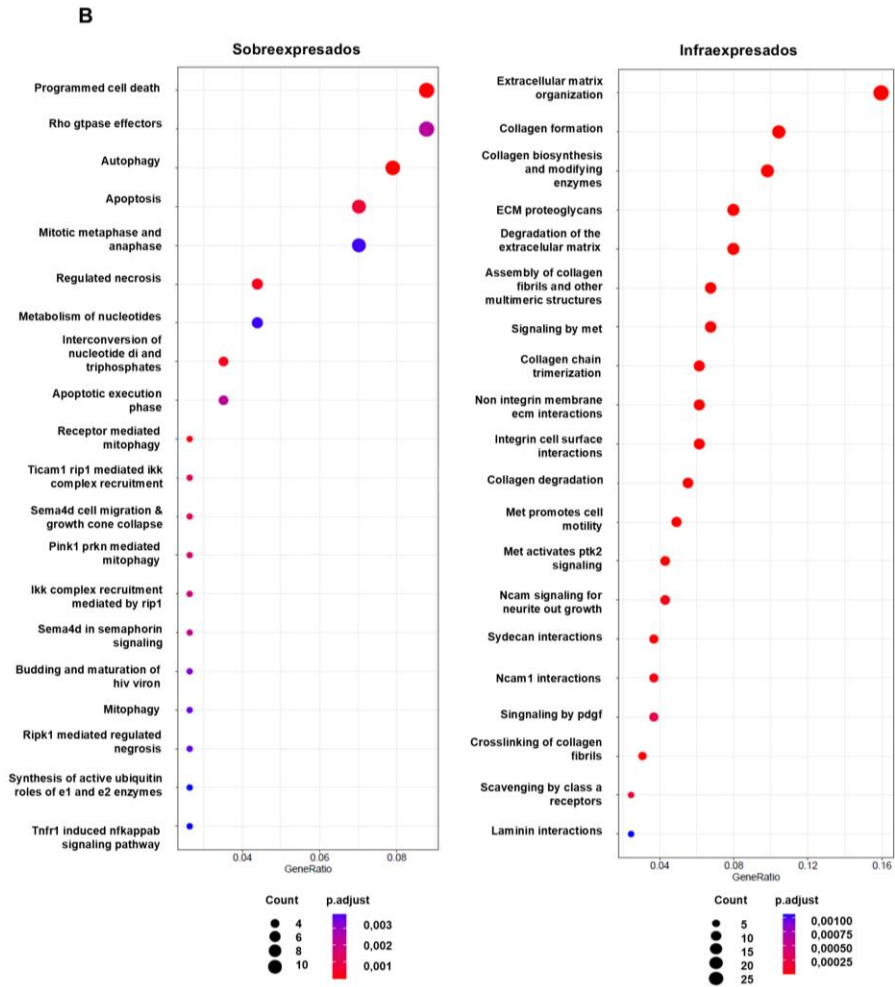
Con el objetivo de determinar las funciones biológicas enriquecidas en los perfiles de expresión proteica de cada grupo experimental, se realizó un análisis ORA utilizando la base de datos Reactome. Primero, para cada comparación se generaron dos listas de proteínas diferencialmente expresadas con un p valor <0,05, una de las proteínas sobreexpresadas y otra con las proteínas infraexpresadas. Posteriormente, ambas listas se sometieron al análisis ORA y los 20 términos más enriquecidos de cada comparación, con un p valor <0,05, se seleccionaron y representaron en gráficos de puntos. Como se muestra en la Figura IV.F.1 (V) A, el tratamiento con TGF- β indujo, tal y como se esperaba, un enriquecimiento en términos relacionados con la activación de las HSC y la fibrogénesis. Estos términos incluyen la organización y desregulación de la ECM, específicamente: [organización de la ECM], [proteoglicanos de la ECM], [formación de

colágeno], [biosíntesis de colágenos y enzimas modificadores], [desregulación de la ECM], [ensamblaje de las fibras de colágeno y otras estructuras multiméricas], [trimerización de la cadena de colágeno], [entrecruzamiento de las fibras de colágeno], [interacciones de laminina], [formación de fibras elásticas], [moléculas asociadas a las fibras elásticas] e [interacciones de integrinas con la superficie celular]. También se observó enriquecimiento en términos relacionados con la señalización por PDGF, [señalización por PDGF], y con la motilidad celular mediada por el receptor c-MET, [MET activa la señalización de PTK2], [MET promueve la motilidad celular] y [señalización por MET]. Además, el tratamiento con TGF- β disminuyó la expresión de procesos biológicos relacionados con la proliferación, el ciclo celular y la detoxificación: [punto de control del ciclo celular], [muerte celular programada], [preiniciación de la replicación del ADN], [punto de control G2], [elongación de la cadena de ADN] y [detoxificación de especies reactivas de oxígeno].

El cotratamiento con RPV 4 μ M, sin embargo, indujo la sobreexpresión de términos relacionados con la muerte celular y la autofagia: [muerte celular programada], [autofagia], [fase de ejecución apoptótica], [mitofagia mediada por receptor], [mitofagia mediada por PINK1] y [mitofagia]. Simultáneamente, se observó un efecto inhibitorio sobre la activación de las HSC y la fibrogénesis, con una disminución en los términos relacionados con la ECM: [formación de colágeno], [biosíntesis de colágeno y enzimas modificadores], [proteoglicanos de la ECM], [degradación de la ECM], [ensamblaje de las fibras de colágeno y otras estructuras multiméricas], [trimerización de la cadena de colágeno], [degradación de colágeno], [interacciones de integrinas con la superficie celular] e [interacciones de laminina]. Asimismo, se observó un efecto inhibitorio sobre la [señalización por PDGF] y la señalización y motilidad celular mediada por c-MET, [señalización por MET], [MET promueve la motilidad celular] y [MET activa la señalización de PTK2], previamente incrementadas por el TGF- β (Figura IV.F.1 (V) B).

Es importante destacar que este efecto inhibitorio sobre la activación, fibrogénesis y motilidad celular se mantuvo con la concentración más alta de RPV (8 μM). En este caso, los términos más enriquecidos regulados a la baja incluyeron [organización de la ECM], [formación de colágeno], [biosíntesis de colágeno y enzimas modificadores], [ensamblaje de las fibras de colágeno y otras estructuras multiméricas], [interacciones de integrinas con la superficie celular], [interacciones de laminina], así como la señalización y motilidad celular mediada por c-MET, [señalización por MET], [MET activa la señalización de PTK2] y [MET promueve la motilidad celular]. Además, indujo la infraexpresión de términos relacionados con la síntesis de colesterol como [biosíntesis de colesterol] y [regulación de la biosíntesis de colesterol por sreb/srebf]. Finalmente, RPV 8 μM indujo la sobreexpresión de términos relacionados con la vía de señalización de las Rho GTPasas: [ciclo de la Rho GTPasa], [efectores de la Rho GTPasa], [ciclo de la RhoA GTPasa], [ciclo de la RhoB GTPasa], [ciclo de la RhoH GTPasa] y [Rho GTPasa activa KTN1] (Figura IV.F.1 (V) C).





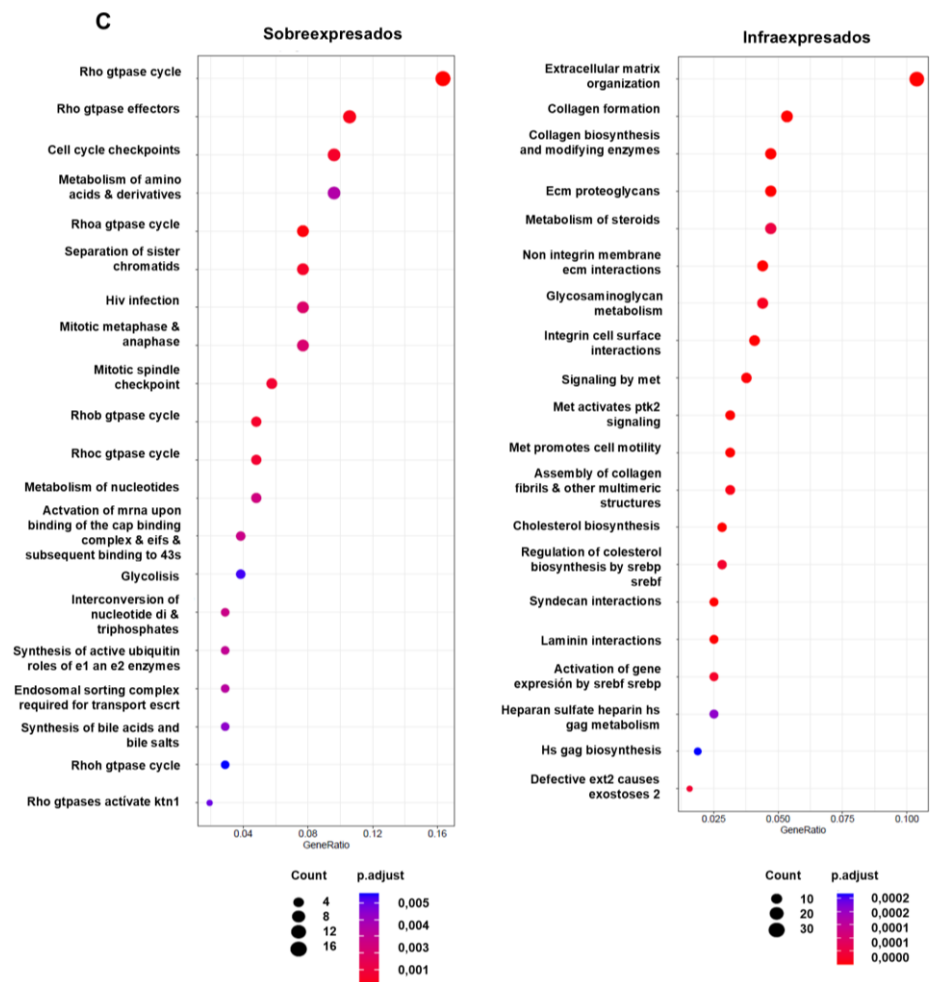
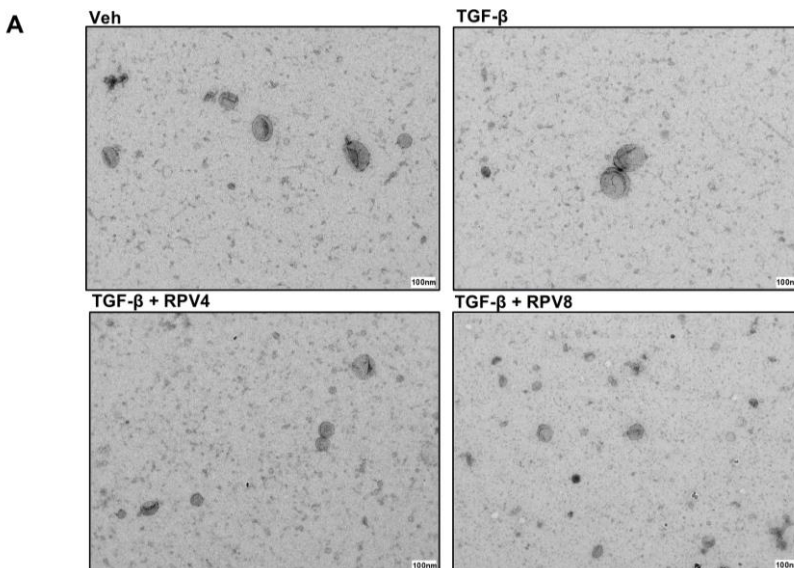


Figura IV.F.1. Efecto de RPV sobre el proteoma de células LX-2 activadas con TGF- β (V). Las células se trataron con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=4$). Se representan las 20 funciones biológicas más enriquecidas (p ajustado $<0,05$), tanto sobreexpresadas como infraexpresadas para las comparaciones de TGF- β frente a vehículo (A), TGF- β + RPV4 frente a TGF- β (B) y TGF- β + RPV8 frente a TGF- β (C). En este gráfico de puntos, el tamaño del punto representa el número de proteínas del conjunto de proteínas analizado (*count*) que están asociadas a una función biológica específica, lo que permite visualizar rápidamente el grado de enriquecimiento. El color de los puntos indica el nivel de significancia estadística (p valor), con un gradiente de color que va desde rojo para los p valores más bajos (mayor significancia) hasta azul para los p valores más altos (menor significancia). El *GeneRatio*, representado en el eje horizontal, indica la proporción de proteínas dentro del conjunto analizado que están asociadas con una función biológica dada.

IV.F.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS EXOSOMAS SECRETADOS POR LAS HSC

Tras caracterizar el proteoma de las células secretoras, se identificaron y caracterizaron las EV secretadas con el fin de verificar la eficacia del protocolo de aislamiento y confirmar la obtención de exosomas. La caracterización de las EV se realizó mediante TEM, NTA y proteómica. Los análisis de TEM revelaron, en las cuatro condiciones experimentales, la morfología típica en forma de copa y la estructura de doble membrana características de los exosomas (Figura IV.F.2 A). El NTA confirmó el tamaño esperado de los exosomas, con una distribución de entre 165 y 229,2 nm (Figura IV.F.2 B) y una concentración de vesículas aisladas de 1,3 a 21,4 x 10¹⁰ (partículas/mL). Sin embargo, se observó una considerable variabilidad en las concentraciones entre réplicas (Figura IV.F.2 C), atribuible a la heterogeneidad inherente de las HSC en la producción de exosomas, fluctuaciones en el estado metabólico, la eficiencia del proceso de aislamiento de exosomas o la precisión de los métodos de cuantificación, que puede verse afectada por agregados o partículas no exosomales.



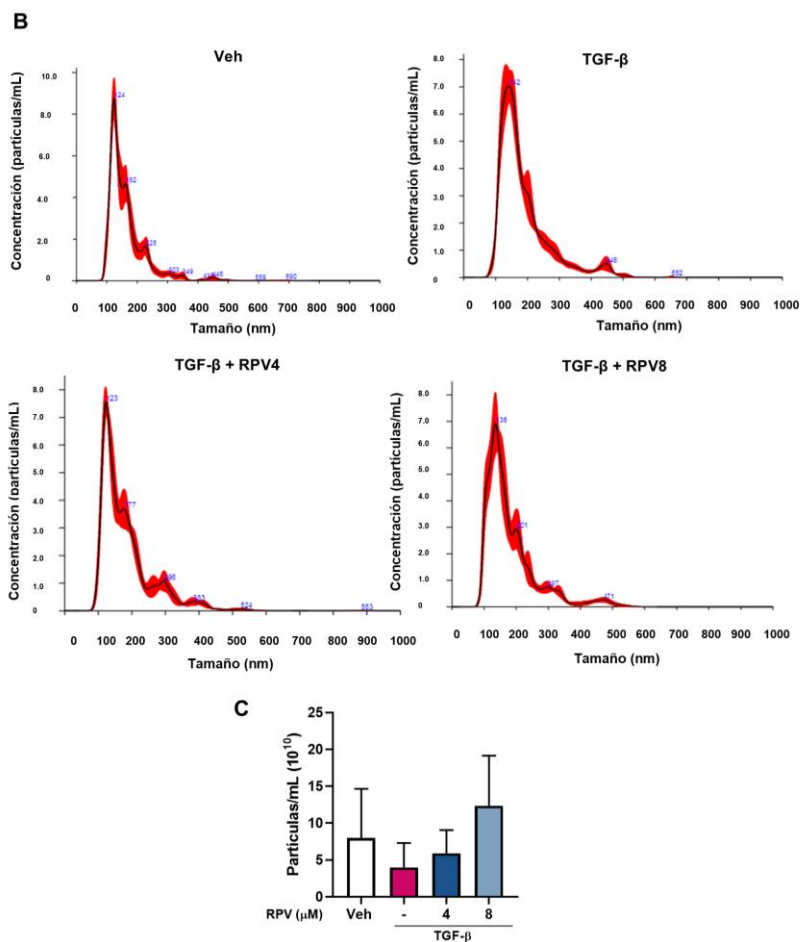


Figura IV.F.2. Identificación de los exosomas aislados de LX-2. Las células se trataron con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=4$). **A**) Imágenes representativas de TEM. **B**) Distribución del tamaño de partículas medida por NTA (gráficos representativos). **C**) Representación de la concentración de partículas/mL (media \pm SEM).

Por último, el análisis proteómico reveló que las EV de todas las condiciones experimentales expresaban proteínas clásicamente relacionadas con los exosomas (222), como CD63, CD81, CD9, FLOT2, FLOT1, TSG101, HSP70, HSP90, ALIX.

IV.F. 3. EFECTO DE RPV EN EL CONTENIDO PROTEICO DE LOS EXOSOMAS DE HSC ACTIVADAS POR TGF- β

Para validar el análisis proteómico, se compararon las 6607 proteínas identificadas en las EV en el conjunto de condiciones, con las 5269 de la base de datos ExoCarta (223). El diagrama de Venn (Figura IV.F.3 (I) A) mostró coincidencia en 3164 proteínas (47,88 %), confirmando la naturaleza exosomal de las EV y la fiabilidad del análisis, un resultado significativo considerando la constante actualización de ExoCarta. Además, se realizó un análisis comparativo mediante un diagrama de Venn para identificar proteínas presentes en cada condición experimental y las coincidencias entre ellas. Solo se consideraron proteínas detectadas en al menos tres réplicas de al menos una de las condiciones evaluadas. De estas, 233 proteínas mostraron expresión común en las cuatro condiciones experimentales (Figura IV.F.3 (I) B).

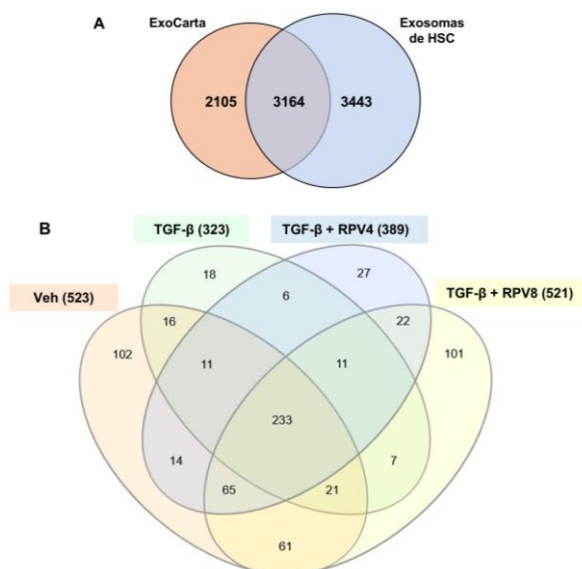


Figura IV.F.3. Efecto de RPV sobre el proteoma de exosomas secretados por LX-2 activadas con TGF- β (I). Las células se trataron con Veh, TGF- β solo (2,5 ng/mL) o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=4$). **A)** Diagrama de Venn de las proteínas identificadas en los exosomas de HSC frente a los presentes en ExoCarta. **B)** Diagrama de Venn de las proteínas identificadas en cada condición experimental.

Para evaluar los patrones globales de expresión proteica en los exosomas de HSC activadas tras el tratamiento con RPV, se realizó un PCA (Figura IV.F.3 (II)). Los resultados indicaron que no existía una diferenciación clara entre las condiciones experimentales, ya que todas las condiciones mostraban un notable solapamiento en el gráfico. Sin embargo, se observó que la condición TGF- β tendía a concentrarse en una región más reducida del gráfico, lo que sugiere que la composición de los exosomas de este grupo fue más homogénea en sus réplicas en comparación con las de las demás condiciones experimentales.

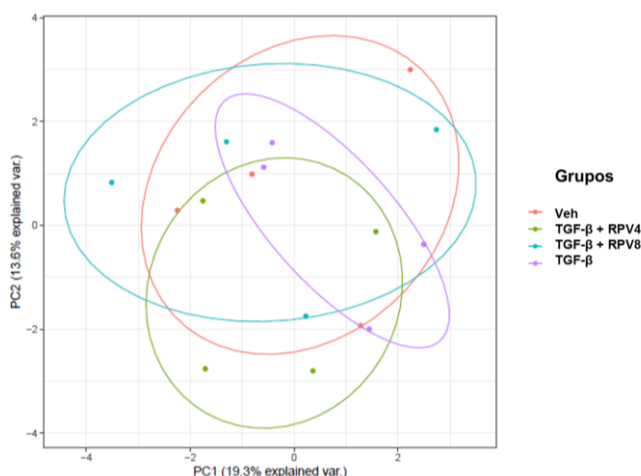


Figura IV.F.3. Efecto de RPV sobre el proteoma de exosomas secretados por LX-2 activadas con TGF- β (II). Las células se trataron con Veh, TGF- β solo (2,5 ng/mL) o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=4$). El gráfico PCA muestra los patrones globales de expresión proteica de los exosomas de las cuatro condiciones experimentales.

Con el fin de evaluar el impacto de la estimulación con TGF- β y el tratamiento con RPV en la composición proteica de los exosomas secretados por las HSC, se generó un mapa de calor de agrupamiento jerárquico de correlaciones de Pearson. El rango de valores de correlación oscilaba entre de 0,4 (azul, menor correlación) a 1 (rojo, máxima correlación). En la Figura IV.F.3 (III) se observa una alta variabilidad entre las réplicas, incluso dentro

del mismo grupo experimental, reflejando la heterogeneidad inherente en la composición proteica de los exosomas. Si bien las réplicas de TGF- β +RPV en ambas concentraciones tienden a agruparse, la falta de separación clara entre condiciones sugiere que los cambios inducidos por cada condición experimental en la composición proteica de los exosomas que secretan son moderados y que existe cierta variabilidad en la susceptibilidad a los distintos tratamientos según la réplica.

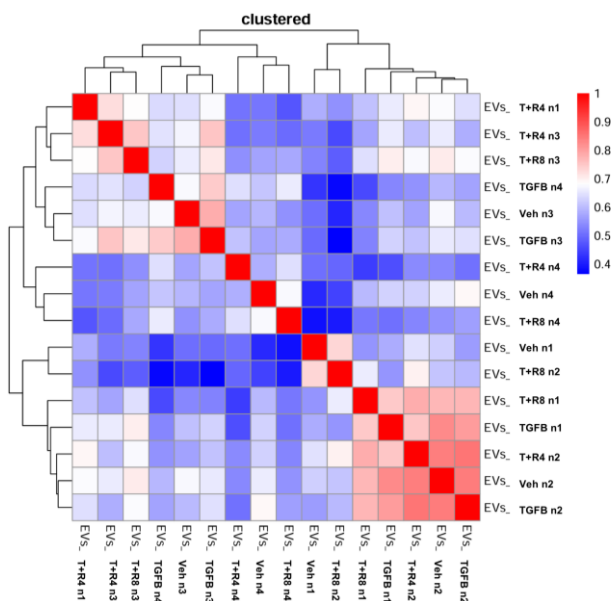


Figura IV.F.3. Efecto de RPV sobre el proteoma de exosomas secretados por LX-2 activadas con TGF- β (III). Las células se trataron con Veh, TGF- β solo (2,5 ng/mL) o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=4$). Mapas de calor con agrupamiento jerárquico representando todas las réplicas biológicas en cada condición experimental. La escala de color indica la correlación de Pearson entre las muestras, desde 0,4 (azul, menor correlación) hasta 1 (rojo, máxima correlación).

Posteriormente, se realizó un análisis de expresión proteica diferencial para identificar proteínas y vías moleculares que experimentan una modulación en los exosomas en respuesta a la activación de las HSC y al tratamiento con RPV. La comparación del grupo tratado con TGF- β frente al grupo vehículo reveló 26 proteínas diferencialmente expresadas ($p < 0,05$). De

estas, 14 (53,9 %) mostraron una sobreexpresión, mientras que 12 (46,2 %) exhibieron una infraexpresión en respuesta a la activación por TGF- β . El tratamiento con RPV atenuó la expresión de un subconjunto de proteínas moduladas significativamente por TGF- β . Concretamente, RPV 4 μ M contrarrestó la expresión de 3 proteínas sobreexpresadas (21,4 %) y 1 infraexpresada por TGF- β (cadena gamma de fibrinógeno). Sin embargo, RPV 8 μ M únicamente fue capaz de atenuar 8 proteínas sobreexpresadas por TGF- β (57,1 %), pero ninguna de las proteínas infraexpresadas por este factor de crecimiento. Es importante destacar que, entre las proteínas sobreexpresadas por TGF- β cuya expresión fue atenuada por el cotratamiento con RPV, una proteína, la proteína soluble del dominio rico en cisteína del receptor *scavenger* (SRCR5) mostró este comportamiento con ambas concentraciones del fármaco (4 μ M y 8 μ M) (Figura IV.F.3 (IV)).

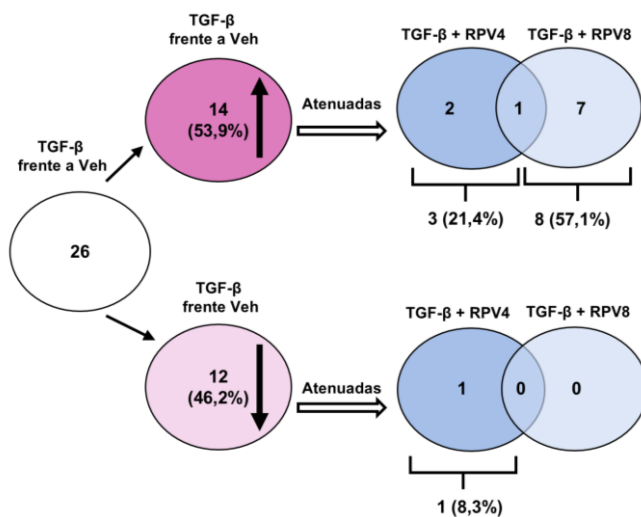
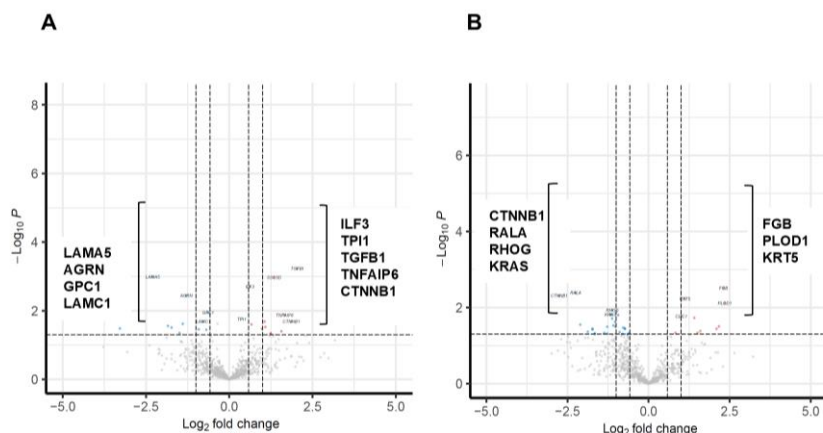


Figura IV.F.3. Efecto de RPV sobre el proteoma de exosomas secretados por LX-2 activadas con TGF- β (IV). Las células se trataron con Veh, TGF- β (2,5 ng/mL) solo o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=4$). Los diagramas de Venn representan las proteínas diferencialmente expresadas en la comparación de TGF- β frente a vehículo, y cuya expresión diferencial se atenúa con el tratamiento con TGF- β + RPV (4 o 8 μ M).

Complementariamente, se analizaron los datos mediante un gráfico de volcán, donde se muestran las proteínas con mayor significancia estadística y mayor magnitud de cambio (al alza o a la baja). Tal y como se observa en la Figura IV.F.3 (V) A, en la comparación entre TGF- β y el vehículo, se observó una infraexpresión de proteínas relacionadas con la ECM, como LAMA5, AGRN y LAMC1, y con la activación de las HSC, como TGFB1. Por otro lado, se sobreexpresaron proteínas como TPI1 (enzima glucolítica), TNFAIP6 (implicada en la inflamación) y CTNNB1 (β -catenina). El tratamiento con TGF- β + RPV 4 μ M, comparado con TGF- β solo, disminuyó la expresión de CTNNB1 (β -catenina) y proteínas relacionadas con GTPasas, como RALA y RHOG, así como KRAS (proteína involucrada en la vía RAS/MAPK). En contraste, se sobreexpresaron FGB (relacionado con la formación de coágulos) y PLOD1 (necesario para el ensamblaje de las fibras de colágeno) (Figura IV.F.3 (V) B). En cuanto a TGF- β + RPV 8 μ M frente a TGF- β , se observó una infraexpresión de COL1A1, TGFB1, SSC5D, PXDN (relacionadas con la fibrogénesis y la ECM) y TPI1 (enzima glucolítica), la cual se había sobreexpresado con TGF- β solo. Se sobreexpresaron TUBA4A (proteína del citoesqueleto), HGD (implicada en el metabolismo de aminoácidos), FGB (implicada en la formación de coágulos) y RAP1B (implicada en el transporte intracelular) (Figura IV.F.3 (V) C).



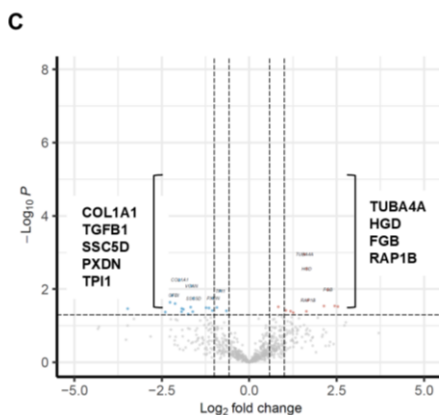


Figura IV.F.3 Efecto de RPV sobre el proteoma de exomas secretados por LX-2 activadas con TGF- β (V). Las células se trataron con Veh, TGF- β solo (2,5 ng/mL) o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) durante 48 h ($n=4$). Gráficos de volcán de las siguientes comparaciones: TGF- β frente a vehículo (A), TGF- β +RPV4 frente a TGF- β (B), TGF- β +RPV8 frente a TGF- β (C). En azul se muestran aquellas proteínas infraexpresadas con un p valor <0,05 y un logaritmo de *fold change* por debajo de -1,5. En rojo se muestran los genes sobreexpresados con un p valor <0,5 y un logaritmo de *fold change* por encima de 1,5. Se encuentran destacadas las proteínas con mayor magnitud de cambio y significancia estadística.

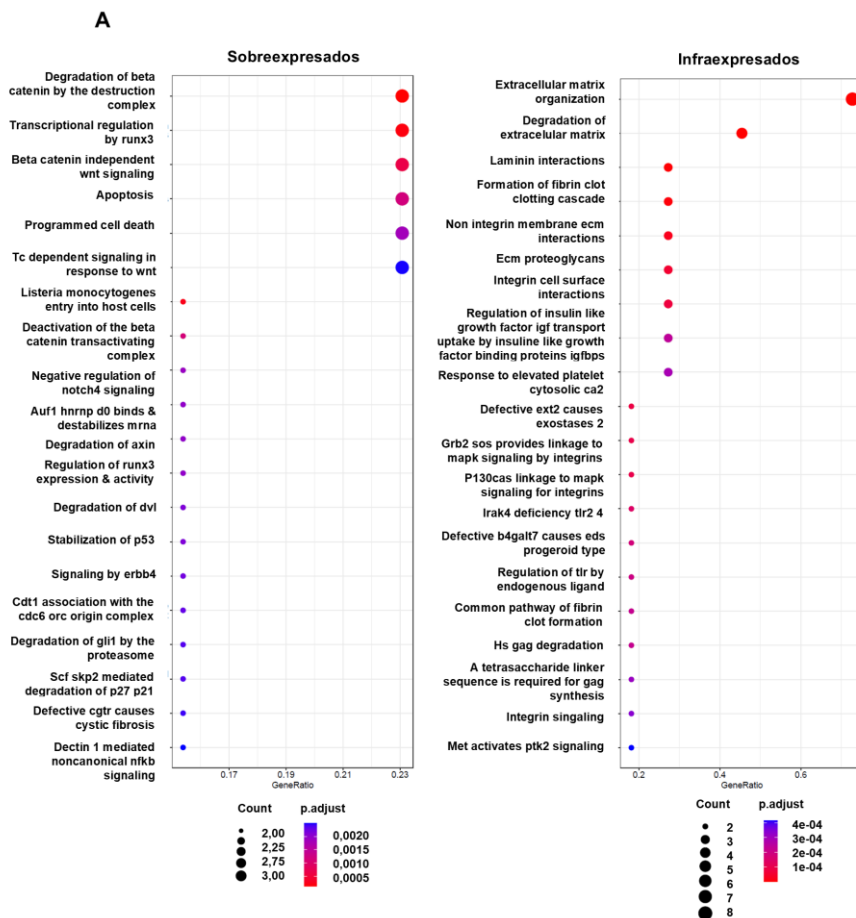
Por último, el análisis de enriquecimiento de rutas para los exomas se realizó de la misma manera que el análisis ORA previamente descrito para las células. Se utilizó la base de datos Reactome, se generaron listas de proteínas sobreexpresadas e infraexpresadas ($p < 0,05$) para cada comparación, y se seleccionaron los 20 términos más enriquecidos ($p < 0,05$) para su representación gráfica. Como se muestra en la Figura IV.F.3 (VI) A, el tratamiento con TGF- β indujo un aumento en los términos relacionados con la inactivación de la vía canónica de Wnt (dependiente de β -catenina) y la activación de la vía no canónica de Wnt. Los términos sobreexpresados para la vía canónica incluyeron [degradación de β -catenina por el complejo de destrucción], [desactivación de β -catenina por el complejo de transactivación] y [degradación de DVL]. Para la vía no canónica, el término sobreexpresado fue [ruta Wnt independiente de β -catenina]. Además, se observó como términos sobreexpresados más enriquecidos [apoptosis],

[muerte celular programada] y [estabilización de p53]. Los términos infraexpresados más relevantes se relacionaron con la fibrogénesis y la coagulación sanguínea: [degradación de la ECM], [organización de la ECM], [proteoglicanos de la ECM], [interacciones de laminina], [señalización de integrinas], [interacciones de integrinas con la superficie celular], [cascada de coagulación para la formación del coágulo de fibrina] y [vía común de formación del coágulo de fibrina].

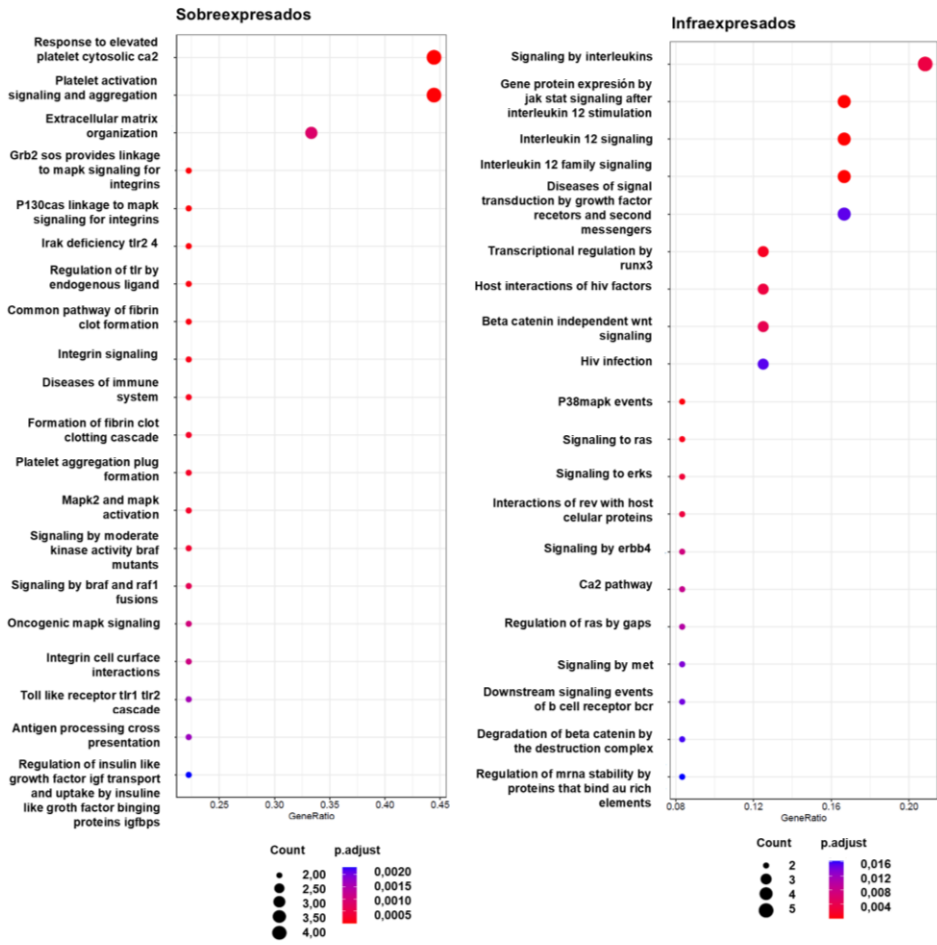
Sin embargo, RPV 4 μM inhibió algunos procesos modulados por TGF- β , contrarrestando su efecto sobre la coagulación sanguínea y la ruta Wnt no canónica. Concretamente, los exosomas de células tratadas con RPV 4 μM regularon positivamente términos relacionados con la coagulación, como [activación y agregación plaquetaria], [vía común de formación del coágulo de fibrina] y [cascada de coagulación para la formación del coágulo de fibrina], a la vez que infraexpresaron la [ruta Wnt independiente de β -catenina]. Además, reguló a la baja términos relacionados con la interleuquina-12 y quinasas: [expresión génica y proteica por la ruta de señalización JAK-STAT tras activación por IL-12], [señalización por interleucinas], [señalización por la familia IL-12], [eventos de p38 MAPK], [señalización a RAS] y [señalización a ERK] (Figura IV.F.3 (VI) B).

El tratamiento con la concentración más alta de RPV (8 μM) mantuvo la sobreexpresión de las vías relacionadas con la hemostasia y la formación de coágulos sanguíneos. Sorprendentemente, los procesos de IL-12, infraexpresados con RPV 4 μM , se encontraron sobreexpresados con la concentración más alta de este fármaco: [señalización de IL-12] y [señalización por la familia IL-12]. Como ocurría en el análisis del proteoma de las células, los términos infraexpresados con la concentración más alta de RPV se relacionaron con la activación de HSC y la fibrogénesis: [organización de la ECM], [proteoglicanos de la ECM], [ensamblaje de las fibras de colágeno y estructuras multiméricas], [formación de colágeno] e [interacciones de integrinas con la superficie celular]. Finalmente, los

exosomas de células tratadas con ambas concentraciones de RPV compartieron términos infraexpresados relacionados con la motilidad celular asociada a MET: [señalización por MET], [MET activa la señalización de PTK2] y [MET promueve la motilidad celular] (Figura IV.F.3 (VI) C).



B



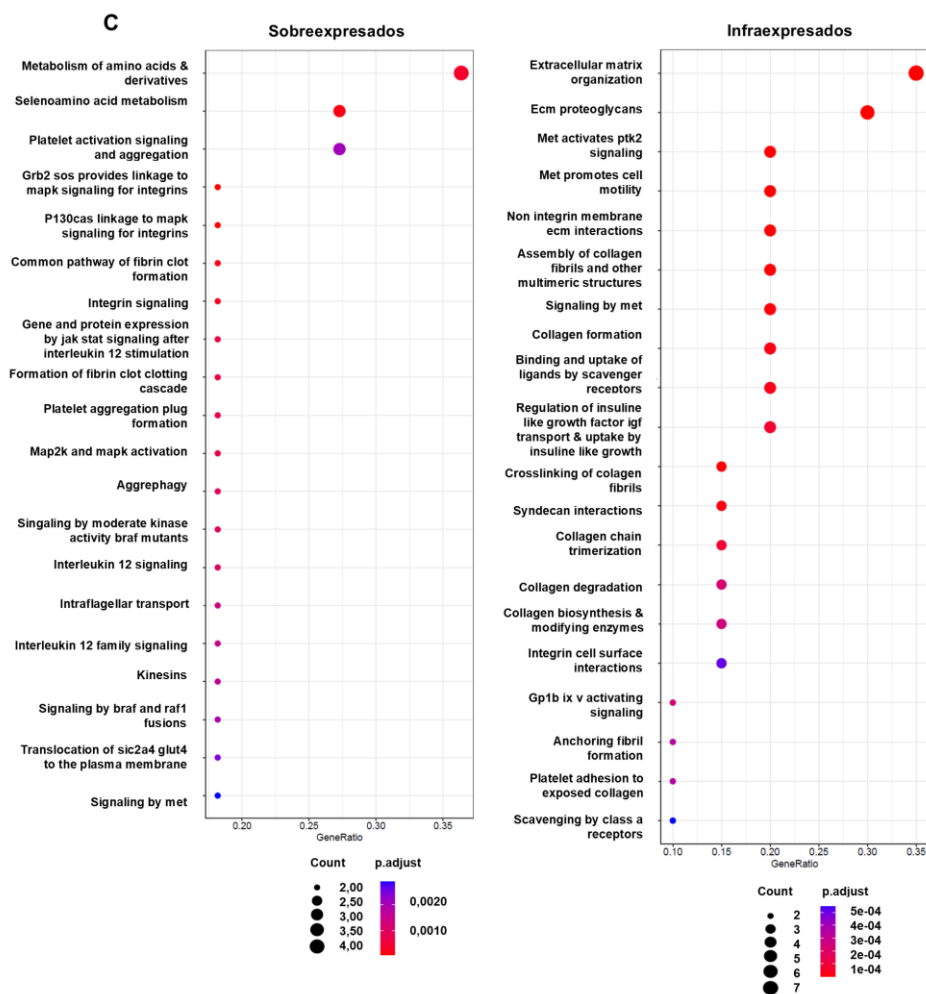


Figura IV.F.3. Efecto de RPV sobre el proteoma de exosomas secretados por LX-2 activadas con TGF- β (VI). Las células se trataron con Veh, TGF- β solo (2,5 ng/mL) o en presencia de RPV (4 o 8 μ M) ($n=4$). Se representan las 20 funciones biológicas más enriquecidas ($p < 0,05$), tanto sobreexpresadas como infraexpresadas para las comparaciones de TGF- β frente a vehículo (A), TGF- β + RPV4 frente a TGF- β (B) y TGF- β + RPV8 frente a TGF- β (C). En este gráfico de puntos, el tamaño del punto representa el número de proteínas del conjunto de proteínas analizado (*count*) que están asociadas a una función biológica específica, lo que permite visualizar rápidamente el grado de enriquecimiento. El color de los puntos indica el nivel de significancia estadística (*p* valor), con un gradiente de color que va desde rojo para los *p* valores más bajos (mayor significancia) hasta azul para los *p* valores más altos (menor significancia). El *GeneRatio*, representado en el eje horizontal, indica la proporción de proteínas dentro del conjunto analizado que están asociadas con una función biológica dada.

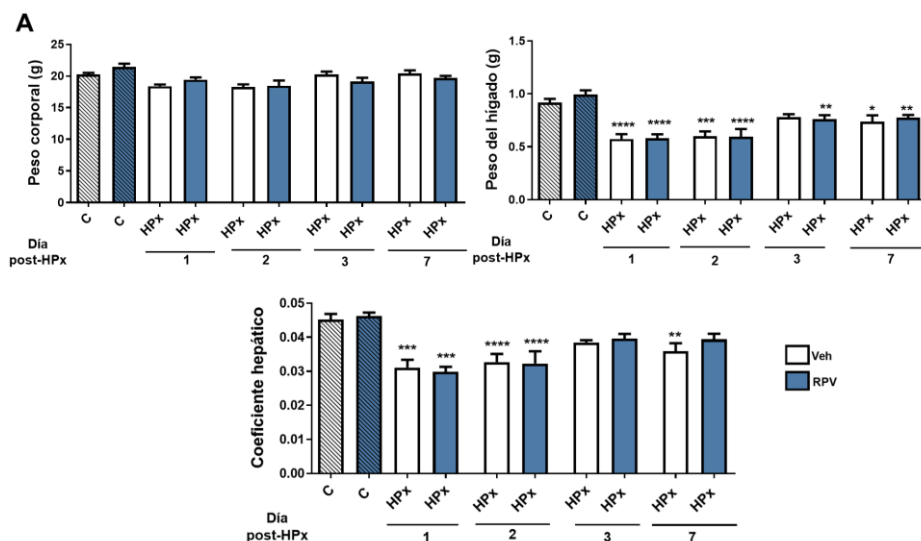
SECCIÓN G. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RPV EN UN MODELO *IN VIVO* DE REGENERACIÓN HEPÁTICA 70 %.

Dado que estudios previos del grupo reportaron un posible papel regenerador de RPV, se propuso evaluar su efecto en un modelo murino de RH por HPx 70 %.

IV.G.1. EFECTO DE RPV EN LA RECUPERACIÓN HEPÁTICA Y MARCADORES PLASMÁTICOS

El objetivo inicial fue evaluar el efecto de RPV en la recuperación de la masa hepática durante los 7 días posteriores a la HPx del 70 %. Aunque el peso corporal de los ratones se mantuvo estable en todos los grupos experimentales durante el protocolo, el peso del hígado de los ratones sometidos a HPx (tanto de RPV como de vehículo), disminuyó significativamente en los días 1 y 2 postoperatorios. Esta reducción inicial fue seguida por un aumento notable en el día 3, estabilizándose hasta el día 7. Sin embargo, el peso del hígado no llegó a alcanzar completamente el de los ratones del grupo control (ratones Sham sacrificados a día 7 tras la cirugía). Además, no se observaron diferencias significativas en el peso del hígado entre los ratones tratados con vehículo y con RPV. Del mismo modo, el coeficiente hepático (CE), calculado como la proporción entre el peso del hígado y el peso corporal, no mostró diferencias significativas entre los ratones tratados con RPV y aquellos que recibieron vehículo durante el estudio. Ambos grupos experimentaron una disminución significativa del CE en los días 1 y 2 postoperatorios en comparación con el grupo control. Aunque se observó un ligero aumento en el CE de ambos grupos en el día 3, ni el grupo RPV ni el grupo vehículo alcanzaron el valor del grupo control. A día 7, únicamente el grupo tratado con vehículo mostró una disminución significativa del CE en comparación con el grupo control (Figura IV.G.1 A). La capacidad regenerativa del hígado observada en ambos grupos experimentales se confirma en las imágenes representativas de la Figura

IV.G.1 B, donde se aprecia un aumento progresivo del tamaño del hígado a medida que transcurren los días desde la cirugía, hasta aproximarse al tamaño del grupo control. Las imágenes corresponden al grupo vehículo, ya que no existían diferencias con RPV en la recuperación de la masa hepática en ninguno de los días postoperatorios. Por último, se evaluó la función hepática mediante los marcadores plasmáticos AST y ALT, cuya alteración se asocia con la patología hepática. Los ratones sometidos a HPx y sacrificados un día después de la cirugía mostraron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de estas enzimas, normalizándose en los días posteriores (2, 3 y 7). En línea con los resultados anteriores, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de estas enzimas entre los dos tratamientos experimentales (RPV y vehículo). Cabe destacar que, para el parámetro AST, solo se obtuvo un valor para el grupo HPx-Vehículo, limitación atribuida a valores fuera de rango obtenidos durante la medición y a la imposibilidad de extraer suficiente volumen de sangre en el día posterior al procedimiento de HPx (Figura IV.G.1).



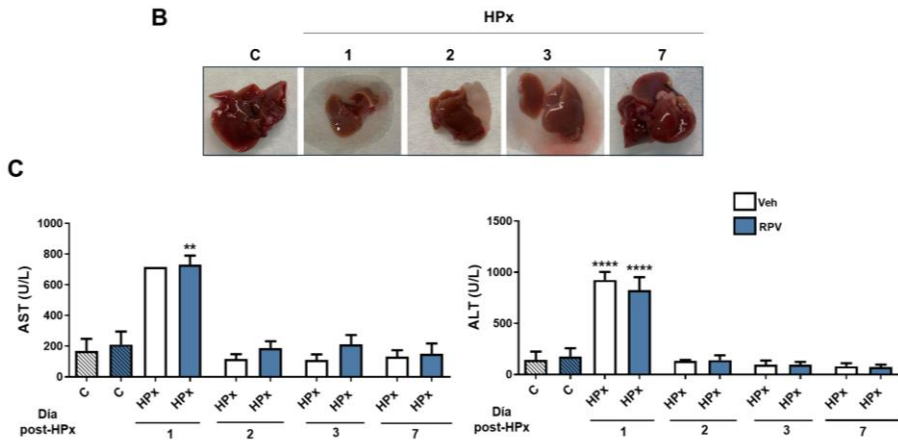


Figura IV.G.1. Evaluación de peso corporal, peso y coeficiente hepático, y enzimas hepáticas en el modelo de HPx. A) Evolución del peso corporal, peso y coeficiente hepático en todos los grupos experimentales ($n=6-8$). **B)** Imágenes representativas de la evolución del hígado en los ratones tratados con vehículo. **C)** Determinaciones plasmáticas de las enzimas hepáticas AST ($n=7-8$) y ALT ($n=4-8$). Los datos (media \pm SEM) se analizaron mediante un test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para cada grupo de tratamiento de manera independiente (RPV o vehículo), comparando los valores de cada punto temporal postcirugía con los de su respectivo control (Sham sacrificados a día 7) (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$).

IV.G.2. EFECTO DE RPV EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN Y HEPATOCITOS DIFERENCIADOS

Dado que la recuperación del hígado tras una HPx depende principalmente de la proliferación celular (por parte de los hepatocitos), se evaluó el efecto de RPV en este proceso crucial. Para ello, se analizó la expresión proteica del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA, por sus siglas en inglés), un marcador crucial en la replicación del ADN. Se observó un aumento significativo en la expresión de este marcador a día 3 postcirugía en ambos tratamientos experimentales, mientras que solo RPV mostró un aumento significativo en el día 2 (Figura IV.G.2). En ambos tratamientos, a día 7 se observó que la expresión del marcador estudiado de proliferación tendió a recuperarse, resultando en valores similares a los del grupo control.

En conjunto, tal y como se esperaba de acuerdo con los resultados del peso del hígado, el tratamiento con RPV no mostró diferencias significativas respecto al vehículo.

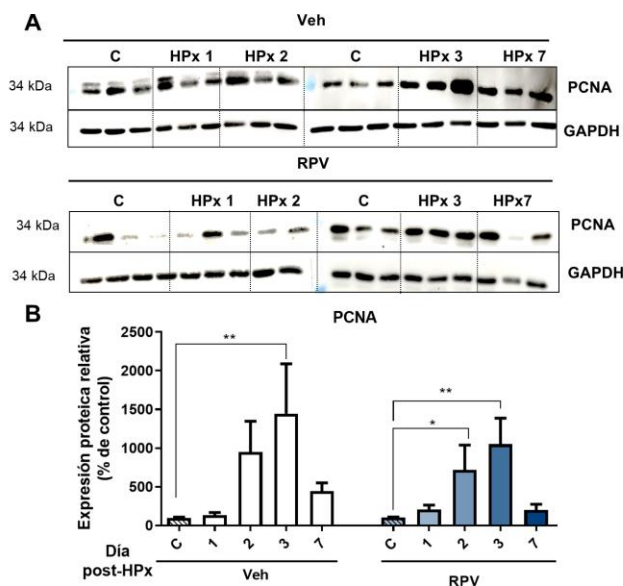


Figura IV.G.2. Evaluación de la expresión proteica del marcador de proliferación PCNA. A) Imágenes representativas de WB para PCNA. Se representan 2-3 ratones por cada una de las condiciones descritas. **B)** Cuantificación de la expresión de la proteína mediante análisis densitométrico de las imágenes de WB. La expresión de PCNA se normalizó frente a la de GAPDH. Los datos representan la media \pm SEM ($n=4-5$) y se expresan en relación con el grupo control de cada tratamiento experimental (vehículo o RPV), que se consideró el 100 %. El análisis estadístico se realizó mediante un test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para cada grupo de tratamiento de manera independiente (RPV o vehículo), comparando los valores de cada punto temporal postcirugía con los de su respectivo control (Sham sacrificados día 7) (* $p<0,05$ y ** $p<0,01$).

Con el objetivo de descartar posibles efectos de RPV sobre la RH en el modelo experimental utilizado, y a pesar de la ausencia de diferencias significativas en el peso hepático tras la administración de RPV, se llevó a cabo un análisis de la expresión génica y proteica de albúmina, un marcador específico de la diferenciación de los hepatocitos. Como se observa en la Figura IV.G.3 A, B, la expresión proteica de este marcador reveló diferencias

entre los dos grupos de tratamiento tras la HPx. Mientras que el grupo tratado con vehículo mostró un aumento en la expresión de albúmina en los días 3 (de manera significativa) y 7 tras el procedimiento quirúrgico, en el grupo tratado con RPV no se observó este efecto, mostrándose un valor estable en todos los días post-HPx, con una ligera disminución a día 1.

En cuanto a la expresión génica, el grupo tratado con vehículo presentó un aumento en los niveles de mRNA a los 7 días tras la cirugía, similar al observado en el grupo tratado con RPV. Sin embargo, el punto de menor expresión para el grupo vehículo se encontró en el grupo control. En el grupo RPV, por el contrario, se observaron los mayores niveles de mRNA en el grupo control y a los 7 días tras la cirugía y la expresión disminuyó al día siguiente de la intervención (Figura IV.G.3 C).

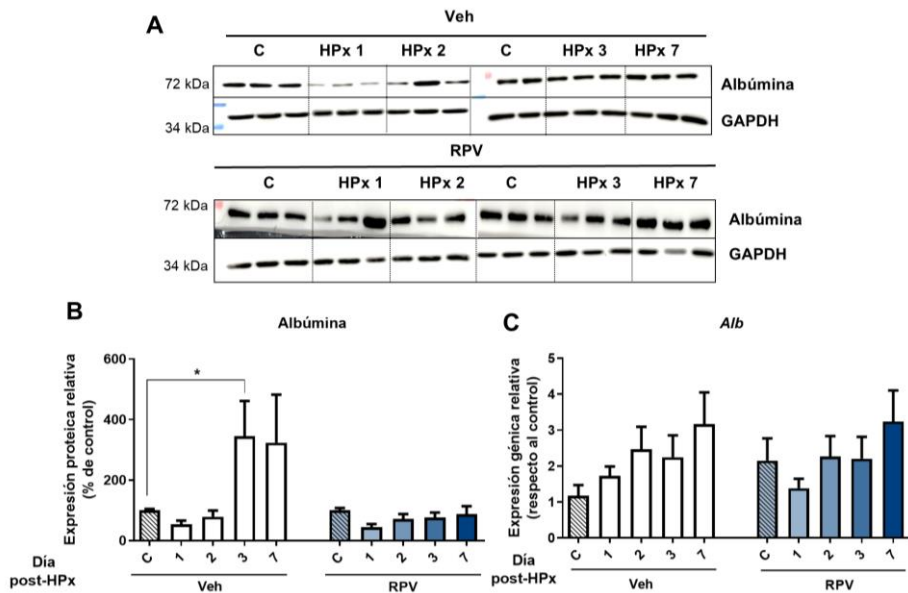


Figura IV.G.3. (Página anterior) Evaluación de la expresión génica y proteica del marcador de hepatocito diferenciado albúmina en el modelo de HPx. A) Imágenes representativas de WB para albúmina. Se representan 3 ratones por cada una de las condiciones descritas. **B)** Cuantificación de la expresión de proteínas mediante análisis densitométrico de las imágenes de WB. La expresión de albúmina se normalizó frente a la de GAPDH. Los datos representan la media \pm SEM ($n=5$) y se expresan en relación con el grupo control de cada tratamiento experimental (vehículo o RPV), que se consideró el 100 %. **C)** Expresión génica relativa de *Alb* analizada mediante RT-qPCR. Los datos representan la expresión relativa respecto a la media de los datos del control vehículo (que se consideró 1), se normalizaron en función de la expresión del gen *Actb* y se muestran como la media \pm SEM ($n=5$). El análisis estadístico se realizó mediante un test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para cada grupo de tratamiento de manera independiente (RPV o vehículo), comparando los valores de cada punto temporal postcirugía con los de su respectivo control (Sham sacrificados a día 7) (* $p<0,05$).

IV.G.3. EFECTO DE RPV EN LAS PRINCIPALES RUTAS DE REGENERACIÓN HEPÁTICA

Con el objetivo de reforzar los hallazgos previos, se procedió a analizar dos rutas clave implicadas en este proceso. En cuanto al análisis de los niveles proteicos del factor de transcripción STAT3 (STAT3 total), ninguno de los dos tratamientos mostró cambios en los días 1 y 2 posteriores al procedimiento quirúrgico. Sin embargo, mientras que el grupo vehículo exhibió una disminución significativa de la expresión de STAT3 a día 7 en comparación con el control, el grupo tratado con RPV mostró un aumento significativo a día 3 y 7. Por otro lado, tanto vehículo como RPV mostraron un aumento de la expresión de pSTAT3 en los días 1 y 2 post-HPx, pero solo RPV alcanzó la significancia estadística. En ambos casos, a día 7 pSTAT3 disminuyó de manera notable la expresión, alcanzándose valores similares al control. Al analizar estos datos mediante el ratio pSTAT3/STAT3, lo que refleja la activación de este factor de transcripción, se obtuvo, tanto en el grupo tratado con RPV como en el tratado con vehículo, un aumento significativo del ratio a día 1 postcirugía, con una disminución progresiva en los días posteriores. Sin embargo, solo RPV mostró significancia estadística de la activación de STAT3 dos días después del procedimiento quirúrgico

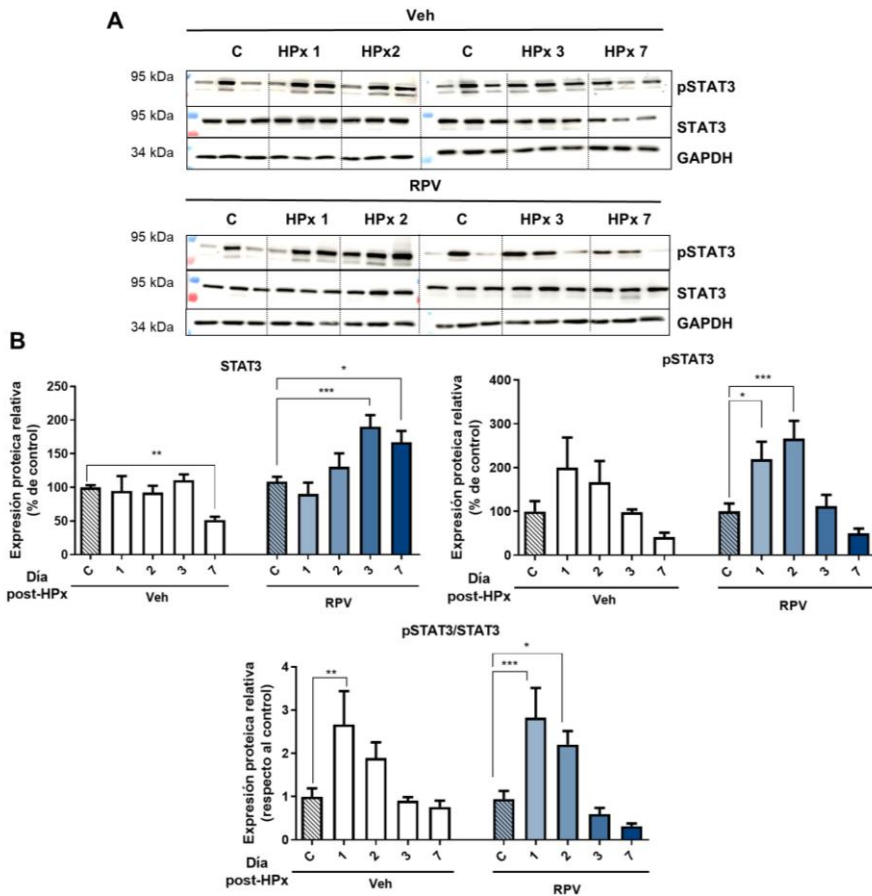
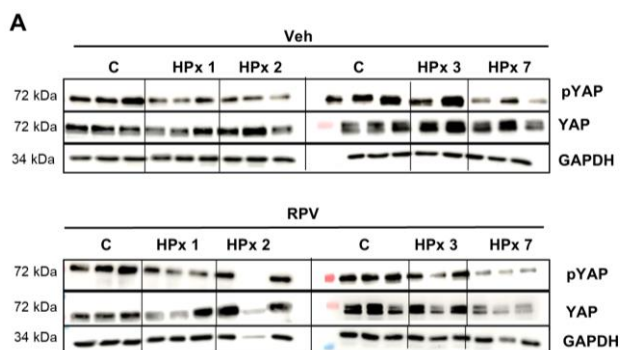


Figura IV.G.4. Evaluación de la activación de STAT3 en el modelo de HPx. A) Imágenes representativas de WB para STAT3 y pSTAT3. Se representan 3 ratones por cada una de las condiciones descritas. **B)** Cuantificación de la expresión de proteínas mediante análisis densitométrico de las imágenes de WB. La expresión de STAT3 y pSTAT3 se normalizó frente a la expresión de GAPDH. Los datos representan la media \pm SEM ($n=5$) y se expresan en relación con el grupo control de cada tratamiento experimental (vehículo o RPV), que se consideró el 100 %. El análisis estadístico se realizó mediante un test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para cada grupo de tratamiento de manera independiente (RPV o vehículo), comparando los valores de cada punto temporal postcirugía con los de su respectivo control (Sham sacrificados a día 7) (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$).

Para investigar el efecto del tratamiento con RPV en la vía de señalización Hippo, se analizó la expresión del factor de transcripción YAP y su forma inactiva (pYAP). Ambos grupos presentaron un ligero aumento de YAP en los primeros días post-HPx (día 1 y 2 vehículo, día 2 y 3 RPV). Sin embargo, el análisis de la fosforilación de YAP reveló diferencias interesantes entre ambos grupos. Mientras que el grupo tratado con vehículo mostró una tendencia a la baja en los niveles de pYAP durante los primeros 3 días después de la HPx, el grupo tratado con RPV presentó un patrón distinto. Concretamente, se observó una disminución significativa de pYAP en los días 1 y 7, mientras que en los días 2 y 3 se evidenció una tendencia al aumento, sin llegar a alcanzar los niveles del grupo control en ningún punto temporal.

inamente, se observó que ambos tratamientos disminuían de manera significativa el ratio pYAP/YAP en los días 2 y 3 después de la HPx, mostrándose una tendencia a aumentar a día 7. En cambio, únicamente RPV mostró una disminución significativa del ratio el día posterior a la cirugía (Figura IV.G.5).



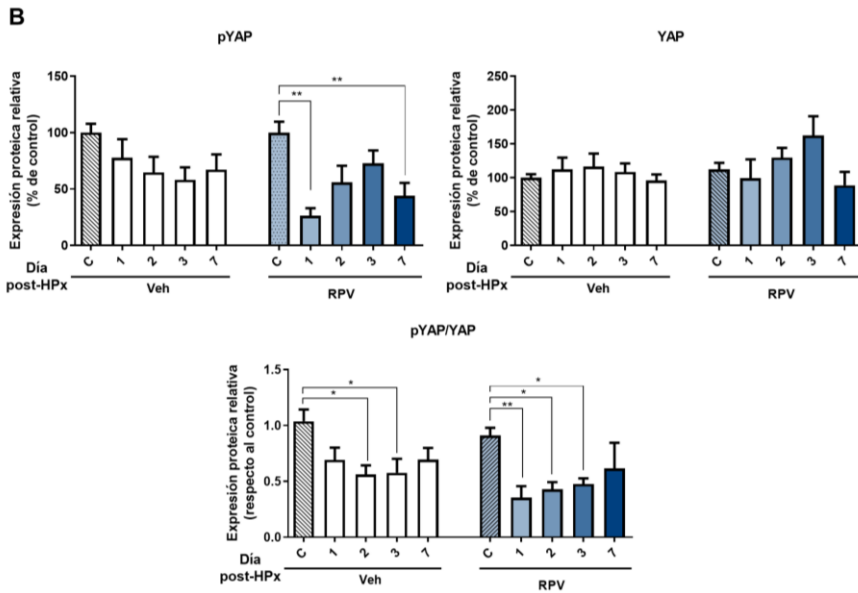


Figura IV.G.5. Evaluación de la inactivación de YAP, proteína clave en la ruta de señalización Hippo. A) Imágenes representativas de WB para YAP y pYAP. Se representan 3 ratones por cada una de las condiciones descritas. **B)** Cuantificación de la expresión de proteínas mediante análisis densitométrico de las imágenes de WB. La expresión de YAP y pYAP se normalizó frente a la expresión de GAPDH. Los datos representan la media \pm SEM ($n=5$) y se expresan en relación con el grupo control de cada tratamiento experimental (vehículo o RPV), que se consideró el 100 %. El análisis estadístico se realizó mediante un test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni para cada grupo de tratamiento de manera independiente (RPV o vehículo), comparando los valores de cada punto temporal post-cirugía con los de su respectivo control (Sham sacrificados a día 7) (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Capítulo V
DISCUSIÓN

Las EHC constituyen un gran desafío para la salud pública a nivel mundial debido a su alta prevalencia y las considerables tasas de mortalidad asociadas. A pesar de los avances terapéuticos, como la reciente aprobación de resmetirom para MASLD (224), la fibrosis, un proceso clave en la progresión de las EHC, aún carece de terapias específicas. La evolución de las EHC a etapas más avanzadas, como la cirrosis, se asocia con un aumento de la morbilidad y la mortalidad. Este proceso es potencialmente reversible en sus etapas iniciales mediante cambios en el estilo de vida o la aplicación de terapias farmacológicas que eliminen los factores etiológicos; sin embargo, estas aproximaciones no siempre son posibles, efectivas o duraderas, por lo que resulta de vital importancia el desarrollo de terapias antifibróticas específicas y eficaces (225,226). En la búsqueda de terapias antifibróticas a nivel hepático, las investigaciones actuales exploran diversas estrategias que abarcan diferentes tipos celulares y mecanismos moleculares. Estas incluyen, entre otras, la protección de los hepatocitos frente a la apoptosis, la mitigación del estrés oxidativo, efectos sobre el metabolismo de glúcidos y lípidos, la prevención de la activación de las HSC, la modulación de importantes vías de señalización como las mediadas por TGF- β , PPARs, FXR y Wnt/ β -catenina y la regulación de la microbiota intestinal y el sistema inmunitario. Si bien se ha progresado en la investigación, la mayoría de los fármacos antifibróticos permanecen en fase de desarrollo preclínico y no superan los ensayos clínicos (119). Una estrategia prometedora en el desarrollo de nuevos tratamientos para la fibrosis hepática es el reposicionamiento farmacológico, que consiste en la utilización de fármacos ya existentes para nuevas indicaciones terapéuticas. Nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente que el fármaco antirretroviral RPV posee propiedades hepatoprotectoras, interfiriendo en el desarrollo de fibrosis hepática en diversos escenarios experimentales *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (182–185). No obstante, los mecanismos moleculares subyacentes a estos efectos no se han dilucidado completamente. Dado el papel fundamental de las HSC en el desarrollo de la fibrosis hepática, esta tesis se centra en el estudio *in vitro* de

los mecanismos moleculares por los cuales RPV modula la fibrogénesis de las HSC.

Frente a una lesión hepática, las HSC experimentan una profunda reprogramación durante su activación que no se limita a cambios fenotípicos, como la adquisición de un fenotipo miofibroblástico, sino que también abarca alteraciones significativas en una amplia gama de procesos celulares, entre los que se incluyen la función mitocondrial, la autofagia, la migración, la proliferación, y la secreción y composición de EV (227–229).

Diversos estudios han investigado los cambios transcriptómicos que ocurren durante la activación de las HSC, utilizando una variedad de metodologías y líneas celulares (225,230–233). En nuestro estudio empleamos TGF- β como estimulante, ya que se ha descrito como el principal ligando que induce el cambio en el perfil transcripcional que conlleva la activación de las HSC (234). El análisis de secuenciación de ARN reveló 2521 DEGs sobreexpresados y 2701 infraexpresados en las hHSC activadas con TGF- β respecto a las células no estimuladas (tratadas con vehículo), evidenciando un claro perfil diferencial en la transdiferenciación de las HSC. La modulación génica observada engloba procesos biológicos cruciales para la activación de las HSC, incluyendo la síntesis de colágeno y otras proteínas de la ECM, o la adhesión celular, de acuerdo con lo reportado en la bibliografía sobre los cambios transcriptómicos asociados a la activación de las HSC (230,235,236). Además, se observó un enriquecimiento de genes relacionados con el tráfico entre el aparato de Golgi y el ER, lo que sugiere un aumento en la síntesis y secreción de proteínas. Este hallazgo se correlaciona con el incremento previamente observado de la producción de proteínas de la ECM, respaldando el conocimiento existente de que la activación de las HSC inducida por TGF- β promueve una mayor producción y secreción de componentes de la ECM. El aumento en el tráfico Golgi-ER destaca la importancia del aparato de Golgi en la activación de las HSC, dado que desempeña un papel crucial en el procesamiento, modificación y transporte de proteínas secretadas implicadas en la fibrosis hepática. Si bien

se ha descrito que la interferencia con la estructura del aparato de Golgi puede inhibir la expresión de componentes de la ECM, se requiere mayor investigación para comprender por completo los mecanismos precisos que rigen la adaptación organular durante la activación de las HSC, incluyendo la expansión del aparato de Golgi y su impacto en la secreción de proteínas de la ECM (237–240).

Más allá de la caracterización transcriptómica de la activación de las HSC, la secuenciación de ARN se ha empleado en distintos estudios para evaluar los efectos de moléculas antifibróticas en estas células con el objetivo de identificar potenciales dianas para la fibrosis hepática. Un estudio mostró que ML290, un agonista del receptor de relaxina RXFP1 con propiedades antifibróticas tanto *in vivo* como *in vitro*, modulaba procesos clave en la activación de LX-2 estimuladas por TGF- β , incluyendo la regulación de la ECM, la deposición de colágeno y la señalización del factor de transcripción p53 (241). De manera similar, la kisspeptina, un neuropéptido con propiedades antifibróticas, disminuye la expresión de genes relacionados con la ECM en células LX-2 activadas con TGF- β (242). De acuerdo con estos hallazgos, observamos que RPV modula a la baja procesos relacionados con la organización ECM y la síntesis de colágeno, además de observarse un efecto proapoptótico mediado por p53.

El ácido retinoico todo-trans (RA), un metabolito activo de la vitamina A, ha demostrado su capacidad para inhibir la proliferación de las HSC y la acumulación de colágeno en varios modelos murinos de fibrosis hepática (243). Concretamente, se ha observado que, en HSC activadas, RA atenúa la fibrogénesis mediante la inhibición de producción de colágeno, la reducción del estrés oxidativo y la alteración de la estructura del aparato de Golgi (244,245). En línea con este estudio, nuestro análisis reveló que la concentración más alta de RPV presentaba, entre los términos infraexpresados más relevantes, aquellos relacionados con el transporte Golgi-ER, correlacionándose con la reducción de la síntesis de proteínas de la ECM.

La activación de las HSC se caracteriza por la pérdida de gotas lipídicas que contienen triacilgliceroles, ésteres de colesterol y ésteres de retinol (246). Nuestro estudio observó una disminución en los genes relacionados con la biosíntesis de lípidos (colesterol y ácidos grasos) tras la administración de RPV. Si bien la transdiferenciación de las HSC quiescentes a un fenotipo activado se asocia tradicionalmente con una disminución en la biosíntesis de lípidos (247), estudios recientes sugieren una relación más compleja entre el metabolismo lipídico y la activación de las HSC. Se ha demostrado que la reducción de la acumulación de lípidos en las HSC mediante la inhibición de la lipogénesis *de novo*, puede restringir su activación y modular la fibrogénesis (139,248). Por ejemplo, firsocostat, un fármaco que inhibe la acetil-CoA carboxilasa (enzima clave en la lipogénesis), ejerció un efecto antifibrogénico en HSC activadas en cultivo, asociándose con el bloqueo de la glucólisis y la OXPHOS (139).

Dado que las HSC activadas contribuyen a la fibrosis hepática no solo mediante la inducción de factores profibróticos, sino también por su proliferación y migración para reparar el daño tisular, se realizó un estudio para evaluar el efecto de RPV sobre estos procesos. En este contexto, se empleó PDGF- $\beta\beta$, una potente citoquina inductora de la proliferación, migración y quimiotaxis de las HSC (249–251). Investigaciones previas han demostrado que ciertos compuestos con propiedades antifibróticas, como el flavonoide baicalina, tienen la capacidad de reducir la proliferación de células HSC-T6 inducida por el PDGF- $\beta\beta$ (252). De manera similar, polidatín, otro compuesto natural con propiedades antifibróticas, también ejerce una actividad antiproliferativa en células LX-2 estimuladas por el mismo mitógeno (253). Nuestros hallazgos son coherentes con estas observaciones, ya que evidencian que RPV contrarresta el incremento de la proliferación de las HSC inducido por el PDGF- $\beta\beta$. Esta reducción en la proliferación es particularmente evidente en el análisis de la expresión génica de *CCND1* y en el recuento celular, siendo notable que RPV, en este estudio, no afectó la viabilidad celular.

En un entorno de daño hepático, las HSC activadas no solo proliferan, si no que migran hacia las áreas lesionadas para iniciar el proceso de reparación (254). Estudios con la línea celular LX-2 y HSC primarias de rata han demostrado que factores de crecimiento como PDGF- $\beta\beta$ estimulan la migración quimiotáctica de estas células hacia el sitio de la lesión (255). Nuestros resultados del ensayo de quimiotaxis corroboran las observaciones previas, mostrando un incremento notable en la migración de las HSC hacia la cámara inferior de la cámara de Boyden tras 48 h de tratamiento con PDGF- $\beta\beta$. De igual modo, el ensayo de cierre de la herida demostró que PDGF- $\beta\beta$ inducía una ligera aceleración en el cierre a las 24 h, si bien el cierre completo no se alcanzaba hasta las 48 h. Esta progresión difiere de la observada en otro estudio con HSC primarias de ratón activadas con el mismo estímulo, donde el cierre completo de la herida se alcanza a las 24 h (256). Esta discrepancia podría atribuirse, entre otros factores, a la menor concentración de PDGF- $\beta\beta$ utilizada en nuestro análisis (10 ng/mL) con respecto a la empleada en este estudio (50 ng/mL). Si bien RPV atenuó el efecto del estímulo tanto en el ensayo de quimiotaxis como en el de cierre de la herida, resaltando su efecto inhibitorio sobre la migración de las HSC, la modulación de la proliferación de las HSC previamente descrita para RPV requiere ensayos adicionales en un medio libre de FBS o con el compuesto quimioterapéutico mitomicina C (257) para minimizar la proliferación celular y, de este modo, atribuir las variaciones observadas exclusivamente a la migración, en lugar de a un efecto combinado de migración y proliferación.

Tras observar las alteraciones en la proliferación y migración celular inducidas por RPV *in vitro*, nos centramos en dilucidar las bases moleculares de estos cambios. Para ello, y considerando la vía de señalización del PDGF- $\beta\beta$, decidimos investigar varios efectores de esta citoquina, incluyendo las MAPK (ERK1/2, JNK y p38) y la vía de señalización mediada por PI3K/Akt, ambos relacionados con procesos celulares claves como la proliferación, migración, supervivencia, apoptosis y crecimiento celular (5,258). En cuanto a las MAPK, demostramos, de acuerdo a lo reportado en la literatura (259–262), que la

estimulación con PDGF- $\beta\beta$ induce un incremento en la fosforilación de JNK1/2 y ERK1/2 en las hHSC, mientras que RPV tiende a contrarrestar el efecto inducido por PDGF- $\beta\beta$ en la fosforilación de JNK1/2. Este hallazgo concuerda con un estudio previo que describe que el compuesto natural *Paeoniae radix* reduce la migración de las HSC (LX-2) activadas por PDGF- $\beta\beta$ mediante la inhibición de quinasas efectoras como pJNK1/2, pp38 y pERK (263). A diferencia de pERK1/2 y pJNK1/2, no observamos un incremento en la fosforilación de p38 tras la estimulación con PDGF- $\beta\beta$, si bien otros estudios reportaron un aumento en la actividad de p38 en HSC (LX-2) con una exposición más breve a PDGF- $\beta\beta$ (5 min) (263). En el caso de ERK1/2, a pesar de que sí que demostramos una activación por PDGF- $\beta\beta$, corroborando hallazgos previos (260), RPV no produjo ningún cambio en la activación de esta quinasa. Esta respuesta diferencial a RPV dentro de la cascada de señalización MAPK (tendencia a la inhibición de algunas quinasas, como JNK1/2, pero no de otras, como ERK1/2) plantea varias hipótesis. Una posibilidad es que el tiempo de exposición a PDGF- $\beta\beta$ (10 min) deba variar dependiendo de la quinasa que se esté estudiando, lo que podría explicar la ausencia de efecto de RPV sobre ERK1/2 y p38. Además, la complejidad de la señalización MAPK, con la posible participación de factores adicionales no considerados en este estudio, también podría contribuir a estos resultados. Finalmente, no se descarta una selectividad de RPV por ciertas quinasas.

Considerando otros efectores de PDGF- $\beta\beta$, como Akt, observamos un aumento en su fosforilación tras la estimulación con PDGF- $\beta\beta$, en línea con lo reportado en la literatura (262), mientras que el tratamiento con RPV tendió a disminuir dicha fosforilación. Un estudio similar reportó que, roseotoxina B, un agente antifibrótico natural, inhibe varias quinasas activadas por PDGF- $\beta\beta$, como pAkt y pERK en HSC de rata (CFSC-8B) (262). Los resultados obtenidos del análisis de los efectores de PDGF- $\beta\beta$ sugiere que el mecanismo de acción de RPV no se limita únicamente a la vía de MAPK, indicando que existe una interrelación entre las vías de señalización que requiere mayor investigación.

Dado que el PDGF- $\beta\beta$, además de su reconocido papel en la proliferación y migración de las HSC, también influye en la fibrogénesis, se evaluó el efecto de RPV en varios marcadores de este proceso en hHSC activadas por dicho estímulo. Si bien no observamos cambios en los niveles de Col1a1, α -SMA y PDGRB tras la estimulación con PDGF- $\beta\beta$, RPV disminuyó la expresión de estos marcadores de forma dependiente de la concentración, confirmando, de nuevo, su papel modulador de la fibrogénesis. La falta de respuesta esperada de PDGF- $\beta\beta$ podría atribuirse a la variabilidad interindividual respecto al grado de activación, dado que las hHSC utilizadas en nuestro estudio fueron aisladas de pacientes sometidos a cirugía hepatoiliar, por lo que es posible la presencia de daño hepático basal que afectara a la capacidad de las hHSC para responder adecuadamente a la estimulación. Esto podría justificar que, en la literatura, estudios realizados en la línea celular LX-2 sí observaran, con la misma concentración de PDGF- $\beta\beta$ utilizada en nuestro estudio, un aumento en la expresión de α -SMA y colágeno (264).

Se han implicado varios procesos en la resolución de la activación de las HSC, como la muerte celular (incluida la apoptosis), la senescencia celular, la reversión a un estado quiescente y la modulación de la autofagia. Estudios previos del grupo demostraron la implicación de la autofagia en los efectos hepatoprotectores y antifibróticos de RPV *in vivo*. Específicamente, concentraciones clínicamente relevantes de RPV indujeron un incremento en la autofagia en dos modelos murinos de daño hepático: el modelo de MASLD inducido por dieta rica en grasas y la fibrosis inducida por CCl₄ (185). En esta línea, varios estudios han reportado una disminución de la autofagia en muestras de hígado total, tanto de modelos *in vivo* de MASLD como en pacientes que padecen esta patología (265–268). Dado que los estudios con muestras de hígado completo no diferencian entre los distintos tipos celulares, y la mayoría de investigaciones han profundizado únicamente en el efecto de este proceso en los hepatocitos (265,267), no es posible descartar la contribución de otros tipos celulares al efecto observado a nivel de hígado total.

Por lo tanto, para determinar el papel de la autofagia en las HSC activadas y el efecto de RPV en este proceso, en esta tesis realizamos experimentos *in vitro* en la línea celular LX-2 empleando como estímulo TGF- β . Numerosas investigaciones han explorado la implicación de la autofagia en la activación de las HSC (83); sin embargo, cómo se regula este proceso y de qué manera interfiere en la transdiferenciación de las HSC sigue siendo un tema de debate. Tradicionalmente, la autofagia se ha considerado un mecanismo profibrótico en las HSC, respaldado por diversos estudios *in vivo* e *in vitro* (269–276). No obstante, estudios recientes sugieren un rol más complejo para la autofagia en la activación de las HSC, incluyendo un posible efecto antifibrótico (277,278). Específicamente, se ha observado que la inducción farmacológica de una autofagia excesiva puede desencadenar la muerte celular en HSC activadas (279,280) y regular negativamente los niveles de mediadores profibróticos clave, como el colágeno y los exosomas profibrogénicos (281,282). Como ejemplo, un estudio realizado en HSC de rata (JS1) demostró que resveratrol inhibe la activación de las HSC mediante la inducción de la autofagia y apoptosis (283). En concordancia con estos hallazgos, observamos que RPV potencia la autofagia en las HSC activadas por TGF- β , como así lo demuestran los marcadores clásicos de autofagia analizados, que indican que RPV incrementa la formación de lisosomas y estructuras autofágicas y acelera el flujo autofágico. Si bien confirmamos la inducción de la autofagia por TGF- β en las HSC, en línea con estudios previos (269,284), este hallazgo contrasta con otra investigación que sugiere que TGF- β disminuye la tasa de formación de autofagosomas (285). Para comprender estas discrepancias, es importante considerar las diferencias metodológicas entre los estudios. Por ejemplo, este estudio utilizó HSC de rata primarias, una concentración diferente de TGF- β (5 ng/mL respecto a 2,5 ng/mL en nuestro estudio) y parámetros distintos para medir la actividad lisosomal. Además, esta investigación no observó cambios en los niveles de ATG5 y ATG7 ni a nivel proteico ni génico tras el tratamiento con TGF- β , y reportó una disminución de p62 a nivel génico y proteico (lo que se asocia a un aumento de

la autofagia) a las 24 h, mientras que en nuestro estudio esta disminución se observó a las 48 h. Por otro lado, evaluaron proteínas como mTOR o P70S6K (una quinasa activada por mTOR), ausentes en nuestra investigación. Estas diferencias en el diseño experimental, incluyendo el tipo de células, la concentración de TGF- β , los parámetros analizados y los tiempos de incubación podrían explicar las discrepancias entre los resultados.

Estudios posteriores realizados por nuestro grupo sobre el proceso de autofagia en relación con la activación de las HSC demostraron varios aspectos cruciales. Por un lado, observamos que el aumento de autofagia inducido con RPV parece estar involucrado en la capacidad del fármaco para inducir la muerte celular (185). Este hallazgo es relevante dado que, entre las estrategias propuestas para tratar la fibrosis hepática, el aumento de la apoptosis en las HSC activadas se considera un enfoque prometedor. De hecho, nilotinib y sorafenib, dos inhibidores de quinasa utilizados como fármacos antineoplásicos y recientemente reportados como potenciales antifibróticos, inducen apoptosis y muerte celular autofágica en las HSC activadas (286,287). Por otro lado, descubrimos que, si bien la muerte celular de las HSC inducida por RPV está relacionada con la autofagia, el efecto del fármaco sobre la fibrogénesis (evaluada por la expresión de Col1a1) es independiente de este proceso. Además, demostramos que no existe una correlación directa entre la fibrogénesis y la viabilidad celular, lo cual es de especial interés, ya que sugiere que la muerte de las HSC y la reversión de su activación son procesos independientes, al menos bajo ciertas circunstancias (185).

Numerosos estudios han demostrado el potencial antifibrótico de las estatinas en la fibrosis hepática (288–290). La SV, por ejemplo, mejora el pronóstico de la fibrosis asociada a MASLD mediante la modulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial y la óxido nítrico sintasa inducible, así como con la inhibición de la activación de las HSC en un modelo *in vivo* de MASLD (291). La fluvastatina, por otro lado, inhibe *in vitro* la activación de las HSC (HSC-T6) inducida por el efecto paracrino de los hepatocitos, e *in vivo* atenúa la activación

de las HSC y la fibrogénesis hepática inducida por esteatosis a través de la mitigación de la inflamación y el estrés oxidativo (292). En un estudio transversal analítico que empleó la elastografía transitoria para evaluar la fibrosis, se observó una correlación entre la administración de estatinas y una menor probabilidad de desarrollar fibrosis hepática avanzada en pacientes con diabetes de tipo 2 (293). En la misma línea, otro estudio transversal de pacientes diabéticos con MASLD (confirmada por biopsia), mostró una correlación inversa e independiente entre el uso de estatinas y la presencia de MASH y fibrosis significativa (294). Si bien algunos ensayos clínicos no han observado una mejora en la fibrosis hepática con el uso de estatinas en pacientes que padecen MASH y MASLD (295–297), un estudio de casos y controles reportó una reducción en el riesgo de desarrollo de fibrosis hepática significativa asociada al uso de estatinas en pacientes con MASLD (298) y un metaanálisis concluyó que el tratamiento con estos fármacos suponía un menor riesgo de desarrollo de HCC en pacientes con MASLD y fibrosis avanzada (299,300).

La combinación de terapias farmacológicas es esencial para desarrollar nuevas estrategias de prevención y tratamiento de enfermedades. Estudios preclínicos demuestran la eficacia sinérgica de ciertos fármacos al actuar sobre múltiples vías, ofreciendo ventajas como la reducción de dosis, toxicidad y resistencia a los fármacos. En la fibrosis hepática, dada su compleja patogénesis, esta estrategia combinada se presenta como una alternativa prometedora para mejorar la eficacia terapéutica (301). Considerando el efecto hepatoprotector de RPV y el potencial antifibrótico de las estatinas en diversas EHC, decidimos evaluar la posible sinergia entre ambos fármacos. En concreto, demostramos la capacidad de SV para potenciar el efecto antifibrogénico de RPV, mostrándose una disminución de la expresión de *PDGFRB*, *SERPINE1* y *TIMP1* y un aumento en la expresión de *MMP2* con la combinación de ambos fármacos. La función de *MMP2* como enzima proteolítica involucrada en la remodelación de la ECM está ampliamente documentada (34). Sin embargo, la interpretación de los cambios en su expresión en el contexto de la fibrogénesis hepática ha

generado resultados aparentemente contradictorios. Por ejemplo, se ha reportado que filigenina, un compuesto hepatoprotector, disminuye la expresión de *MMP2* inducida por TGF- β en HSC primarias de ratón y en la línea celular LX-2, mientras que aumenta la expresión de *TIMP1* (302). De manera contraria, otros estudios, en línea con el nuestro, observaron un aumento de *MMP2* en células LX-2 estimuladas con TGF- β , y una posterior reducción con liquiritigenina, un compuesto con propiedades antifibrogénicas (303). Esta dualidad también se ha observado en estudios *in vivo*. Por ejemplo, modelos murinos de fibrosis hepática inducida por CCl₄ muestran un aumento en la expresión de *MMP2*, principalmente por las HSC (304), mientras que otros reportan un aumento de *MMP2* durante la recuperación espontánea de la cirrosis inducida por el mismo compuesto (305). Asimismo, se ha observado una exacerbación de la fibrosis en ratones *knockout* para *MMP2*, tanto en modelos de fibrosis colestásica (inducida por BDL) como en modelos de fibrosis inducida por CCl₄ (305). Por todo lo descrito, los resultados acerca de la expresión génica de este marcador en nuestro estudio deben considerarse con cautela e interpretarse en conjunto con el resto de los parámetros estudiados de fibrogénesis.

La creciente evidencia científica sugiere que la señalización mediada por la vía JAK-STAT desempeña un papel fundamental en la regulación tanto de la progresión del daño hepático crónico como de los procesos de RH (306). Un aspecto relevante es la activación de STAT1 y STAT3, que se produce tanto en células parenquimales como no parenquimales del hígado, ejerciendo roles contrarios en aspectos esenciales de la fisiopatología hepática (307). En el caso de los hepatocitos, la activación de STAT1 constituye una señal proapoptótica que contribuye a la exacerbación del daño hepático, mientras que la activación de STAT3 ejerce un efecto protector promoviendo la proliferación celular (308). Por el contrario, en las HSC, la activación de STAT1 limita la proliferación celular y la actividad fibrogénica ejerciendo efectos beneficiosos en el microambiente hepático, mientras que la activación de STAT3 resulta perjudicial al promover la

fibrogénesis (307,309,310). Investigaciones previas del grupo demostraron que RPV modulaba la vía STAT1/STAT3 en tres modelos *in vivo* de daño hepático, resultando en la atenuación de la fibrosis. Además, estudios *in vitro* reportaron que RPV ejercía un efecto dual sobre las HSC: promovía la apoptosis mediante la activación de STAT1 e inhibía la fibrogénesis al reducir la activación de STAT3 (182). El presente estudio revela la presencia de sinergia en la combinación de RPV con SV sobre la modulación de estos factores de transcripción. Específicamente, SV potencia el efecto de RPV aumentando la fosforilación de STAT1 y disminuyendo la de STAT3, lo que resulta en un incremento del efecto antifibrótico (corroborado por la expresión proteica de Col1a1) y proapoptótico en las HSC. En este contexto, hemos observado una disminución en la viabilidad de las células LX-2 activadas tras 24, 48 y 72 h de tratamiento combinado con RPV y SV. En vista de estos resultados, es plausible pensar que la sinergia observada en combinación de ambos fármacos en la fosforilación de STAT1 se traduce en una mejora en la respuesta proapoptótica de RPV. Este hecho tiene especial relevancia, ya que otras investigaciones han demostrado que los ratones *knockout* para STAT1 exhiben una mayor susceptibilidad al desarrollo de fibrosis hepática, así como una capacidad reducida para resolver esta condición patológica. Este déficit en la resolución de la fibrosis se ha atribuido a la incapacidad de STAT1 para activar vías antiproliferativas esenciales que inducen la quiescencia en las HSC (311,312). Cabe destacar que, si bien la literatura describe la reducción de la viabilidad celular de las HSC con SV en monoterapia, este efecto se produjo a concentraciones más altas a la empleada en nuestro estudio (313).

Las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de las estatinas, que son independientes de sus efectos hipolipemiantes, participan en los mecanismos de protección de estos fármacos, relevantes para la prevención o tratamiento de diversas enfermedades (314–317). Uno de los mecanismos propuestos para su acción antioxidante es la inducción de un conjunto de enzimas de detoxificación y antioxidantes a través de la vía de señalización de Nrf2 (318).

Se ha descrito que las estatinas pueden aumentar significativamente la actividad de unión de Nrf2 al ADN, e inducir la expresión de sus genes diana, como *NQO1*, protegiendo así a las células de los efectos nocivos del estrés oxidativo (318). La terapia con estatinas disminuye la producción de ROS al estimular Nrf2 a través de la vía PI3K/Akt, tal y como se ha demostrado en modelos *in vitro* empleando células ST2 (células del estroma) y en fibroblastos embrionarios de ratón (319). En relación con la patología hepática, en un modelo murino de MASH se observó que SV reducía el daño hepático causado por el estrés oxidativo mediante la activación de enzimas antioxidantes vía Nrf2, además de atenuar el estrés del ER (320). Por otro lado, estudios *in vitro* en HSC primarias de rata han demostrado que el efecto antifibrótico de las estatinas se acompaña de un incremento en la activación de Nrf2 y la expresión de *HO-1* y *NQO1* (173). Nuestros resultados, en concordancia con lo reportado en la literatura, demuestran que SV en monoterapia aumenta la expresión proteica de Nrf2 y la expresión de dos de sus genes diana: *NQO1* y *HO-1* en las HSC estimuladas por TGF- β . La administración conjunta de RPV y SV potencia este efecto antioxidante, incrementando tanto la expresión proteica y señal de Nrf2 por microscopía de fluorescencia, como la expresión de *NQO1*. Si bien el análisis de fluorescencia a nivel celular reveló una disminución estadísticamente significativa de la señal de Nrf2 en los tratamientos individuales, la magnitud de este cambio fue pequeña y debe interpretarse con cautela.

La potenciación de la vía Nrf2 por la combinación de ambos fármacos es un hallazgo relevante considerando la importancia de este factor de transcripción en la homeostasis hepática y, particularmente, en la regulación de la activación de las HSC, tal como se ha documentado ampliamente en la literatura científica. Estudios en modelos murinos *knockout* para Nrf2 han demostrado un retraso significativo en la reparación espontánea del daño hepático inducido por CCl₄, en relación con ratones control. Además, la exposición prolongada a CCl₄ en estos ratones *knockout* intensifica la fibrosis y la inflamación hepática (321). Resultados similares se han obtenido en un modelo animal de daño hepático

inducido por paracetamol (APAP, por sus siglas en inglés) donde la deficiencia de Nrf2 agrava la deposición de colágeno y la activación de HSC en el hígado total (322). Por otro lado, la activación farmacológica de Nrf2, por ejemplo, con andrografólido, ha demostrado mitigar el daño hepático inducido por APAP en un modelo murino al promover la expresión de genes antioxidantes y reducir la activación de HSC (322). Asimismo, dimetilfumurato atenúa la activación de HSC inducida por tioacetamida en un modelo *in vivo* de daño hepático, un efecto asociado a la supresión de la inflamación y la inducción de Nrf2 (323). En conjunto, la evidencia preclínica respalda el papel crucial de Nrf2 en la protección hepática y posiciona su inducción como una diana terapéutica prometedora para el tratamiento de la fibrosis.

El análisis de la expresión génica de enzimas relacionadas con la defensa celular al estrés oxidativo reforzó los resultados previamente descritos del efecto antioxidante sinérgico entre SV y RPV. Si bien individualmente ninguno de los fármacos mostró un efecto apreciable, su combinación aumentó la expresión de estas enzimas. La ausencia de efecto en este análisis con SV en monoterapia, a diferencia de lo previamente reportado (318,324), podría atribuirse a la reducida concentración empleada del fármaco en nuestro estudio, que se seleccionó para evitar posibles interferencias derivadas de altas concentraciones de ambos fármacos al analizar el efecto combinado.

Para evaluar la contribución de Nrf2 al efecto antifibrótico observado con la combinación de SV y RPV, se silenció este factor de transcripción. El silenciamiento de Nrf2 resultó en un aumento en la producción de colágeno en todas las condiciones experimentales, confirmando su papel protector en la activación de las HSC. Sin embargo, a pesar de que el silenciamiento anuló la significancia estadística de la reducción de colágeno observada con la combinación de los fármacos, la tendencia a la baja en la producción de colágeno se mantuvo. Por el contrario, el silenciamiento de Nrf2 sí afectó otros parámetros celulares modulados por la terapia combinada. Concretamente, la disminución en la viabilidad celular observada con el tratamiento combinado no

se obtuvo al silenciar Nrf2. Además, el efecto de SV+RPV sobre la producción de ROS se invirtió con el silenciamiento, pasando de una disminución a un aumento. Estos resultados sugieren que, si bien la combinación SV+RPV activa la vía Nrf2, y esta ejerce un efecto protector en las HSC en términos de viabilidad y producción de ROS, la influencia de la combinación sobre la producción de colágeno no parece estar mediada por Nrf2. No obstante, se requieren estudios adicionales que evalúen otros marcadores de fibrogénesis para dilucidar completamente la relación entre la vía Nrf2 y la fibrogénesis en el contexto del tratamiento combinado.

Las mitocondrias son esenciales para los procesos biosintéticos, la respuesta al estrés y el metabolismo energético celular. Además, actúan como fuente y diana de ROS intracelulares, desempeñando un papel clave en la progresión de la fibrosis hepática mediada por estrés oxidativo (325,326). Si bien la investigación sobre el papel de las mitocondrias en la patogénesis de las EHC ha avanzado considerablemente, se ha enfocado principalmente en los hepatocitos, siendo menos los estudios que exploran la función de estos orgánulos en las HSC activadas. Se ha descrito que, en comparación con las HSC quiescentes, las HSC activadas exhiben una función mitocondrial más elevada, caracterizada por un incremento en la respiración mitocondrial basal y máxima, la producción de ATP, la capacidad respiratoria de reserva y, en algunos casos, la fuga de protones. Además, también se observan aumentadas actividades metabólicas como la glucólisis y la glutaminólisis (327–329). Este perfil metabólico indica un estado adaptativo que sustenta la transición de las HSC hacia un fenotipo activado, profibrogénico y productor ECM. Existen pruebas de que diferentes compuestos antifibróticos, como saikosaponina, disminuyen tanto el OCR como la ECAR en las HSC activadas (330). En consonancia, nuestro análisis muestra que, si bien TGF- β induce un aumento en estos parámetros bioenergéticos, RPV es capaz de restaurar los niveles a valores similares a las células sin estimular.

El $\Delta\psi_m$ también se ve alterado durante la activación de las HSC, aunque los datos publicados al respecto son contradictorios. Existe evidencia de un aumento en $\Delta\psi_m$ en células LX-2 y HSC de rata cultivadas en frascos de cultivo de plástico regular (fenotipo activado o fibrogénico) en comparación con HSC menos activas (no fibrogénicas) cultivadas en Matrigel Geltrex (331) o en la línea celular de HSC de rata HSC-T6 expuesta a PDGF- $\beta\beta$ durante 24 h (261). De hecho, tratamientos antifibrogénicos *in vitro* con compuestos naturales disminuyen el $\Delta\psi_m$, como en el caso de las células HSC-T6 activadas espontáneamente bajo exposición aguda a saikosaponina (330) o células HSC-T6 activadas con PDGF- $\beta\beta$ y tratadas con didimina (24 h) (261). En contraste con estos hallazgos, se ha reportado una disminución en el $\Delta\psi_m$ tanto en células LX-2 como en HSC primarias de ratón expuestas a material particulado fino profibrogénico (PM2.5) (332). Nuestros experimentos, en consonancia con este estudio, revelan que RPV atenúa la disminución del $\Delta\psi_m$ inducida por TGF- β en células LX-2. Sin embargo, es importante considerar que, otro estudio utilizando una concentración similar de TGF- β (2 ng/mL) en la misma línea celular, no observó cambios en el $\Delta\psi_m$ tras la estimulación (333). Esta discrepancia subraya la necesidad de investigaciones adicionales para comprender completamente el efecto de TGF- β en la modulación del $\Delta\psi_m$ en las HSC.

También observamos que la activación de las HSC por TGF- β induce un aumento en la tasa respiratoria mitocondrial y una mayor fuga de protones a través de la IMM. Esta fuga puede ser atribuida a un incremento en la conductancia de la membrana a los protones o a una disminución en la eficiencia de las bombas de protones de la ETC. El resultado es una disipación del gradiente de protones, obligando a la cadena respiratoria a intensificar su actividad para mantener un $\Delta\psi_m$ suficiente para la síntesis de ATP. Este fenómeno se denomina disociación rédox o desacoplamiento entre la ETC y la OXPHOS. El desacoplamiento mitocondrial, más allá de su papel en la termogénesis y la protección contra el estrés oxidativo, es crucial para la regulación metabólica celular. Este proceso aumenta el flujo del ciclo de TCA,

favoreciendo así la síntesis e intercambio de metabolitos. Los intermediarios del ciclo de TCA, a su vez, sirven como precursores de aminoácidos no esenciales y participan en otros procesos anabólicos vía cataplerosis. El transporte de piruvato a la matriz mitocondrial, mediado por el transportador de piruvato mitocondrial (MPC, por sus siglas en inglés), es esencial para el ciclo TCA, ya que el piruvato es un precursor fundamental para la generación de acetil-CoA. El MPC está compuesto por dos proteínas, MPC1 y MPC2, que forman un complejo heterooligomérico. En este contexto, el tratamiento con RPV resultó en la normalización tanto de la tasa respiratoria como de la fuga de protones, devolviendo estas variables a niveles cercanos al estado basal. Curiosamente, también se observó que el fármaco disminuía la expresión del ARNm de *MPC1* en las hHSC estimuladas con TGF- β y tratadas con RPV. Este hallazgo es particularmente relevante, ya que la inhibición de MPC en HSC ha demostrado efectos antifibróticos en modelos *in vivo* de MASH (334). Además, MPC1 tiene un papel fundamental en otros órganos, como, por ejemplo, en el mantenimiento del fenotipo de miofibroblastos corneales en estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* (335). Estos hallazgos demuestran que MPC podría constituir una diana antifibrogénica prometedoras. Asimismo, la reducción de MPC1 por RPV observada en nuestro estudio podría reflejar un mecanismo adicional mediante el cual este fármaco regula el metabolismo mitocondrial: la normalización del desacoplamiento por RPV reduce el gradiente de protones excesivo, estabilizando el metabolismo, mientras que la disminución de MPC1 parece limitar la disponibilidad de piruvato para el ciclo TCA, restringiendo la generación de intermediarios anabólicos. Ambos efectos podrían estar actuando de manera complementaria para frenar procesos metabólicos profibrogénicos en las HSC activadas.

La producción elevada de ATP en las HSC activadas se ha atribuido tanto a un aumento en la biogénesis mitocondrial como a una mayor eficiencia funcional de las mitocondrias existentes; sin embargo, la contribución relativa de cada mecanismo aún no se ha dilucidado completamente. Se ha propuesto que,

además de la reprogramación de las funciones mitocondriales existentes, la demanda energética requerida para la activación de las HSC se cubre mediante un incremento en la biogénesis mitocondrial y la expresión de genes relacionados (326). En este estudio, demostramos que la activación de células LX-2 con TGF- β induce, tal y como se esperaba, un aumento en la masa mitocondrial, acompañado de un incremento específico en la expresión de proteínas mitocondriales clave, incluyendo MT-ND1. Esta proteína está codificada por el ADNmt y es esencial para el ensamblaje y la estabilidad del complejo I de la ECT (crucial para la respiración mitocondrial) (336). Además de esta proteína, las células activadas mostraron también un incremento en la expresión de porina, principal componente de la OMM que tiene un papel fundamental en el transporte de metabolitos, iones y nucleótidos entre el citosol y el espacio intermembrana mitocondrial (337). Al igual que ocurría con el resto de los parámetros mitocondriales comentados anteriormente, RPV atenuó el aumento inducido por TGF- β en la expresión de ambas proteínas.

La desregulación de la dinámica mitocondrial ya sea por fusión o fisión excesiva, se ha asociado a diversas enfermedades, entre las que se encuentran las hepáticas (338,339). Sin embargo, la naturaleza de esta desregulación en el contexto de la fibrosis hepática es compleja y varía según el modelo estudiado. Algunos estudios reportan una asociación entre el aumento de la fisión mitocondrial y la progresión de la fibrosis, como se observa en modelos murinos de fibrosis hepática alcohólica y esquistosomiasis, así como en pacientes con enfermedad hepática alcohólica (340,341). En contraste, otros modelos murinos de MASLD y MASH inducida por dieta muestran mitocondrias agrandadas y una disminución en la fisión mitocondrial (342,343). Esta divergencia en los hallazgos resalta la complejidad de la dinámica mitocondrial en la enfermedad hepática y subraya la necesidad de una interpretación cautelosa de los resultados. En el caso específico de las HSC, la literatura también presenta resultados dispares. El tratamiento con extracto de *Turnera diffusa* en células LX-2 expuestas a TGF- β disminuyó los niveles de MFN2, lo que podría sugerir

una inhibición de la fusión mitocondrial. Sin embargo, este estudio no profundizó en el análisis funcional de la dinámica mitocondrial (344). Por otro lado, en HSC primarias de rata activadas espontáneamente, se observaron mitocondrias fusionadas a día 7 a pesar de una disminución en la expresión proteica de MFN1 y MFN2, mientras que al día 1 de activación de las HSC se reportó un aumento de estas proteínas (345), resaltando la complejidad de la dinámica mitocondrial también en el contexto de la activación de las HSC. Nuestros resultados en células LX-2 muestran que el TGF- β induce un aumento en la expresión de Drp1 fosforilada (pDrp1), un marcador de fisión mitocondrial, junto con una disminución en las ramificaciones mitocondriales. Sin embargo, RPV atenuó tanto el aumento de pDrp1 como la disminución de las ramificaciones mitocondriales, apuntando a un posible efecto beneficioso de RPV al contrarrestar el desequilibrio en la dinámica mitocondrial inducido por TGF- β . Del mismo modo, también demostramos que las mitocondrias en células LX-2 activadas (expuestas a TGF- β) presentan alteraciones en tamaño y forma, según lo revelado por microscopía de fluorescencia y TEM. Este hallazgo concuerda con otros estudios que describen mitocondrias más pequeñas y redondeadas (menos alargadas) en HSC activadas en comparación con células quiescentes, como en el caso de la activación de LX-2 inducida por succinato (346) o en células HSC-T6 activadas por TGF- β (347).

La secuenciación de RNA también reveló varias dianas potenciales en la acción antifibrogénica de RPV a nivel mitocondrial. Siguiendo los criterios de potencia estadística (menor p valor) y/o mayor cambio en la expresión génica (*fold change*), destacamos varios mitoDEGs. Entre ellos, *FK506-binding protein 10 (FKBP10)* y *mitochondria-associated myosin 19 (MYO19)* se encuentran sobreexpresados en células expuestas a TGF- β , mientras que este aumento se previno con el cotratamiento con RPV 4 μ M o RPV 8 μ M. Según la base de datos MitoCarta, FKBP10 (también llamado FKBP65) está presente en el espacio intermembrana mitocondrial y tiene un dominio compartido mitocondrial y no mitocondrial. La FKBP10 presente en el ER está asociada con la síntesis

de colágeno, un proceso complejo en el que tres cadenas de procolágeno (dos de pro- α 1 y una de pro- α 2) se pliegan en una triple hélice. Este proceso involucra múltiples catalizadores de plegamiento, incluyendo peptidil-prolil isomerasas como FKBP10, FKBP11 y FKBP14, que se consideran enzimas limitantes de la velocidad, ya que el número de residuos de prolina en la molécula de colágeno es relativamente alto (348). MYO19, por su parte, se localiza en la OMM, tal y como indica MitoCarta. Contiene un dominio compartido (mitocondrial y no mitocondrial) y transporta mitocondrias a lo largo de los filamentos de actina en células vivas. A pesar del limitado conocimiento actual sobre la función de esta proteína en el hígado, un metaanálisis la ha identificado como componente de una firma de expresión génica hepática en la progresión de MASLD en pacientes (349).

La comunicación intercelular desempeña un papel fundamental en la patogénesis de diversas enfermedades hepáticas. En este contexto, las EV han emergido como importantes mediadores de la señalización en el microambiente hepático, modulando la homeostasis hepática o contribuyendo a la progresión de las diferentes patologías hepáticas. Dado que la activación de las HSC conlleva una transformación que se refleja también en su proteoma (247) y con el objetivo de conocer la asociación de estos cambios con la secreción y composición proteica de exosomas, se caracterizó el proteoma de las células (LX-2) secretoras (bajo estimulación con TGF- β , estimuladas y tratadas con RPV, o células sin estimular). El análisis proteómico reveló que TGF- β induce un aumento en la expresión de proteínas con funciones en la síntesis de colágeno, la reorganización de la ECM, la motilidad y la migración celular, de acuerdo con lo observado en el estudio de secuenciación de ARN comentado previamente, y en concordancia con diversos estudios de la literatura (247,350,351). Además, las HSC activadas mostraron un enriquecimiento en términos relacionados con la adhesión celular, un aspecto crucial en la actividad contráctil de las HSC (350,352). En línea con lo reportado en otras investigaciones, los términos regulados a la baja que encontramos más

destacados en las HSC activadas fueron aquellos relacionados con la muerte celular, ciclo celular, replicación y reparación de ADN (350,351).

El análisis proteómico confirmó el efecto antifibrótico de RPV previamente descrito en esta tesis, al modular proteínas clave implicadas en la patogénesis de la fibrosis hepática. RPV atenuó procesos exacerbados por TGF- β como la migración, adhesión celular y la síntesis y deposición de proteínas de la ECM. Específicamente, RPV contrarrestó el aumento inducido por TGF- β en diversas proteínas, incluyendo la cadena α -1 del colágeno tipo I, cadena α -1 del colágeno tipo III, cadena α -1 del colágeno tipo V, cadena α -1 del colágeno tipo XVIII, cadena α -2 del colágeno tipo I y potenciador 1 de la C-endopeptidasa del procolágeno. Asimismo, RPV aumentó la expresión de proteínas relacionadas con la muerte celular programada (infraexpresadas con TGF- β) y con la apoptosis. Este hallazgo es relevante, ya que corrobora los resultados del análisis transcriptómico de hHSC descrito previamente.

Diversas investigaciones destacan la importancia de la apoptosis de las HSC en la regresión de la fibrosis (353,354). Por ejemplo, el fármaco antidiabético metformina ha demostrado atenuar la fibrosis hepática *in vitro* (células LX-2 y HSC-T6) e *in vivo* (modelos murinos de MASH) reduciendo el número de HSC activadas mediante la inducción de apoptosis (355). De manera similar, el extracto de *Lamiophlomis rotata*, que contiene compuestos con efecto antifibrótico *in vitro* (LX-2 y HSC-T6) e *in vivo*, induce la apoptosis en HSC activadas a través de su efecto sobre la vía de señalización TGF- β /Smad (356,357). De hecho, la inducción de apoptosis como estrategia antifibrótica también se ha explorado clínicamente con inhibidores de ASK1, una quinasa implicada en la regulación positiva de la apoptosis. Un ejemplo es selonsertib, cuyos resultados en ensayos clínicos han sido mixtos. Mientras que estudios iniciales reportaron efectos beneficiosos en la regresión de la fibrosis en pacientes que padecen MASH, ensayos clínicos más recientes no han logrado demostrar una reducción significativa de este parámetro en pacientes con MASH (358–360).

El análisis proteómico también mostró un enriquecimiento de términos relacionados con la autofagia tras el tratamiento con RPV, en concordancia con los resultados descritos previamente en esta tesis. Curiosamente, también se observó una sobreexpresión del término mitofagia, un tipo selectivo de autofagia que degrada las mitocondrias disfuncionales o excesivas mediante una compleja interacción con la maquinaria autofágica. Este proceso se ha implicado en la patogénesis de diversas patologías hepáticas, incluyendo hepatitis viral, daño hepático, HCC, esteatosis y fibrosis hepática (361). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones sobre el rol de la mitofagia en la fibrosis hepática se han centrado en hepatocitos y células de Kupffer, más que en las HSC (362). La función de la mitofagia en la activación de las HSC es compleja y aún no se ha dilucidado por completo. Algunos estudios sugieren que la mitofagia juega un papel clave en la activación de las HSC (332). Por ejemplo, estudios que emplearon CCCP (un desacoplador mitocondrial) mostraron una inducción de la mitofagia y resultaron en la activación de las HSC (363). Sin embargo, otras investigaciones han reportado que el aumento de la mitofagia ejerce un efecto antifibrótico (364,364,365,365–367). Diversos estudios de la literatura apuntan a una interrelación entre mitofagia y apoptosis en las HSC durante la reversión de la fibrosis. Por ejemplo, la inhibición de la mitofagia suprime la apoptosis en HSC y agrava la fibrosis en un modelo murino de daño hepático inducido por CCl₄ (362), sugiriendo una posible sinergia entre mitofagia y apoptosis en la resolución de la fibrosis. Considerando este contexto, es plausible que el efecto antifibrogénico de RPV se deba, al menos parcialmente, a la inducción simultánea de ambos procesos. Sin embargo, se precisan experimentos más detallados sobre el rol de RPV en la inducción de la mitofagia.

Se ha documentado ampliamente la alteración del metabolismo en las HSC activadas, caracterizado por una mayor dependencia de la glucólisis y la glutaminólisis para satisfacer las demandas energéticas de la transdiferenciación y la síntesis de proteínas de la ECM (331,345,368–370). Si

bien estudios previos han demostrado que la inhibición farmacológica de determinadas enzimas glucolíticas reduce la fibrosis hepática (345,369,370), RPV induce la sobreexpresión de términos relacionados con la glucólisis. Este resultado, aparentemente contradictorio, podría explicarse teniendo en cuenta los hallazgos de un estudio proteómico de células LX-2 que demostró que la reversión a la quiescencia está asociada con una regulación positiva de términos relacionados con el metabolismo de carbohidratos, glucosa y el ciclo de TCA (306). En base a este estudio, se podría suponer que RPV induce una regulación al alza de la glucólisis no para sostener la fibrogénesis, sino como parte de un proceso de transición hacia un fenotipo quiescente, hipótesis que requiere mayor investigación. Por ejemplo, se podría determinar la actividad glucolítica y el flujo metabólico en HSC tratadas con RPV y compararlas con HSC quiescentes y activadas, e investigar el impacto de la inhibición de la glucólisis en presencia de RPV sobre la reversión a la quiescencia.

Las Rho GTPasas son reguladores importantes de las vías de transducción de señales. Su actividad es crucial en la regulación de la organización de la actina y la dinámica del citoesqueleto, la morfología celular, la migración y supervivencia celular, la adhesión y la contracción en una amplia gama de células, incluidas las HSC. Esta familia incluye 23 miembros, entre los que se encuentran RhoA, Rhob, RhoC y RhoH (371–373), siendo la RhoA la GTPasa más estudiada en las HSC. Se ha reportado que TGF- β aumenta tanto la expresión de la proteína total como de la forma activa, y este efecto está relacionado con la promoción de la migración en las HSC (primarias de rata y HSC-T6) mediante el ensamblaje de los filamentos de actina (374). En la misma línea, un estudio realizado en HSC primarias de rata demostró que PDGF- $\beta\beta$ inducía la remodelación del citoesqueleto de las HSC y promovía su migración a través de la regulación de RhoA intracelular (375). Si bien los análisis individuales de los distintos marcadores demostraron que RPV atenúa la migración y fibrogénesis de las HSC, paradójicamente, los términos sobreexpresados más destacados con la concentración más alta del fármaco

en el análisis de proteómica fueron aquellos relacionados con las Rho GTPasas (específicamente A, B, C y H). Sin embargo, la sobreexpresión de las proteínas incluidas en estos procesos no implica necesariamente su activación. Por lo tanto, para comprender el papel de RPV en la modulación de las Rho GTPasas y determinar si su efecto en la expresión proteica es independiente de su función en la migración y la fibrogénesis, se requiere una investigación más profunda.

La investigación sobre las EV derivadas de las HSC es aún menos extensa que la de otros tipos celulares hepáticos. No obstante, existe un creciente interés en comprender su papel, no solo por la acción de las HSC como receptoras de señales de otras células, sino también como emisoras de EV con capacidad de influir en el microambiente hepático (376). En particular, se han realizado estudios sobre las EV derivadas de HSC en el contexto de patologías como la hepatitis viral crónica (377–381), daño hepático agudo (72,382), enfermedad hepática alcohólica (383), fibrosis (384–387) y HCC (388,389). Se ha descrito que los exosomas derivados de las HSC desempeñan un papel complejo en la modulación de la fibrosis, con una función que varía dependiendo del estado de activación. En estado quiescente, las HSC secretan exosomas con propiedades antifibróticas (390,390,391), mientras que la activación de las HSC modifica la carga de sus exosomas, promoviendo la fibrogénesis. Por ejemplo, se ha observado que las EV liberadas por las HSC activadas contienen moléculas que alteran el metabolismo de las células adyacentes y promueven la activación de diversas células del sistema inmunitario y de otras HSC, perpetuando el proceso fibrótico (71,72,384,389,392,393).

Hasta la fecha, no existen estudios publicados sobre el proteoma de las EV derivadas de células LX-2 estimuladas con TGF- β . Este trabajo caracteriza en detalle cómo el factor de crecimiento TGF- β altera el contenido proteico de las EV y, además, cómo RPV modula estos cambios. La guía MISEV (*Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles*) define "exosomas" en función de su biogénesis endosomal y no únicamente por su tamaño, pero la mayor parte de la literatura utiliza este término para referirse a las EV con un diámetro

igual o inferior a 200 nm. En este estudio hemos adoptado esta convención, reconociendo que, al no haber realizado un análisis del origen subcelular, la población de vesículas estudiadas podría incluir, además de exosomas, otros tipos de EV (394).

La cantidad de EV secretadas y su contenido pueden variar en respuesta a diferentes estímulos y condiciones patológicas (37); sin embargo, nuestro estudio demuestra que TGF- β no altera la cantidad de EV secretadas en las LX-2, coincidiendo con investigaciones previas en hHSC que reportan que, a diferencia de PDGF, que sí que aumenta la concentración de EV secretadas, TGF- β no induce ningún cambio en este parámetro (71). Si bien ni el estímulo profibrótico solo ni su administración conjunta con RPV afectaron a la cantidad de exosomas secretados por las HSC, ambos tratamientos indujeron cambios en su composición proteica. Del conjunto de proteínas que mostraron una sobreexpresión en exosomas tras el tratamiento con TGF- β y cuya expresión fue atenuada por la administración de RPV, el único regulado consistentemente con ambas concentraciones de RPV utilizadas en el estudio fue el receptor soluble *Scavenger* con 5 dominios (SSc5D). Este receptor, caracterizado por su expresión en macrófagos y células T (395), ha sido recientemente destacado como un biomarcador clave en el diagnóstico de pacientes con MASLD, observándose una clara correlación entre los niveles en suero del receptor con los estadios de la fibrosis hepática en una cohorte de pacientes con esta patología hepática (396).

Un hallazgo interesante en los exosomas es que RPV atenúa la regulación negativa ejercida por TGF- β sobre procesos relacionados con la coagulación, como la formación de coágulos de fibrina, la activación plaquetaria y la formación de trombos. La presencia de depósitos de fibrina(ógeno) en el hígado es una característica común en modelos experimentales de fibrosis hepática (397) y se han propuesto diversas hipótesis sobre el papel de estos depósitos en la patogénesis de la fibrosis. Una posibilidad es que la oclusión de los sinusoides hepáticos por fibrina(ógeno) provoque una disrupción del flujo

sanguíneo, contribuyendo al daño hepático. Otra hipótesis plantea que la fibrina(ógeno) actúa como una matriz provisional que facilita el depósito de ECM y la progresión de la fibrosis. Asimismo, se ha sugerido que la fibrina(ógeno) podría desencadenar una respuesta inflamatoria que exacerba la enfermedad hepática. La observación de que la administración de anticoagulantes reduce tanto los depósitos de fibrina(ógeno) como la fibrosis ha llevado a la hipótesis de que la fibrina(ógeno) desempeña un papel causal en el desarrollo de la fibrosis (398). Sin embargo, la evidencia experimental que respalda esta hipótesis es limitada. Los ratones con deficiencia genética de fibrina(ógeno) expuestos a CCl₄ no han mostrado alteraciones significativas en la histopatología hepática, lo que sugiere que la fibrina(ógeno) no es esencial para el desarrollo de la fibrosis en este modelo (399). Además, el papel de la fibrina(ógeno) en la fibrosis hepática parece ser dependiente del contexto, ya que, en contraste con los modelos de CCl₄, estudios *in vivo* en modelos de lesión biliar inducida por alfa-naftilisotiocianato han demostrado que la fibrina(ógeno) ejerce efectos protectores. En este contexto, la fibrina(ógeno) activa receptores de integrina en plaquetas y leucocitos, modulando la respuesta inflamatoria y promoviendo la reparación del tejido hepático (398,400–402). El conjunto de estos hallazgos subraya la complejidad de la interacción entre fibrina(ógeno) y la fibrosis hepática.

El contenido molecular de los exosomas refleja el estado de las células productoras, manifestando su perfil transcripcional y traduccional. En nuestro estudio observamos cierta correlación en los cambios observados entre el proteoma celular y exosomal. Por ejemplo, RPV regula a la baja procesos relacionados con la ECM y la síntesis de colágeno en las células, tal y como se comentó anteriormente. De la misma manera, estos procesos se encuentran regulados a la baja también en los exosomas de las HSC tratadas con la concentración más alta de RPV. Específicamente, RPV disminuyó la expresión en los exosomas de proteínas clave como Col1a1, Col1a2 y Col5a2. En este contexto, resulta de especial interés la proteína SPARC, ya que tanto el

proteoma de las células como el de los exosomas mostró un aumento en su expresión tras el tratamiento con TGF- β , que fue atenuado por RPV. Esta proteína está asociada a la ECM y relacionada con la cicatrización, remodelación tisular y fibrosis (403). La implicación de SPARC en la fibrosis hepática se ha demostrado previamente con estudios que reportan su sobreexpresión en HSC y LSEC en hígados cirróticos (404–407,407). Además, se ha observado en modelos *in vivo* de fibrosis hepática que SPARC promueve la deposición de colágeno, la inflamación, la producción de TGF- β 1 y la síntesis de proteínas de la ECM (406,407).

Otro ejemplo de la relación del proteoma celular y exosomal es la expresión proteica de β -catenina. Al igual que ocurría en el caso de SPARC, observamos un aumento de β -catenina en células y exosomas tras el tratamiento con TGF- β , mientras que RPV reduce la expresión de esta proteína en ambos casos. Esto concuerda con estudios previos que demuestran la capacidad de otros compuestos hepatoprotectores, como la filigenina, para inhibir la expresión de β -catenina inducida por TGF- β en HSC (LX-2 y HSC primarias de ratón) (302). En los últimos años, se ha acumulado evidencia que vincula la vía de señalización Wnt/ β -catenina (o ruta Wnt canónica) con la fibrosis en diversos sistemas orgánicos (408,409). Específicamente, esta vía actúa mediante la modulación de la respuesta inflamatoria, la apoptosis y el estrés oxidativo (410,411). La β -catenina es un factor de transcripción clave en la ruta Wnt canónica, con un papel fundamental en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, mediando la transducción de señales y la adhesión celular. En estado de reposo, es fosforilada continuamente por el complejo de degradación compuesto por GSK-3 β , APC, CK1 y Axina, activando el proceso de degradación por el proteasoma y, por tanto, manteniéndola en niveles bajos en el citoplasma. Sin embargo, la unión del ligando Wnt a su receptor y correceptor recluta y activa a Dishevelled, inactiva a Axina y fosforila (e inactiva) a GSK-3 β . Esto permite que la β -catenina no se degrade y se transloque al núcleo, donde activa la transcripción de genes diana como *c-Myc* y *CCND1*,

concluyendo en la activación y proliferación de las HSC (412–419). Varios estudios *in vivo* han demostrado que la inhibición de esta vía suprime y revierte la activación de las HSC, atenuando la fibrogénesis hepática (417,420). Del mismo modo, la vía Wnt no canónica (independiente de β -catenina) y sus componentes también contribuyen a la activación de las HSC y están aumentados en hígados fibróticos en modelos murinos y en hígados cirróticos humanos (421). Diversos compuestos que han demostrado efectos inhibitorios sobre la señalización Wnt se están considerando como posibles tratamientos preventivos o terapéuticos para la fibrosis hepática, como DKK1, niclosamida, sFRP5, SB-216763, ICG-001, PRI-724 y PSH (422).

Es importante destacar que los análisis ORA, representados en las gráficas de puntos del presente estudio proteómico de los exosomas, revelaron una aparente contradicción. Si bien, como se ha comentado, TGF- β indujo la sobreexpresión de β -catenina, los términos más enriquecidos (sobreexpresados) fueron aquellos relacionados con la degradación y desactivación de la β -catenina, como [degradación de β -catenina por el complejo de destrucción] y [desactivación del complejo transactivador de β -catenina]. Esta discrepancia se esclareció al analizar las proteínas específicas asociadas a dichos procesos. Se observó que cada proceso contaba únicamente con dos o tres proteínas identificadas en nuestro análisis, una de las cuales era invariablemente la β -catenina. Las otras proteínas identificadas en estos procesos, como PSMA7 y RPS27A, estaban relacionadas con el proteasoma, lo que podría sugerir que, si bien TGF- β induce la expresión de componentes del proteasoma, este aumento en la maquinaria de degradación no es suficiente para contrarrestar el incremento en la expresión de β -catenina inducido también por TGF- β . Esto podría indicar un desequilibrio en la regulación de la β -catenina, donde la síntesis supera la degradación, o bien, que la actividad del proteasoma no se ve incrementada de forma proporcional, a pesar de aumentar la expresión de algunos de sus componentes. En el caso del efecto de RPV, se observa una situación similar a la descrita previamente con

TGF- β . El ORA indica una regulación a la baja de [degradación de β -catenina por el complejo de destrucción]. A primera vista, esto sugeriría una mayor acumulación de β -catenina debido a una disminución en su degradación. Sin embargo, un análisis más detallado de las proteínas implicadas en este proceso revela la presencia de β -catenina y PSMD2 (un componente del proteasoma 26S). Por tanto, la aparente contradicción entre el comportamiento paralelo de las proteínas del proteasoma y la expresión de β -catenina (ambas aumentan o disminuyen a la vez) tanto en presencia de TGF- β como en cotratamiento con RPV, requiere una investigación más profunda. Para dilucidar esta relación, futuros estudios deberían centrarse en evaluar la actividad del proteasoma, la localización subcelular de β -catenina y la expresión de sus genes diana. Estos análisis permitirán una comprensión más completa del impacto de TGF- β y RPV en la vía Wnt canónica y su implicación en el contexto de la activación de las HSC. En conjunto, los resultados de este análisis demuestran que RPV modula el proteoma de las HSC, lo cual se refleja en cambios en el contenido proteico de los exosomas que secretan. Para comprender el impacto de estas modificaciones en la comunicación intercelular, estudios futuros deberían investigar cómo estas EV afectan a otras células hepáticas. Esto podría abordarse mediante experimentos de co-cultivo con exosomas aislados de HSC tratadas con RPV y diferentes tipos celulares, o utilizando el medio condicionado de HSC tratadas con RPV para evaluar los efectos específicos de estas EV sobre células receptoras.

Además de los experimentos *in vitro* descritos, esta tesis doctoral incluyó un estudio *in vivo* para evaluar el papel de RPV en la RH. Estudios previos de nuestro grupo demostraron que RPV no solo atenúa la fibrosis hepática en varios modelos murinos, como se mencionó anteriormente, sino que también promueve indirectamente la proliferación de hepatocitos. Se observó que RPV, al inducir la apoptosis en HSC (mediada por STAT1) liberaba IL-6, la cual estimulaba la proliferación de hepatocitos mediante la activación de STAT3, restableciendo así la homeostasis hepática en modelos de daño hepático

inducido por BDL, CCl₄ y MASLD (182). Considerando este efecto, se planteó la hipótesis de que RPV podría tener un papel activo en la RH más allá de su efecto antifibrótico. Para evaluar esta hipótesis, se realizó un modelo de HPx 70 % en roedores, donde se demostró que RPV no ejercía diferencias significativas respecto al grupo vehículo en los parámetros evaluados.

Tras una HPx del 70 %, el hígado inicia un proceso de regeneración basado en la proliferación compensatoria de los hepatocitos del tejido remanente para restaurar la masa reseca. La literatura científica muestra una considerable variabilidad en cuanto al tiempo requerido para esta completa recuperación. Algunos autores, por ejemplo, describen una restauración total alrededor de los 20 días post-hepatectomía (194,423), mientras que otros reportan una recuperación más rápida, entre 7 y 10 días (194,424,425). En nuestro modelo experimental, observamos una recuperación progresiva de la masa hepática a lo largo del estudio, aunque no se alcanzó el 100 % a día 7. Este hallazgo se alinea con la variabilidad reportada en la literatura, pero se requeriría de tiempos más prolongados para evaluar el tiempo necesario para recuperar la totalidad de la masa hepática. La RH tras una HPx se caracteriza fundamentalmente por una rápida proliferación de hepatocitos, cuya cinética varía según la especie. En ratas, el pico de proliferación se observa a las 24 h, mientras que en ratones ocurre entre las 36 y 48 h (426). Este proceso regenerativo se refleja en el aumento de expresión de marcadores de proliferación como PCNA cuyos niveles aumentan a los dos días tras la HPx, alcanzando su punto máximo alrededor del tercer día, coincidiendo con nuestros hallazgos (424,427–430). Asimismo, detectamos que los ratones sometidos a HPx presentaban un aumento en las enzimas hepáticas AST y ALT a nivel plasmático, particularmente al primer día, lo cual es indicativo del daño hepático inducido por la reducción de la masa hepática tras la cirugía, que se recupera a medida que avanza la regeneración (427–430).

Diversas citoquinas median la entrada de los hepatocitos al ciclo celular durante la RH (194,431). Aunque inicialmente se consideraba la IL-6 como la principal

citoquina activadora de STAT3 en hepatocitos y responsable de la proliferación tras la HPx (432), estudios posteriores con ratones *knockout* para IL-6 han arrojado resultados contradictorios sobre su papel en la RH (433–436). No obstante, el papel crucial de STAT3 en este proceso está bien establecido: su inhibición reduce la regeneración tras HPx, mientras que su sobreexpresión la acelera (307,437,438). Nuestros resultados muestran un incremento en la activación de STAT3 durante los dos primeros días post-HPx, con normalización al tercer día, destacando su papel en el inicio de la RH. Esta cinética difiere de la reportada en otros estudios, donde la activación de STAT3 ocurre entre las 3-6 h, normalizándose a las 12 h (423) o a las 24 h (430). No obstante, cabe mencionar que en nuestro estudio no se realizaron mediciones antes de las 24 h, por lo que no es posible descartar un pico temprano de activación de STAT3 similar al reportado en la literatura.

La vía Hippo desempeña un papel crucial en la regeneración de órganos y la reparación de tejidos, regulando procesos como la proliferación, supervivencia y diferenciación celular, así como la expansión de células progenitoras y células madre (439). La actividad de esta vía es altamente sensible a alteraciones en el microambiente hepático, incluyendo la presión portal, los contactos intercelulares, la disponibilidad de nutrientes y el remodelado de la ECM, lo que resulta esencial para el control preciso de la RH (440–442). Durante la RH se produce una inactivación temprana de la vía Hippo, permitiendo la translocación nuclear de YAP (forma no fosforilada) y la consiguiente promoción de la expresión de genes involucrados en la proliferación de hepatocitos (443). Nuestros resultados, en línea con lo descrito, demuestran un ligero aumento de YAP activo durante los primeros 3 días post-HPx, que regresa a niveles basales al día 7. Esta observación coincide con la disminución de pYAP, su forma inactiva, los días posteriores a la cirugía. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la importancia de la inhibición de la vía Hippo en el inicio de la RH.

La albúmina, un marcador establecido de función hepatocitaria, típicamente aumenta su expresión durante la RH posterior a una HPx (444). En

contraposición al resto de marcadores, nuestros resultados muestran una discrepancia entre los grupos control (ratones sometidos a laparotomía sin resección hepática) de las dos condiciones experimentales (tratamiento con RPV y vehículo), a diferencia de los grupos sometidos a HPx, que no mostraron diferencias significativas entre tratamientos. El grupo control-RPV mostró el comportamiento esperado, con niveles de albúmina superiores al grupo HPx-RPV en los primeros días. De manera contraria, el grupo control-vehículo presentó niveles inferiores a los del grupo HPx-vehículo. Esta observación es inesperada, dado que ambos grupos control mantuvieron los hígados intactos. La variabilidad interindividual, inherente a los estudios *in vivo*, y la inclusión de todos los valores (incluyendo valores atípicos), podrían explicar la discrepancia observada, subestimando los valores de albúmina en el grupo vehículo. Si bien el modelo de HPx es valioso para estudiar los mecanismos moleculares de la RH, no reproduce la complejidad de las EHC. En las patologías hepáticas, la agresión continua en el hígado genera un ciclo persistente de daño, muerte celular y regeneración compensatoria, con la participación activa de HSC y otros tipos celulares (445). Previamente demostramos que RPV induce la proliferación de hepatocitos mediante la apoptosis de las HSC y la liberación de IL-6. Sin embargo, dado que el modelo de HPx no reproduce la agresión crónica presente en las EHC, su capacidad para confirmar este efecto de RPV sobre la RH es limitada.

Los datos presentados en esta tesis doctoral evidencian el efecto antifibrótico de RPV sobre las HSC. Este efecto se logra mediante la modulación de procesos celulares cruciales en la fibrogénesis, incluyendo la activación, la producción de ECM, la autofagia, la función mitocondrial, la migración y la proliferación. Estos hallazgos posicionan a RPV como una prometedora estrategia terapéutica para el tratamiento de la fibrosis hepática. Además, el estudio del mecanismo de acción de RPV ha revelado dianas terapéuticas adicionales con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos antifibróticos. El efecto sinérgico positivo observado al combinar RPV con otros fármacos

actualmente en estudio para el tratamiento de la fibrosis hepática, como SV, abre interesantes perspectivas para el desarrollo de terapias combinadas, aumentando las posibilidades de éxito terapéutico. Asimismo, la modulación de la composición de EV secretadas por las HSC activadas tras el tratamiento con RPV representa otro hallazgo relevante. Esta modulación no solo afecta directamente a las HSC, sino que también impacta en la comunicación intercelular dentro del microambiente hepático, con la posibilidad de influir en otras células. Este descubrimiento abre nuevas y prometedoras vías de investigación para comprender la compleja interacción entre las HSC y su entorno.

Si bien esta tesis doctoral se basa en modelos *in vitro*, lo que limita la extrapolación directa de los resultados a la práctica clínica, la utilización de cultivos primarios de HSC humanas, además de la línea celular LX-2, fortalece la validez de las observaciones. Los cultivos primarios reflejan con mayor fidelidad la fisiología de las HSC humanas, otorgando mayor solidez a los hallazgos y reforzando el potencial traslacional de RPV como terapia antifibrótica. Futuros estudios *in vivo* son necesarios para confirmar estos resultados y avanzar en el desarrollo clínico de RPV como una nueva estrategia terapéutica para la fibrosis hepática.

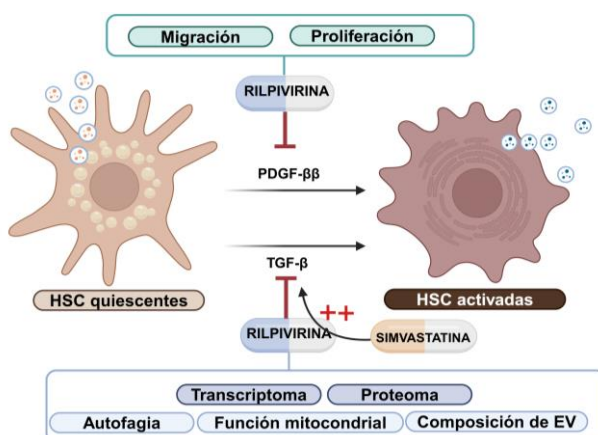


Figura V.1. Esquema representativo del efecto antifibrótico de RPV en HSC activadas.

Capítulo VI
CONCLUSIONES

1. El cotratamiento con RPV induce una modulación transcripcional global en las HSC activadas por TGF- β , disminuyendo la expresión de genes relacionados con la fibrogénesis, incluyendo aquellos involucrados en la organización de la ECM y la síntesis de colágeno. Este efecto antifibrogénico es concentración-dependiente y se relaciona con el efecto proapoptótico del fármaco en las HSC activadas por TGF- β .
2. RPV atenúa la proliferación, la fibrogénesis y la migración de las HSC inducidas por PDGF- $\beta\beta$. Este efecto se observa a través de la regulación negativa de genes del ciclo celular, la disminución de la expresión de marcadores fibrogénicos y la inhibición de algunos efectores de la vía de señalización de PDGF- $\beta\beta$.
3. RPV potencia el proceso autofágico en HSC activadas por TGF- β , lo que se evidencia por el aumento en la formación de autofagosomas y autolisosomas, la aceleración del flujo autofágico y la mayor expresión de marcadores autofágicos.
4. La combinación de RPV y SV muestra un efecto sinérgico antifibrótico y antioxidante en HSC activadas con TGF- β , reduciendo marcadores fibrogénicos, potenciando la apoptosis mediada por caspasas, modulando las vías STAT1/STAT3 y Nrf2, y disminuyendo los niveles de ROS mitocondriales.
5. RPV modula la función y dinámica mitocondrial en las HSC activadas por TGF- β , contrarrestando las alteraciones bioenergéticas, previniendo el aumento de masa mitocondrial y atenuando los cambios morfológicos asociados a la activación. Además, modula la expresión de genes

mitocondriales relacionados con el metabolismo, la fosforilación oxidativa y la dinámica mitocondrial.

6. RPV modula el proteoma de las HSC activadas por TGF- β , atenuando la expresión de proteínas clave en la activación, fibrogénesis y motilidad celular. Además, el análisis del contenido proteico de los exosomas reveló cambios globales en el proteoma de las EV secretadas por las HSC activadas con TGF- β , tanto en ausencia como en presencia de RPV.

7. El tratamiento con RPV no parece acelerar la RH tras una HPx al 70 % en modelo animal, procedimiento que, por sí solo, induce una efectiva recuperación de la masa hepática, un aumento en la expresión de marcadores de proliferación celular y la activación de rutas implicadas en la RH.

BIBLIOGRAFÍA

1. Borrello MT, Mann D. Chronic liver diseases: From development to novel pharmacological therapies: IUPHAR Review 37. *Br J Pharmacol.* 2023 Nov;180(22):2880–97.
2. Sharma A, Nagalli S. Chronic Liver Disease. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [Citado 19 de septiembre de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554597/>
3. Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med.* 2019 Feb 1;65:37–55.
4. Ravindranath A, Yachha SK. An Approach to Investigations of Chronic Liver Disease. *Indian J Pediatr.* 2024 Mar 1;91(3):262–9.
5. Ai JY, Liu CF, Zhang W, Rao GW. Current status of drugs targeting PDGF/PDGFR. *Drug Discov Today.* 2024 Jul 1;29(7):103989.
6. Miao L, Targher G, Byrne CD, Cao YY, Zheng MH. Current status and future trends of the global burden of MASLD. *Trends Endocrinol Metab.* 2024 Aug 1;35(8):697–707.
7. Romero-Gómez M, Aller R, Ampuero J, Fernández Rodríguez C, Augustín S, Latorre R, et al. Consenso AEEH «Consenso sobre métodos de detección y derivación de enfermedades hepáticas prevalentes ocultas». *Gastroenterol Hepatol.* 2023 Mar 1;46(3):236–47.
8. Younossi ZM, Wong G, Anstee QM, Henry L. The Global Burden of Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2023 Jul 1;21(8):1978–91.
9. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells.* 2020 Apr 3;9(4):875.
10. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, Tuma F. Physiology, Liver. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 19 de agosto de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
11. Casotti V, D'Antiga L. Basic Principles of Liver Physiology. In: D'Antiga L, editor. *Pediatric Hepatology and Liver Transplantation* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [citado 20 de septiembre de 2024]. p. 21–39. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-96400-3_2

12. Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Dev Camb Engl*. 2015 Jun 15;142(12):2094–108.
13. Vernon H, Wehrle CJ, Alia VSK, Kasi A. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Liver. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 19 de agosto de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500014/>
14. Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol*. 2015 Apr 1;62(1):S15–24.
15. Berumen J, Baglieri J, Kisseleva T, Mekeel K. LIVER FIBROSIS: Pathophysiology and Clinical Implications. *WIREs Mech Dis*. 2021 Jan;13(1):e1499.
16. Forbes SJ, Newsome PN. Liver regeneration - mechanisms and models to clinical application. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 Aug;13(8):473–85.
17. Cordero-Espinoza L, Huch M. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *J Clin Invest*. 2018 Jan 2;128(1):85–96.
18. Stanger BZ. Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. *Annu Rev Physiol*. 2015;77:179–200.
19. McDonald B, Kubes P. Innate Immune Cell Trafficking and Function During Sterile Inflammation of the Liver. *Gastroenterology*. 2016 Dec;151(6):1087–95.
20. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver — from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 Feb;13(2):88–110.
21. Tu T, Calabro SR, Lee A, Maczurek AE, Budzinska MA, Warner FJ, et al. Hepatocytes in liver injury: Victim, bystander, or accomplice in progressive fibrosis? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2015;30(12):1696–704.
22. Luo X, Xu ZX, Wu JC, Luo SZ, Xu MY. Hepatocyte-derived exosomal miR-27a activates hepatic stellate cells through the inhibition of PINK1-mediated mitophagy in MAFLD. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2021 Dec 3;26:1241–54.

23. Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 Mar;18(3):151–66.
24. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jul;14(7):397–411.
25. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. In: Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology* [Internet]. 1st ed. Wiley; 2013 [citado 27 de noviembre de 2024]. p. 1473–92. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c120035>
26. Suflețel RT, Melincovici CS, Gheban BA, Toader Z, Mișu CM. Hepatic stellate cells – from past till present: morphology, human markers, human cell lines, behavior in normal and liver pathology. *Rom J Morphol Embryol*. 2020;61(3):615–42.
27. Awdan SAE, Asaad GF. Liver Fibrosis: Underlying Mechanisms and Innovative Therapeutic Approach. A Review Article. *Biomed Pharmacol J*. 2021 Dec 30;14(4):1841–62.
28. Trivedi P, Wang S, Friedman SL. The Power of Plasticity-Metabolic Regulation of Hepatic Stellate Cells. *Cell Metab*. 2021 Feb 2;33(2):242–57.
29. Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014 Dec;3(6):34463–34363.
30. Viñas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Berenguer C, Enrich C, et al. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology*. 2003;38(4):919–29.
31. Diwan R, Gaytan SL, Bhatt HN, Pena-Zacarias J, Nurunnabi M. Liver fibrosis pathologies and potentials of RNA based therapeutics modalities. *Drug Deliv and Transl Res*. 2024 Oct 1;14(10):2743–70.
32. Pei Q, Yi Q, Tang L. Liver Fibrosis Resolution: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 2;24(11):9671.

33. Neshat SY, Quiroz VM, Wang Y, Tamayo S, Doloff JC. Liver Disease: Induction, Progression, Immunological Mechanisms, and Therapeutic Interventions. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 24;22(13):6777.
34. Roeb E. Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects). *Matrix Biol.* 2018 Aug 1;68–69:463–73.
35. Li Y, Wu J, Liu R, Zhang Y, Li X. Extracellular vesicles: catching the light of intercellular communication in fibrotic liver diseases. *Theranostics.* 2022 Oct 3;12(16):6955–71.
36. Kumar MA, Baba SK, Sadida HQ, Marzooqi SA, Jerobin J, Altemani FH, et al. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2024 Feb 5;9(1):1–41.
37. Tamasi V, Németh K, Csala M. Role of Extracellular Vesicles in Liver Diseases. *Life.* 2023 Apr 30;13(5):1117.
38. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* 2019 Jul 15;8(7):727.
39. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Jan 1;75(2):193–208.
40. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol.* 2016 Apr;36(3):301–12.
41. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):373–83.
42. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4(1):27066.
43. Han QF, Li WJ, Hu KS, Gao J, Zhai WL, Yang JH, et al. Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer.* 2022 Nov 1;21(1):207.

44. Kenific CM, Zhang H, Lyden D. An exosome pathway without an ESCRT. *Cell Res.* 2021 Feb;31(2):105–6.
45. Martínez-Alonso E, Tomás M, Martínez-Menárguez JA. Morpho-Functional Architecture of the Golgi Complex of Neuroendocrine Cells. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013 Mar 28;4:41.
46. Kulkarni-Gosavi P, Makhoul C, Gleeson PA. Form and function of the Golgi apparatus: scaffolds, cytoskeleton and signalling. *FEBS Lett.* 2019;593(17):2289–305.
47. De Matteis MA, Luini A. Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Apr;9(4):273–84.
48. Bruno S, Chiabotto G, Camussi G. Extracellular Vesicles: A Therapeutic Option for Liver Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 15;21(12):4255.
49. Liu Y, Wang L. Extracellular vesicles targeting non-parenchymal cells: the therapeutical effect on liver fibrosis. *egastro [Internet].* 2024 Mar 19 [citado 14 de diciembre de 2025] ;2(1). Disponible en: <https://egastroenterology.bmj.com/content/2/1/e100040>
50. Di Bella MA. Overview and Update on Extracellular Vesicles: Considerations on Exosomes and Their Application in Modern Medicine. *Biology.* 2022 May 24;11(6):804.
51. Kim HI, Park J, Zhu Y, Wang X, Han Y, Zhang D. Recent advances in extracellular vesicles for therapeutic cargo delivery. *Exp Mol Med.* 2024 Apr;56(4):836–49.
52. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* 2019 Feb 15;9(1):19.
53. Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. *N Engl J Med.* 2018 Sep 6;379(10):958–66.
54. Garcia-Martinez I, Alen R, Rada P, Valverde AM. Insights Into Extracellular Vesicles as Biomarker of NAFLD Pathogenesis. *Front Med (Lausanne).* 2020 Aug 11;7:395.

55. Szabo G, Momen-Heravi F. Extracellular vesicles in liver disease and potential as biomarkers and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Aug;14(8):455–66.
56. Clemmens H, Lambert DW. Extracellular vesicles: translational challenges and opportunities. *Biochem Soc Trans*. 2018 Sep 21;46(5):1073–82.
57. Wan Z, Yang X, Liu X, Sun Y, Yu P, Xu F, et al. M2 macrophage-derived exosomal microRNA-411-5p impedes the activation of hepatic stellate cells by targeting CAMSAP1 in NASH model. *iScience*. 2022 Jul 15;25(7):104597.
58. Li X, Chen R, Kemper S, Brigstock DR. Extracellular Vesicles From Hepatocytes Are Therapeutic for Toxin-Mediated Fibrosis and Gene Expression in the Liver. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:368.
59. Jiang W, Tan Y, Cai M, Zhao T, Mao F, Zhang X, et al. Human Umbilical Cord MSC-Derived Exosomes Suppress the Development of CCl4-Induced Liver Injury through Antioxidant Effect. *Stem Cells Int*. 2018;2018:6079642.
60. Li T, Yan Y, Wang B, Qian H, Zhang X, Shen L, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev*. 2013 Mar 15;22(6):845–54.
61. Qu Y, Zhang Q, Cai X, Li F, Ma Z, Xu M, et al. Exosomes derived from miR-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation. *J Cell Mol Med*. 2017 Oct;21(10):2491–502.
62. Mardpour S, Hassani SN, Mardpour S, Sayahpour F, Vosough M, Ai J, et al. Extracellular vesicles derived from human embryonic stem cell-MSCs ameliorate cirrhosis in thioacetamide-induced chronic liver injury. *J Cell Physiol*. 2018;233(12):9330–44.
63. Ohara M, Ohnishi S, Hosono H, Yamamoto K, Yuyama K, Nakamura H, et al. Extracellular Vesicles from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Inflammation and Fibrosis in Rats. *Stem Cells Int*. 2018;2018(1):3212643.

64. Rong X, Liu J, Yao X, Jiang T, Wang Y, Xie F. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/ β -catenin pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Mar 18;10(1):98.
65. Bruno S, Pasquino C, Sanchez MBH, Tapparo M, Figliolini F, Grange C, et al. HLSC-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Liver Fibrosis and Inflammation in a Murine Model of Non-alcoholic Steatohepatitis. *Mol Ther.* 2020 Feb 5;28(2):479–89.
66. Ma L, Wei J, Zeng Y, Liu J, Xiao E, Kang Y, et al. Mesenchymal stem cell-originated exosomal circDIDO1 suppresses hepatic stellate cell activation by miR-141-3p/PTEN/AKT pathway in human liver fibrosis. *Drug Deliv.* 2022 Dec;29(1):440–53.
67. Dai X, Chen C, Xue J, Xiao T, Mostofa G, Wang D, et al. Exosomal MALAT1 derived from hepatic cells is involved in the activation of hepatic stellate cells via miRNA-26b in fibrosis induced by arsenite. *Toxicol Lett.* 2019 Nov;316:73–84.
68. Wang W, Li F, Lai X, Liu H, Wu S, Han Y, et al. Exosomes secreted by palmitic acid-treated hepatocytes promote LX-2 cell activation by transferring miRNA-107. *Cell Death Discov.* 2021 Jul 7;7(1):174.
69. Devhare PB, Sasaki R, Shrivastava S, Di Bisceglie AM, Ray R, Ray RB. Exosome-Mediated Intercellular Communication between Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells. *J Virol.* 2017 Feb 28;91(6):10.1128/jvi.02225-16.
70. Kim JH, Lee CH, Lee SW. Exosomal Transmission of MicroRNA from HCV Replicating Cells Stimulates Transdifferentiation in Hepatic Stellate Cells. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019 Mar 1;14:483–97.
71. Kostallari E, Hirsova P, Prasnicka A, Verma VK, Yaqoob U, Wongjarupong N, et al. Hepatic stellate cell-derived PDGFR α -enriched extracellular vesicles promote liver fibrosis in mice through SHP2. *Hepatol Baltim Md.* 2018 Jul;68(1):333–48.

72. Wan L, Xia T, Du Y, Liu J, Xie Y, Zhang Y, et al. Exosomes from activated hepatic stellate cells contain GLUT1 and PKM2: a role for exosomes in metabolic switch of liver nonparenchymal cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2019 Jul;33(7):8530–42.
73. van Dijk F, Olinga P, Poelstra K, Beljaars L. Targeted Therapies in Liver Fibrosis: Combining the Best Parts of Platelet-Derived Growth Factor BB and Interferon Gamma. *Front Med.* 2015 Oct 5;2:72.
74. Ying HZ, Chen Q, Zhang WY, Zhang HH, Ma Y, Zhang SZ, et al. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review). *Mol Med Rep.* 2017 Dec 1;16(6):7879–89.
75. Borkham-Kamphorst E, Weiskirchen R. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016 Apr 1;28:53–61.
76. Wang R, Liu F, Chen P, Li S, Gu Y, Wang L, et al. Gomisin D alleviates liver fibrosis through targeting PDGFR β in hepatic stellate cells. *Int J Biol Macromol.* 2023 Apr 30;235:123639.
77. Chia ZJ, Cao Y nan, Little PJ, Kamato D. Transforming growth factor- β receptors: versatile mechanisms of ligand activation. *Acta Pharmacol Sin.* 2024 Jul;45(7):1337–48.
78. Deng Z, Fan T, Xiao C, Tian H, Zheng Y, Li C, et al. TGF- β signaling in health, disease and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2024 Mar 22;9(1):1–40.
79. Allameh A, Niayesh-Mehr R, Aliarab A, Sebastiani G, Pantopoulos K. Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease. *Antioxidants.* 2023 Aug 22;12(9):1653.
80. Blas-García A, Apostolova N. Novel Therapeutic Approaches to Liver Fibrosis Based on Targeting Oxidative Stress. *Antioxidants.* 2023 Aug;12(8):1567.
81. He F, Ru X, Wen T. Nrf2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan;21(13):4777.

82. Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules*. 2020 Jan;25(22):5474.
83. Lucantoni F, Martínez-Cerezuela A, Gruevska A, Moragrega ÁB, Víctor VM, Esplugues JV, et al. Understanding the implication of autophagy in the activation of hepatic stellate cells in liver fibrosis: are we there yet? *J Pathol*. 2021;254(3):216–28.
84. Hung TM, Hsiao CC, Lin CW, Lee PH. Complex Cell Type-Specific Roles of Autophagy in Liver Fibrosis and Cirrhosis. *Pathogens*. 2020 Mar 18;9(3):225.
85. Qian H, Chao X, Williams J, Fulte S, Li T, Yang L, et al. Autophagy in liver diseases: A review. *Mol Aspects Med*. 2021 Dec 1;82:100973.
86. Gómez-Virgilio L, Silva-Lucero M del C, Flores-Morelos DS, Gallardo-Nieto J, Lopez-Toledo G, Abarca-Fernandez AM, et al. Autophagy: A Key Regulator of Homeostasis and Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Modulators. *Cells*. 2022 Jul 22;11(15):2262.
87. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Mol Cell Biol*. 2012 Jan;32(1):2–11.
88. Liu S, Yao S, Yang H, Liu S, Wang Y. Autophagy: Regulator of cell death. *Cell Death Dis*. 2023 Oct 4;14(10):1–17.
89. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, et al. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging*. 2021 Aug;1(8):634–50.
90. Halapas A, Armakolas A, Koutsilieris M. Autophagy: a target for therapeutic interventions in myocardial pathophysiology. *Expert Opin Ther Targets*. 2008 Dec 1;12(12):1509–22.
91. Lee MJ, Park JS, Jo SB, Joe YA. Enhancing Anti-Cancer Therapy with Selective Autophagy Inhibitors by Targeting Protective Autophagy. *Biomol Ther*. 2023 Jan 1;31(1):1–15.

92. Sun M, Tan L, Hu M. The role of autophagy in hepatic fibrosis. *Am J Transl Res.* 2021 Jun 15;13(6):5747–57.
93. Tao Y, Wang N, Qiu T, Sun X. The Role of Autophagy and NLRP3 Inflammasome in Liver Fibrosis. *BioMed Res Int.* 2020;2020(1):7269150.
94. Simcox EM, Reeve AK. An Introduction to Mitochondria, Their Structure and Functions. In: Reeve AK, Simcox EM, Duchen MR, Turnbull DM, editors. *Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Disorders* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado 11 de octubre de 2024]. p. 3–30. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-28637-2_1
95. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Mitochondrion. In: *Molecular Biology of the Cell* 4th edition [Internet]. Garland Science; 2002 [citado 9 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26894/>
96. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Apr;21(4):204–24.
97. MacPherson L, Tokatlidis K. Protein trafficking in the mitochondrial intermembrane space: mechanisms and links to human disease. *Biochem J.* 2017 Aug 1;474(15):2533–45.
98. Chen P, Yao L, Yuan M, Wang Z, Zhang Q, Jiang Y, et al. Mitochondrial dysfunction: A promising therapeutic target for liver diseases. *Genes Dis.* 2024 May 1;11(3):101115.
99. Deshpande OA, Mohiuddin SS. Biochemistry, Oxidative Phosphorylation. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 12 de agosto de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553192/>
100. Vercellino I, Sazanov LA. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022 Feb;23(2):141–61.

101. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med*. 2019 Jul;44(1):3–15.
102. Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inher Metab Dis*. 2012;35(2):211–25.
103. von Ballmoos C, Wiedenmann A, Dimroth P. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:649–72.
104. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*. 2018 Jul 1;552:50–9.
105. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jan;12(1):9–14.
106. Sebastián D, Zorzano A. Mitochondrial dynamics and metabolic homeostasis. *Curr Opin Physiol*. 2018 Jun 1;3:34–40.
107. Di Nottia M, Verrigni D, Torraco A, Rizza T, Bertini E, Carozzo R. Mitochondrial Dynamics: Molecular Mechanisms, Related Primary Mitochondrial Disorders and Therapeutic Approaches. *Genes*. 2021 Feb 10;12(2):247.
108. Fenton AR, Jongens TA, Holzbaur ELF. Mitochondrial dynamics: Shaping and remodeling an organelle network. *Curr Opin Cell Biol*. 2021 Feb 1;68:28–36.
109. Chen W, Zhao H, Li Y. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Sep 6;8(1):1–25.
110. Quintana-Cabrera R, Scorrano L. Determinants and outcomes of mitochondrial dynamics. *Mol Cell*. 2023 Mar 16;83(6):857–76.
111. Al Ojaimi M, Salah A, El-Hattab AW. Mitochondrial Fission and Fusion: Molecular Mechanisms, Biological Functions, and Related Disorders. *Membranes*. 2022 Sep 16;12(9):893.

112. Daste F, Sauvanet C, Bavdek A, Baye J, Pierre F, Le Borgne R, et al. The heptad repeat domain 1 of Mitofusin has membrane destabilization function in mitochondrial fusion. *EMBO Rep.* 2018 Jun;19(6):e43637.
113. Filadi R, Pendin D, Pizzo P. Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death Dis.* 2018 Feb 28;9(3):1–13.
114. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* 2018 Jul 20;62(3):341–60.
115. El-Hattab AW, Suleiman J, Almannai M, Scaglia F. Mitochondrial dynamics: Biological roles, molecular machinery, and related diseases. *Mol Genet Metab.* 2018 Dec;125(4):315–21.
116. Ning Y, Dou X, Wang Z, Shi K, Wang Z, Ding C, et al. SIRT3: A potential therapeutic target for liver fibrosis. *Pharmacol Ther.* 2024 May 1;257:108639.
117. Addissouky TA, Ali MMA, Sayed IETE, Wang Y. Emerging advanced approaches for diagnosis and inhibition of liver fibrogenesis. *Egypt J Intern Med.* 2024 Feb 12;36(1):19.
118. Wang FD, Zhou J, Chen EQ. Molecular Mechanisms and Potential New Therapeutic Drugs for Liver Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2022 Feb 11;13:787748.
119. Mohammed OS, Attia HG, Mohamed BMSA, Elbaset MA, Fayed HM. Current investigations for liver fibrosis treatment: between repurposing the FDA-approved drugs and the other emerging approaches. *J Pharm Pharm Sci.* 2023 Nov 7;26:11808.
120. Tacke F, Puengel T, Loomba R, Friedman SL. An integrated view of anti-inflammatory and antifibrotic targets for the treatment of NASH. *J Hepatol.* 2023 Aug 1;79(2):552–66.
121. Dooley S, ten Dijke P. TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res.* 2012 Jan;347(1):245–56.
122. Wang X, Li Y, Li X, Yan L, Guan H, Han R, et al. Expression, purification, and evaluation of in vivo anti-fibrotic activity for soluble truncated TGF- β receptor II as a cleavable His-SUMO fusion protein. *World J Microbiol Biotechnol.* 2018 Nov 24;34(12):181.

123. Melisi D, Ishiyama S, Scwabas GM, Fleming JB, Xia Q, Tortora G, et al. LY2109761, a novel transforming growth factor β receptor type I and type II dual inhibitor, as a therapeutic approach to suppressing pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer Ther.* 2008 Apr;7(4):829–40.
124. Hammad S, Cavalcanti E, Werle J, Caruso ML, Dropmann A, Ignazzi A, et al. Galunisertib modifies the liver fibrotic composition in the Abcb4Ko mouse model. *Arch Toxicol.* 2018 Jul 1;92(7):2297–309.
125. Luangmonkong T, Suriguga S, Bigaeva E, Boersema M, Oosterhuis D, de Jong KP, et al. Evaluating the antifibrotic potency of galunisertib in a human ex vivo model of liver fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2017;174(18):3107–17.
126. Ikenaga N, Peng ZW, Vaid KA, Liu SB, Yoshida S, Sverdlov DY, et al. Selective targeting of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) suppresses hepatic fibrosis progression and accelerates its reversal. *Gut.* 2017 Sep 1;66(9):1697–708.
127. Ma L, Zeng Y, Wei J, Yang D, Ding G, Liu J, et al. Knockdown of LOXL1 inhibits TGF- β 1-induced proliferation and fibrogenesis of hepatic stellate cells by inhibition of Smad2/3 phosphorylation. *Biomed Pharmacother.* 2018 Nov 1;107:1728–35.
128. Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, et al. Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med.* 2013 Dec;19(12):1617–24.
129. Rahman SR, Roper JA, Grove JI, Aithal GP, Pun KT, Bennett AJ. Integrins as a drug target in liver fibrosis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2022 Mar;42(3):507–21.
130. Inc PT. GlobeNewswire News Room. 2024 [citado 30 de septiembre de 2024]. Pliant Therapeutics Announces Positive Safety and Exploratory Efficacy Data from the INTEGRIS-PSC Phase 2a Trial of Bexotegrast 320 mg in Patients with Primary Sclerosing Cholangitis and Suspected Liver Fibrosis. Disponible en: <https://www.globenewswire.com/news-release/2024/02/04/2823179/0/en/Pliant-Therapeutics-Announces-Positive-Safety-and-Exploratory-Efficacy-Data-from->

the-INTEGRIS-PSC-Phase-2a-Trial-of-Bexotegrast-320-mg-in-Patients-with-Primary-Sclerosing-Cholangit.html

131. Ahn J, Son MK, Jung KH, Kim K, Kim GJ, Lee SH, et al. Aminoacyl-tRNA synthetase interacting multi-functional protein 1 attenuates liver fibrosis by inhibiting TGF β signaling. *Int J Oncol*. 2016 Feb 1;48(2):747–55.
132. Ji X, Wang H, Wu Z, Zhong X, Zhu M, Zhang Y, et al. Specific Inhibitor of Smad3 (SIS3) Attenuates Fibrosis, Apoptosis, and Inflammation in Unilateral Ureteral Obstruction Kidneys by Inhibition of Transforming Growth Factor β (TGF- β)/Smad3 Signaling. *Med Sci Monit*. 2018 Mar 20;24:1633–41.
133. Ganai AA, Husain M. Genistein attenuates D-GalN induced liver fibrosis/chronic liver damage in rats by blocking the TGF- β /Smad signaling pathways. *Chem Biol Interact*. 2017 Jan 5;261:80–5.
134. Liu J, Kong D, Qiu J, Xie Y, Lu Z, Zhou C, et al. Praziquantel ameliorates CCl4-induced liver fibrosis in mice by inhibiting TGF- β /Smad signalling via up-regulating Smad7 in hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol*. 2019;176(24):4666–80.
135. Bahcecioglu IH, Koca SS, Poyrazoglu OK, Yalniz M, Ozercan IH, Ustundag B, et al. Hepatoprotective Effect of Infliximab, an Anti-TNF- α Agent, on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Fibrosis. *Inflammation*. 2008 Aug 1;31(4):215–21.
136. Sharma RS, Harrison DJ, Kisielewski D, Cassidy DM, McNeilly AD, Gallagher JR, et al. Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis Are Ameliorated by Pharmacologic Activation of Nrf2 (NF-E2 p45-Related Factor 2). *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018 Mar;5(3):367–98.
137. Seedorf K, Weber C, Vinson C, Berger S, Vuillard LM, Kiss A, et al. Selective disruption of Nrf2-KEAP1 interaction leads to NASH resolution and reduction of liver fibrosis in mice. *JHEP Rep Innov Hepatol*. 2023 Apr;5(4):100651.
138. Lai KKY, Kweon SM, Chi F, Hwang E, Kabe Y, Higashiyama R, et al. Stearoyl-CoA Desaturase Promotes Liver Fibrosis and Tumor Development in

- Mice via a Wnt Positive-Signaling Loop by Stabilization of Low-Density Lipoprotein-Receptor-Related Proteins 5 and 6. *Gastroenterology*. 2017 May 1;152(6):1477–91.
139. Bates J, Vijayakumar A, Ghoshal S, Marchand B, Yi S, Kornyejev D, et al. Acetyl-CoA carboxylase inhibition disrupts metabolic reprogramming during hepatic stellate cell activation. *J Hepatol*. 2020 Oct 1;73(4):896–905.
140. Ross TT, Crowley C, Kelly KL, Rinaldi A, Beebe DA, Lech MP, et al. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Improves Multiple Dimensions of NASH Pathogenesis in Model Systems. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020 Jan 1;10(4):829–51.
141. Jiménez Calvente C, Sehgal A, Popov Y, Kim YO, Zevallos V, Sahin U, et al. Specific hepatic delivery of procollagen $\alpha 1(I)$ small interfering RNA in lipid-like nanoparticles resolves liver fibrosis. *Hepatol Baltim Md*. 2015 Oct;62(4):1285–97.
142. Fujiwara A, Takemura K, Tanaka A, Matsumoto M, Katsuyama M, Okanoue T, et al. Carfilzomib shows therapeutic potential for reduction of liver fibrosis by targeting hepatic stellate cell activation. *Sci Rep*. 2024 Aug 20;14(1):19288.
143. Chen L, Brenner DA, Kisseleva T. Combatting Fibrosis: Exosome-Based Therapies in the Regression of Liver Fibrosis. *Hepatol Commun*. 2019 Feb;3(2):180.
144. Kalo E, Read S, Ahlenstiel G. Targeting Gut–Liver Axis for Treatment of Liver Fibrosis and Portal Hypertension. *Livers*. 2021 Sep;1(3):147–79.
145. Torre A, Martínez-Sánchez FD, Narvaez-Chávez SM, Herrera-Islas MA, Aguilar-Salinas CA, Córdova-Gallardo J. Pirfenidone use in fibrotic diseases: What do we know so far? *Immun Inflamm Dis*. 2024;12(7):e1335.
146. Poo JL, Torre A, Aguilar-Ramírez JR, Cruz M, Mejía-Cuán L, Cerda E, et al. Benefits of prolonged-release pirfenidone plus standard of care treatment in patients with advanced liver fibrosis: PROMETEO study. *Hepatol Int*. 2020 Sep;14(5):817–27.

147. Panzitt K, Zollner G, Marschall HU, Wagner M. Recent advances on FXR-targeting therapeutics. *Mol Cell Endocrinol*. 2022 Jul 15;552:111678.
148. Floreani A, Gabbia D, De Martin S. Update on the Pharmacological Treatment of Primary Biliary Cholangitis. *Biomedicines*. 2022 Aug 20;10(8):2033.
149. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2015 Mar 14;385(9972):956–65.
150. Sanyal AJ, Ratziu V, Loomba R, Anstee QM, Kowdley KV, Rinella ME, et al. Results from a new efficacy and safety analysis of the REGENERATE trial of obeticholic acid for treatment of pre-cirrhotic fibrosis due to non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2023 Nov;79(5):1110–20.
151. BioSpace [Internet]. 2024 [citado 30 de septiembre de 2024]. Sagimet Biosciences Presents Data from ITT and F3 Patient Population in Phase 2b FASCINATE-2 Clinical Trial of Denifanstat at EASL International Liver Congress 2024. Disponible en: <https://www.biospace.com/sagimet-biosciences-presents-data-from-itt-and-f3-patient-population-in-phase-2b-fascinate-2-clinical-trial-of-denifanstat-at-easl-international-liver-congress-2024>
152. Jiménez-Luévano MÁ, Jiménez-Partida AE, Sierra-Díaz E, Orozco-Alonso E, Villaseñor-García M, Bravo-Hernández A, et al. Prolonged use of pentoxifylline increases the life expectancy of patients with compensated cirrhosis: A 20-year retrospective study. *Biomed Rep*. 2024 Dec 1;21(6):1–7.
153. Loomba R, Sanyal AJ, Nakajima A, Neuschwander-Tetri BA, Goodman ZD, Harrison SA, et al. Pegbelfermin in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Stage 3 Fibrosis (FALCON 1): A Randomized Phase 2b Study. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2024 Jan;22(1):102-112.e9.
154. Calliditas Therapeutics AB [Internet]. 2024 [citado 30 de octubre de 2024]. Calliditas announces positive TRANSFORM Phase 2b topline data in

primary biliary cholangitis. Disponible en: <https://www.calliditas.se/en/calliditas-announces-positive-transform-phase-2b-topline-data-in-primary-biliary-cholangitis>

155. Li J, Guo C, Wu J. The Agonists of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ for Liver Fibrosis. *Drug Des Devel Ther.* 2021;15:2619.

156. Wettstein G, Luccarini JM, Poekes L, Faye P, Kupkowski F, Adarbes V, et al. The new-generation pan-peroxisome proliferator-activated receptor agonist IVA337 protects the liver from metabolic disorders and fibrosis. *Hepatol Commun.* 2017 Aug;1(6):524.

157. Study Details | A Phase 3 Study Evaluating Efficacy and Safety of Lanifibranor Followed by an Active Treatment Extension in Adult Patients With (NASH) and Fibrosis Stages F2 and F3 (NATIV3) | ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 2 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04849728?cond=Liver%20Diseases&intr=Lanifibranor&rank=2>

158. Emricasan, a Caspase Inhibitor, for Evaluation in Subjects With Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) Fibrosis [Internet]. [citado 2 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://stanfordhealthcare.org/trials/e/NCT02686762.html>

159. Galectin Therapeutics Receives FDA Approval to Proceed with Combination Immunotherapy Trial in Head and Neck Cancer | Galectin Therapeutics Inc. [Internet]. [citado 2 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://investor.galectintherapeutics.com/news-releases/news-release-details/galectin-therapeutics-receives-fda-approval-proceed-combination>

160. Galecto Announces First Patient Treated in Phase 2 Trial of Oral Galectin-3 Inhibitor GB1211 in Liver Cirrhosis | Galecto [Internet]. [citado 2 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://ir.galecto.com/news-releases/news-release-details/galecto-announces-first-patient-treated-phase-2-trial-oral/>

161. Feng X, Feng B, Zhou J, Yang J, Pan Q, Yu J, et al. Mesenchymal stem cells alleviate mouse liver fibrosis by inhibiting pathogenic function of intrahepatic B cells. *Hepatology.* :10.1097/HEP.0000000000000831.

162. McIntyre LA, Moher D, Fergusson DA, Sullivan KJ, Mei SHJ, Lalu M, et al. Efficacy of Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Acute Lung Injury in Preclinical Animal Models: A Systematic Review. *PloS One*. 2016;11(1):e0147170.
163. Wang Z, Yao L, Hu X, Yuan M, Chen P, Liu P, et al. Advancements in mesenchymal stem cell therapy for liver cirrhosis: Unveiling origins, treatment mechanisms, and current research frontiers. *Tissue Cell*. 2023 Oct 1;84:102198.
164. Kulkarni VS, Alagarsamy V, Solomon VR, Jose PA, Murugesan S. Drug Repurposing: An Effective Tool in Modern Drug Discovery. *Russ J Bioorganic Chem*. 2023;49(2):157–66.
165. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Jan;18(1):41–58.
166. Talreja O, Kerndt CC, Cassagnol M. Simvastatin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 8 de agosto de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532919/>
167. Marrache MK, Rockey DC. Statins for Treatment of Chronic Liver Disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2021 May 1;37(3):200–7.
168. Morofuji Y, Nakagawa S, Ujifuku K, Fujimoto T, Otsuka K, Niwa M, et al. Beyond Lipid-Lowering: Effects of Statins on Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases and Cancer. *Pharmaceuticals*. 2022 Jan 26;15(2):151.
169. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005;19(1):117–25.
170. Averbukh LD, Turshudzhyan A, Wu DC, Wu GY. Statin-induced Liver Injury Patterns: A Clinical Review. *J Clin Transl Hepatol*. 2022 Jun 28;10(3):543–52.
171. Kreidieh M, Hamadi R, Alsheikh M, Al Moussawi H, Deeb L. Statin Use in Patients With Chronic Liver Disease and Cirrhosis: Current Evidence and Future Directions. *Gastroenterol Res*. 2022 Feb;15(1):1–12.

172. Vargas JI, Arrese M, Shah VH, Arab JP. Use of Statins in Patients with Chronic Liver Disease and Cirrhosis: Current Views and Prospects. *Curr Gastroenterol Rep*. 2017 Sep;19(9):43.
173. Marrone G, Maeso-Díaz R, García-Cardena G, Abrales JG, García-Pagán JC, Bosch J, et al. KLF2 exerts antifibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: behind the molecular mechanisms of statins. *Gut*. 2015 Sep;64(9):1434–43.
174. Rilpivirine. In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012 [citado 9 de agosto de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548514/>
175. Rilpivirine Patient Drug Record | Clinicalinfo [Internet]. [citado 9 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/drugs/rilpivirine/patient>
176. Bagella P, De Socio GV, Ricci E, Menzaghi B, Martinelli C, Squillace N, et al. Durability, safety, and efficacy of rilpivirine in clinical practice: results from the SCOLTA Project. *Infect Drug Resist*. 2018;11:615–23.
177. Pereira M, Vale N. Evolution of Antiretroviral Drug Rilpivirine and Approach to Oncology. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 2;24(3):2890.
178. Verloes R, Deleu S, Niemeijer N, Crauwels H, Meyvisch P, Williams P. Safety, tolerability and pharmacokinetics of rilpivirine following administration of a long-acting formulation in healthy volunteers. *HIV Med*. 2015 Sep;16(8):477–84.
179. Sharma M, Saravolatz LD. Rilpivirine: a new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Feb 1;68(2):250–6.
180. EDURANT-pi.pdf [Internet]. [citado 27 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.janssenlabels.com/package-insert/product-monograph/prescribing-information/EDURANT-pi.pdf>.
181. Merli M, Galli L, Marinaro L, Ariaudo A, Messina E, Uberti-Foppa C, et al. Pharmacokinetics of dolutegravir and rilpivirine in combination with simeprevir

and sofosbuvir in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients with liver cirrhosis. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Mar 1;72(3):812–5.

182. Martí-Rodrigo A, Alegre F, Moragrega ÁB, García-García F, Martí-Rodrigo P, Fernández-Iglesias A, et al. Rilpivirine attenuates liver fibrosis through selective STAT1-mediated apoptosis in hepatic stellate cells. *Gut.* 2020 May;69(5):920–32.

183. Benedicto AM, Lucantoni F, Fuster-Martínez I, Diaz-Pozo P, Dorcaratto D, Muñoz-Forner E, et al. Interference with mitochondrial function as part of the antifibrogenic effect of Rilpivirine: A step towards novel targets in hepatic stellate cell activation. *Biomed Pharmacother.* 2024 Sep 1;178:117206.

184. Moragrega AB, Gruevska A, Fuster-Martínez I, Benedicto AM, Tosca J, Montón C, et al. Anti-inflammatory and immunomodulating effects of rilpivirine: Relevance for the therapeutics of chronic liver disease. *Biomed Pharmacother.* 2023 Nov 1;167:115537.

185. Lucantoni F, Benedicto AM, Gruevska A, Moragrega ÁB, Fuster-Martínez I, Esplugues JV, et al. Implication of autophagy in the antifibrogenic effect of Rilpivirine: when more is less. *Cell Death Dis.* 2022 Apr 20;13(4):385.

186. Busca Arenzana C, González-García J, Blas-García A, Esplugues JV, Oliveira Martín A, Montes Ramírez ML. Benefits of rilpivirine for liver stiffness in HIV/HCV-coinfected patients. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* 2024 Feb 1;42(2):74–9.

187. Michalopoulos GK, Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021 Jan;18(1):40–55.

188. Huang W, Han N, Du L, Wang M, Chen L, Tang H. A narrative review of liver regeneration—from models to molecular basis. *Ann Transl Med.* 2021 Nov;9(22):1705.

189. Kiseleva YV, Antonyan SZ, Zharikova TS, Tupikin KA, Kalinin DV, Zharikov YO. Molecular pathways of liver regeneration: A comprehensive review. *World J Hepatol.* 2021 Mar 27;13(3):270–90.

190. So J, Kim A, Lee SH, Shin D. Liver progenitor cell-driven liver regeneration. *Exp Mol Med*. 2020 Aug;52(8):1230–8.
191. Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials*. 2004 Apr;25(9):1601–11.
192. Pritchard MT, Apte U. Models to Study Liver Regeneration. In: *Liver Regeneration* [Internet]. Elsevier; 2015 [citado 13 de agosto de 2024]. p. 15–40. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124201286000026>
193. M HG. Experimental pathology of the liver, Restoration of the liver of the white rat following surgical removal. *Arch Pathol*. 1931;12:186–202.
194. Michalopoulos GK. Liver Regeneration after Partial Hepatectomy: Critical Analysis of Mechanistic Dilemmas. *Am J Pathol*. 2010 Jan 1;176(1):2–13.
195. Rmilah AA, Zhou W, Nelson E, Lin L, Amiot B, Nyberg SL. Understanding the marvels behind liver regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2019 May;8(3):e340.
196. Yagi S, Hirata M, Miyachi Y, Uemoto S. Liver Regeneration after Hepatectomy and Partial Liver Transplantation. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan;21(21):8414.
197. Zhang C, Sun C, Zhao Y, Ye B, Yu G. Signaling pathways of liver regeneration: Biological mechanisms and implications. *iScience*. 2024 Jan 19;27(1):108683.
198. Tao Y, Wang M, Chen E, Tang H. Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:4256352.
199. Ozaki M. Cellular and molecular mechanisms of liver regeneration: Proliferation, growth, death and protection of hepatocytes. *Semin Cell Dev Biol*. 2020 Apr 1;100:62–73.
200. Casini A, Pinzani M, Milani S, Grappone C, Galli G, Jezequel AM, et al. Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor beta 1 in human fat-storing cells. *Gastroenterology*. 1993 Jul;105(1):245–53.

201. Aouri M, Barcelo C, Guidi M, Rotger M, Cavassini M, Hizrel C, et al. Population Pharmacokinetics and Pharmacogenetics Analysis of Rilpivirine in HIV-1-Infected Individuals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Dec 27;61(1):10.1128/aac.00899-16.
202. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2008 Mar;22(3):659–61.
203. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012 Jun 18;13:134.
204. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education.* 2005 Sep;29(3):151–9.
205. Arbaizar-Roviroso M, Pedragosa J, Lozano JJ, Casal C, Pol A, Gallizioli M, et al. Aged lipid-laden microglia display impaired responses to stroke. *EMBO Mol Med.* 2023;15(2).
206. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12).
207. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2nd ed. Springer Publishing Company, Incorporated; 2016. 260 p.
208. Raivo Kolde. *pheatmap: Pretty Heatmaps* [Internet]. 2010 [citado 7 de octubre de 2024]. p. 1.0.12. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>
209. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdóttir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinforma Oxf Engl.* 2011 Jun 15;27(12):1739–40.
210. Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innov Camb Mass.* 2021 Aug 28;2(3):100141.

211. Valente AJ, Maddalena LA, Robb EL, Moradi F, Stuart JA. A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture. *Acta Histochemica*. 2017 Apr 1;119(3):315–26.
212. Lam J, Katti P, Biete M, Mungai M, AshShareef S, Neikirk K, et al. A Universal Approach to Analyzing Transmission Electron Microscopy with ImageJ. *Cells*. 2021 Sep;10(9):2177.
213. Desousa BR, Kim KK, Jones AE, Ball AB, Hsieh WY, Swain P, et al. Calculation of ATP production rates using the Seahorse XF Analyzer. *EMBO Rep*. 2023 Aug 7;24(10):e56380.
214. Comfort N, Cai K, Bloomquist TR, Strait MD, Ferrante AW, Baccarelli AA. Nanoparticle Tracking Analysis for the Quantification and Size Determination of Extracellular Vesicles. *J Vis Exp JoVE*. 2021 Mar 28;(169):10.3791/62447.
215. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009 May;6(5):359–62.
216. Evosep One Methods - 60 SPD [Internet]. Evosep Biosystems. [citado 18 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.evosep.com/evosep-one-methods/standard-methods/60-spd/>
217. Demidenko E, Miller TW. Statistical determination of synergy based on Bliss definition of drugs independence. *PloS One*. 2019;14(11):e0224137.
218. Rath S, Sharma R, Gupta R, Ast T, Chan C, Durham TJ, et al. MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D1541–7.
219. Chen J, Cao J, Wang P, He X. *NT5DC2* is a novel prognostic marker in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2020 Oct 1;20(4):1–1.
220. Sun X, Yang Y, Zhu D, Qian H, Duan Y, He X, et al. Expression of Septin4 in Human Hepatic Stellate Cells LX-2 Stimulated by LPS. *Inflammation*. 2013 Jun 1;36(3):539–48.
221. Zhu D, Wang J, Sun X, Chen J, Duan Y, Pan J, et al. Septin4_{i1} Regulates Apoptosis in Hepatic Stellate Cells through Peroxisome Proliferator-

- Activated Receptor- γ /Akt/B-Cell Lymphoma 2 Pathway. *J Histochem Cytochem*. 2015 Mar 1;63(3):163–9.
222. Kugeratski FG, Hodge K, Lilla S, McAndrews KM, Zhou X, Hwang RF, et al. Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker. *Nat Cell Biol*. 2021 Jun;23(6):631–41.
223. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol*. 2016 Feb 22;428(4):688–92.
224. Commissioner O of the. FDA. FDA; 2024 [citado 10 de octubre de 2024]. FDA Approves First Treatment for Patients with Liver Scarring Due to Fatty Liver Disease. Disponible en: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-patients-liver-scarring-due-fatty-liver-disease>
225. De Smet V, Eysackers N, Merens V, Kazemzadeh Dastjerd M, Halder G, Verhulst S, et al. Initiation of hepatic stellate cell activation extends into chronic liver disease. *Cell Death Dis*. 2021 Nov 27;12(12):1–10.
226. Zhang Y, Ren L, Tian Y, Guo X, Wei F, Zhang Y. Signaling pathways that activate hepatic stellate cells during liver fibrosis. *Front Med (Lausanne)*. 2024 Sep 18;11:1454980.
227. Gandhi CR. Hepatic stellate cell activation and pro-fibrogenic signals. *J Hepatol*. 2017 Nov;67(5):1104–5.
228. Schwabe RF, Bataller R, Brenner DA. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Nov;285(5):G949-958.
229. Friedman SL. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury *. *J Biol Chem*. 2000 Jan 28;275(4):2247–50.
230. Shimada H, Ochi T, Imasato A, Morizane Y, Hori M, Ozaki H, et al. Gene expression profiling and functional assays of activated hepatic stellate cells suggest that myocardin has a role in activation. *Liver Int*. 2010;30(1):42–54.

231. Li XQ, Ren ZX, Li K, Huang JJ, Huang ZT, Zhou TR, et al. Key Anti-Fibrosis Associated Long Noncoding RNAs Identified in Human Hepatic Stellate Cell via Transcriptome Sequencing Analysis. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar;19(3):675.
232. Guo CJ, Xiao X, Sheng L, Chen L, Zhong W, Li H, et al. RNA Sequencing and Bioinformatics Analysis Implicate the Regulatory Role of a Long Noncoding RNA-mRNA Network in Hepatic Stellate Cell Activation. *Cell Physiol Biochem*. 2017 Aug 11;42(5):2030–42.
233. Gerhard GS, Davis B, Wu X, Hanson A, Wilhelmsen D, Piras IS, et al. Differentially expressed mRNAs and lncRNAs shared between activated human hepatic stellate cells and nash fibrosis. *Biochem Biophys Rep*. 2020 Jul 1;22:100753.
234. Merens V, Knetemann E, Gürbüz E, De Smet V, Messaoudi N, Reynaert H, et al. Hepatic stellate cell single cell atlas reveals a highly similar activation process across liver disease aetiologies. *JHEP Rep*. 2025 Jan 1;7(1):101223.
235. Yang W, He H, Wang T, Su N, Zhang F, Jiang K, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis Reveals a Hepatic Stellate Cell–Activation Roadmap and Myofibroblast Origin During Liver Fibrosis in Mice. *Hepatology*. 2021 Nov;74(5):2774.
236. Zhou C, York SR, Chen JY, Pondick JV, Motola DL, Chung RT, et al. Long noncoding RNAs expressed in human hepatic stellate cells form networks with extracellular matrix proteins. *Genome Med*. 2016 Mar 23;8(1):31.
237. Choi W, Kang S, Kim J. New insights into the role of the Golgi apparatus in the pathogenesis and therapeutics of human diseases. *Arch Pharm Res*. 2022 Oct 1;45(10):671–92.
238. Yang D, Yao M, Yan Y, Liu Y, Wen X, Chen X, et al. Deoxycholic Acid Upregulates Serum Golgi Protein 73 through Activating NF- κ B Pathway and Destroying Golgi Structure in Liver Disease. *Biomolecules*. 2021 Feb;11(2):205.
239. Deng C, Zhao X, Chen Y, Ai K, Zhang Y, Gong T, et al. Engineered Platelet Microparticle-Membrane Camouflaged Nanoparticles for Targeting the

- Golgi Apparatus of Synovial Fibroblasts to Attenuate Rheumatoid Arthritis. *ACS Nano*. 2022 Nov 22;16(11):18430–47.
240. Luo J, Gong T, Ma L. Chondroitin-modified lipid nanoparticles target the Golgi to degrade extracellular matrix for liver cancer management. *Carbohydr Polym*. 2020 Dec 1;249:116887.
241. Kaftanovskaya EM, Ng HH, Soula M, Rivas B, Myhr C, Ho BA, et al. Therapeutic effects of a small molecule agonist of the relaxin receptor ML290 in liver fibrosis. *FASEB J*. 2019 Nov;33(11):12435–46.
242. Prasad K, Bhattacharya D, Shams SGE, Izarraras K, Hart T, Mayfield B, et al. Kisspeptin Alleviates Human Hepatic Fibrogenesis by Inhibiting TGF β Signaling in Hepatic Stellate Cells. *Cells*. 2024 Oct 4;13(19):1651.
243. Hisamori S, Tabata C, Kadokawa Y, Okoshi K, Tabata R, Mori A, et al. All-trans-retinoic acid ameliorates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice through modulating cytokine production. *Liver Int*. 2008;28(9):1217–25.
244. Luo J, Zhang P, Zhao T, Jia M, Yin P, Li W, et al. Golgi Apparatus-Targeted Chondroitin-Modified Nanomicelles Suppress Hepatic Stellate Cell Activation for the Management of Liver Fibrosis. *ACS Nano*. 2019 Apr 23;13(4):3910–23.
245. Li H, Zhang P, Luo J, Hu D, Huang Y, Zhang ZR, et al. Chondroitin Sulfate-Linked Prodrug Nanoparticles Target the Golgi Apparatus for Cancer Metastasis Treatment. *ACS Nano*. 2019 Aug 27;13(8):9386–96.
246. Molenaar MR, Vaandrager AB, Helms JB. Some Lipid Droplets Are More Equal Than Others: Different Metabolic Lipid Droplet Pools in Hepatic Stellate Cells. *Lipid Insights*. 2017 Dec 15;10:1178635317747281.
247. Schinagl M, Tomin T, Gindlhuber J, Honeder S, Pflieger R, Schittmayer M, et al. Proteomic Changes of Activated Hepatic Stellate Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan;22(23):12782.
248. Kim CW, Addy C, Kusunoki J, Anderson NN, Deja S, Fu X, et al. Acetyl CoA Carboxylase Inhibition Reduces Hepatic Steatosis but Elevates Plasma

- Triglycerides in Mice and Humans: A Bedside to Bench Investigation. *Cell Metab.* 2017 Aug 1;26(2):394-406.e6.
249. Liu Y, Wen XM, Lui ELH, Friedman SL, Cui W, Ho NPS, et al. Therapeutic targeting of the PDGF and TGF- β -signaling pathways in hepatic stellate cells by PTK787/ZK22258. *Lab Invest.* 2009 Oct;89(10):1152–60.
250. Kocabayoglu P, Lade A, Lee YA, Dragomir AC, Sun X, Fiel MI, et al. β -PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis. *J Hepatol.* 2015 Jul;63(1):141–7.
251. Tang N, Zhang YP, Ying W, Yao XX. Interleukin-1 β upregulates matrix metalloproteinase-13 gene expression via c-Jun N-terminal kinase and p38 MAPK pathways in rat hepatic stellate cells. *Mol Med Rep.* 2013 Dec 1;8(6):1861–5.
252. Wu X, Zhi F, Lun W, Deng Q, Zhang W. Baicalin inhibits PDGF-BB-induced hepatic stellate cell proliferation, apoptosis, invasion, migration and activation via the miR-3595/ACSL4 axis. *Int J Mol Med.* 2018 Apr 1;41(4):1992–2002.
253. Lan T, Zhuang L, Li S, Yang G, Xuan Y, Guo J. Polydatin attenuates hepatic stellate cell proliferation and liver fibrosis by suppressing sphingosine kinase 1. *Biomed Pharmacother.* 2020 Oct 1;130:110586.
254. Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, et al. Liver fibrosis: Insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology.* 2003 Jan 1;124(1):147–59.
255. Gong J, Han J, He J, Liu J, Han P, Wang Y, et al. Paired related homeobox protein 1 regulates PDGF-induced chemotaxis of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Lab Invest.* 2017 Sep;97(9):1020–32.
256. Kastanis GJ, Hernandez-Nazara Z, Nieto N, Rincón-Sánchez AR, Popratiloff A, Dominguez-Rosales JA, et al. The role of dystroglycan in PDGF-BB-dependent migration of activated hepatic stellate cells/myofibroblasts. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2011 Sep;301(3):G464–74.

257. Ma Y, Harris J, Li P, Jiang C, Sun H, Cao H. An Integrative Transcriptome Subtraction Strategy to Identify Human lncRNAs That Specifically Play a Role in Activation of Human Hepatic Stellate Cells. *Non-Coding RNA*. 2024 Jun;10(3):34.
258. Foglia B, Cannito S, Bocca C, Parola M, Novo E. ERK Pathway in Activated, Myofibroblast-Like, Hepatic Stellate Cells: A Critical Signaling Crossroad Sustaining Liver Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 1;20(11):2700.
259. Marra F, Arrighi MC, Fazi M, Caligiuri A, Pinzani M, Romanelli RG, et al. Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat. *Hepatology*. 1999 Oct;30(4):951–8.
260. Novo E, Povero D, Busletta C, Paternostro C, di Bonzo LV, Cannito S, et al. The biphasic nature of hypoxia-induced directional migration of activated human hepatic stellate cells. *J Pathol*. 2012 Mar;226(4):588–97.
261. Lin X, Bai F, Nie J, Lu S, Lu C, Zhu X, et al. Didymin Alleviates Hepatic Fibrosis Through Inhibiting ERK and PI3K/Akt Pathways via Regulation of Raf Kinase Inhibitor Protein. *Cell Physiol Biochem*. 2016 Dec 20;40(6):1422–32.
262. Wang X, Gao Y, Li Y, Huang Y, Zhu Y, Lv W, et al. Roseotoxin B alleviates cholestatic liver fibrosis through inhibiting PDGF-B/PDGFR- β pathway in hepatic stellate cells. *Cell Death Dis*. 2020 Jun 15;11(6):1–13.
263. Kuo JJ, Wang CY, Lee TF, Huang YT, Lin YL. Paeoniae Radix Reduces PDGF-Stimulated Hepatic Stellate Cell Migration. *Planta Med*. 2012 Mar;78(04):341–8.
264. Gao L, Zhuang Y, Liu Z. Nogo-B Silencing Expedites the Senescence of Platelet-Derived Growth Factor-BB-Induced Human Hepatic Stellate Cells Via Autophagy. *Mol Biotechnol* [Internet]. 2024 May 10 [citado 27 de noviembre de 2024]; Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12033-024-01179-6>
265. González-Rodríguez A, Mayoral R, Agra N, Valdecantos MP, Pardo V, Miquilena-Colina ME, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis*. 2014 Apr 17;5(4):e1179.

266. Li R, Guo E, Yang J, Li A, Yang Y, Liu S, et al. 1,25(OH)₂D₃ attenuates hepatic steatosis by inducing autophagy in mice. *Obesity*. 2017;25(3):561–71.
267. Xue W, Wang J, Jiang W, Shi C, Wang X, Huang Y, et al. Caveolin-1 alleviates lipid accumulation in NAFLD associated with promoting autophagy by inhibiting the Akt/mTOR pathway. *Eur J Pharmacol*. 2020 Mar 15;871:172910.
268. Fukuo Y, Yamashina S, Sonoue H, Arakawa A, Nakadera E, Aoyama T, et al. Abnormality of autophagic function and cathepsin expression in the liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2014;44(9):1026–36.
269. Zhang J, Jiang N, Ping J, Xu L. TGF- β 1-induced autophagy activates hepatic stellate cells via the ERK and JNK signaling pathways. *Int J Mol Med*. 2021 Jan 1;47(1):256–66.
270. Hernández-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):938–46.
271. Wu L, Zhang Q, Mo W, Feng J, Li S, Li J, et al. Quercetin prevents hepatic fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and reducing autophagy via the TGF- β 1/Smads and PI3K/Akt pathways. *Sci Rep*. 2017 Aug 24;7(1):9289.
272. Feng J, Chen K, Xia Y, Wu L, Li J, Li S, et al. Salidroside ameliorates autophagy and activation of hepatic stellate cells in mice via NF- κ B and TGF- β 1/Smad3 pathways. *Drug Des Devel Ther*. 2018;12:1837–53.
273. Huang TJ, Ren JJ, Zhang QQ, Kong YY, Zhang HY, Guo XH, et al. IGFBP1 accelerates autophagy and activation of hepatic stellate cells via mutual regulation between H19 and PI3K/AKT/mTOR pathway. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2019 Aug;116:109034.
274. Wang Z, Tao Y, Qiu T, Yao X, Jiang L, Wang N, et al. Taurine protected As₂O₃-induced the activation of hepatic stellate cells through inhibiting PPAR α -autophagy pathway. *Chem Biol Interact*. 2019 Feb 25;300:123–30.

275. Xie ZY, Wang FF, Xiao ZH, Liu SF, Lai YL, Tang SL. Long noncoding RNA XIST enhances ethanol-induced hepatic stellate cells autophagy and activation via miR-29b/HMGB1 axis. *IUBMB Life*. 2019 Dec;71(12):1962–72.
276. Arriola Benitez PC, Pesce Viglietti AI, Herrmann CK, Dennis VA, Comerci DJ, Giambartolomei GH, et al. *Brucella abortus* Promotes a Fibrotic Phenotype in Hepatic Stellate Cells, with Concomitant Activation of the Autophagy Pathway. *Infect Immun*. 2018 Jan;86(1):e00522-17.
277. Chen W, Zhang Z, Yao Z, Wang L, Zhang F, Shao J, et al. Activation of autophagy is required for Oroxylin A to alleviate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation. *Int Immunopharmacol*. 2018 Mar;56:148–55.
278. Ma JQ, Sun YZ, Ming QL, Tian ZK, Yang HX, Liu CM. Ampelopsin attenuates carbon tetrachloride-induced mouse liver fibrosis and hepatic stellate cell activation associated with the SIRT1/TGF- β 1/Smad3 and autophagy pathway. *Int Immunopharmacol*. 2019 Dec;77:105984.
279. Li Y, Chen Y, Huang H, Shi M, Yang W, Kuang J, et al. Autophagy mediated by endoplasmic reticulum stress enhances the caffeine-induced apoptosis of hepatic stellate cells. *Int J Mol Med*. 2017 Nov;40(5):1405–14.
280. Zhang XL, Chen ZN, Huang QF, Bai FC, Nie JL, Lu SJ, et al. Methyl Helicterate Inhibits Hepatic Stellate Cell Activation Through Modulation of Apoptosis and Autophagy. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2018;51(2):897–908.
281. Seo HY, Jang BK, Jung YA, Lee EJ, Kim HS, Jeon JH, et al. Phospholipase D1 decreases type I collagen levels in hepatic stellate cells via induction of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jun 20;449(1):38–43.
282. Gao J, Wei B, de Assuncao TM, Liu Z, Hu X, Ibrahim S, et al. Hepatic stellate cell autophagy inhibits extracellular vesicle release to attenuate liver fibrosis. *J Hepatol*. 2020 Nov;73(5):1144–54.

283. Zhang J, Ping J, Jiang N, Xu L. Resveratrol inhibits hepatic stellate cell activation by regulating autophagy and apoptosis through the SIRT1 and JNK signaling pathways. *J Food Biochem*. 2022 Dec;46(12):e14463.
284. Fu MY, He YJ, Lv X, Liu ZH, Shen Y, Ye GR, et al. Transforming growth factor- β 1 reduces apoptosis via autophagy activation in hepatic stellate cells. *Mol Med Rep*. 2014 Sep 1;10(3):1282–8.
285. Thomes PG, Brandon-Warner E, Li T, Donohue TM, Schrum LW. Rev-erb agonist and TGF- β similarly affect autophagy but differentially regulate hepatic stellate cell fibrogenic phenotype. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Dec;81(Pt A):137–47.
286. Shaker ME, Ghani A, Shiha GE, Ibrahim TM, Mehal WZ. Nilotinib induces apoptosis and autophagic cell death of activated hepatic stellate cells via inhibition of histone deacetylases. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Aug;1833(8):1992–2003.
287. Hao H, Zhang D, Shi J, Wang Y, Chen L, Guo Y, et al. Sorafenib induces autophagic cell death and apoptosis in hepatic stellate cell through the JNK and Akt signaling pathways. *Anticancer Drugs*. 2016 Mar;27(3):192–203.
288. Yang JI, Yoon JH, Bang YJ, Lee SH, Lee SM, Byun HJ, et al. Synergistic antifibrotic efficacy of statin and protein kinase C inhibitor in hepatic fibrosis. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Jan;298(1):G126–32.
289. Bosch J, Gracia-Sancho J, Abraldes JG. Cirrhosis as new indication for statins. *Gut*. 2020 May 1;69(5):953–62.
290. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015 Aug 1;149(2):389-397.e10.
291. Wang W, Zhao C, Zhou J, Zhen Z, Wang Y, Shen C. Simvastatin Ameliorates Liver Fibrosis via Mediating Nitric Oxide Synthase in Rats with Non-Alcoholic Steatohepatitis-Related Liver Fibrosis. *PLoS ONE*. 2013 Oct 2;8(10):e76538.

292. Chong LW, Hsu YC, Lee TF, Lin Y, Chiu YT, Yang KC, et al. Fluvastatin attenuates hepatic steatosis-induced fibrogenesis in rats through inhibiting paracrine effect of hepatocyte on hepatic stellate cells. *BMC Gastroenterol*. 2015 Feb 15;15:22.
293. Ciardullo S, Perseghin G. Statin use is associated with lower prevalence of advanced liver fibrosis in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2021 Aug;121:154752.
294. Nascimbeni F, Aron-Wisnewsky J, Pais R, Tordjman J, Poitou C, Charlotte F, et al. Statins, antidiabetic medications and liver histology in patients with diabetes with non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ Open Gastroenterol*. 2016 Mar 1;3(1):e000075.
295. Hyogo H, Tazuma S, Arihiro K, Iwamoto K, Nabeshima Y, Inoue M, et al. Efficacy of atorvastatin for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis with dyslipidemia. *Metabolism*. 2008 Dec;57(12):1711–8.
296. Nelson A, Torres DM, Morgan AE, Fincke C, Harrison SA. A Pilot Study Using Simvastatin in the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis: A Randomized Placebo-controlled Trial. *J Clin Gastroenterol*. 2009 Dec;43(10):990.
297. Oni ET, Sinha P, Karim A, Martin SS, Blaha MJ, Agatston AS, et al. Statin Use Is Not Associated With Presence of and Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Arch Med Res*. 2014 Jan 1;45(1):52–7.
298. Lee JI, Lee HW, Lee KS, Lee HS, Park JY. Effects of Statin Use on the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Nationwide Nested Case-Control Study. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG*. 2021 Jan;116(1):116.
299. Pinyopornpanish K, Al-Yaman W, Butler RS, Carey W, McCullough A, Romero-Marrero C. Chemopreventive Effect of Statin on Hepatocellular Carcinoma in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis Cirrhosis. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG*. 2021 Nov;116(11):2258.

300. German MN, Lutz MK, Pickhardt PJ, Bruce RJ, Said A. Statin Use is Protective Against Hepatocellular Carcinoma in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Case-control Study. *J Clin Gastroenterol*. 2020 Sep;54(8):733.
301. Li X, Peng X, Zoulikha M, Bofo GF, Magar KT, Ju Y, et al. Multifunctional nanoparticle-mediated combining therapy for human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Jan 1;9(1):1–33.
302. Wang C, Zhang S, Li Y, Gong L, Yao C, Fu K, et al. Phillygenin Inhibits TGF- β 1-induced Hepatic Stellate Cell Activation and Inflammation: Regulation of the Bax/Bcl-2 and Wnt/ β -catenin Pathways. *Inflammation*. 2024 Aug 1;47(4):1403–22.
303. Lee EH, Park KI, Kim KY, Lee JH, Jang EJ, Ku SK, et al. Liquiritigenin inhibits hepatic fibrogenesis and TGF- β 1/Smad with Hippo/YAP signal. *Phytomedicine*. 2019 Sep 1;62:152780.
304. Takahara T, Furui K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology*. 1995 Mar;21(3):787–95.
305. Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MDA, et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: Evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology*. 2004 Jun 1;126(7):1795–808.
306. Zhang H, Chen F, Fan X, Lin C, Hao Y, Wei H, et al. Quantitative Proteomic analysis on Activated Hepatic Stellate Cells reversion Reveal STAT1 as a key regulator between Liver Fibrosis and recovery. *Sci Rep*. 2017 Mar 21;7:44910.
307. Gao B, Wang H, Lafdil F, Feng D. STAT proteins - key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver. *J Hepatol*. 2012 Aug;57(2):430–41.
308. Mair M, Zollner G, Schneller D, Musteanu M, Fickert P, Gumhold J, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 protects from liver injury and

- fibrosis in a mouse model of sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(7):2499–508.
309. Xiang DM, Sun W, Ning BF, Zhou TF, Li XF, Zhong W, et al. The HLF/IL-6/STAT3 feedforward circuit drives hepatic stellate cell activation to promote liver fibrosis. *Gut*. 2018 Sep;67(9):1704–15.
310. Park O, Wang H, Weng H, Feigenbaum L, Li H, Yin S, et al. In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression in mice: Implications for human liver disease progression. *Hepatology*. 2011 Jul;54(1):252–61.
311. Jeong WI, Park O, Radaeva S, Gao B. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology*. 2006;44(6):1441–51.
312. Kim WH, Hong F, Radaeva S, Jaruga B, Fan S, Gao B. STAT1 plays an essential role in LPS/D-galactosamine-induced liver apoptosis and injury. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Oct;285(4):G761–8.
313. Kitsugi K, Noritake H, Matsumoto M, Hanaoka T, Umemura M, Yamashita M, et al. Simvastatin inhibits hepatic stellate cells activation by regulating the ferroptosis signaling pathway. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2023 Oct 1;1869(7):166750.
314. Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ, Fu X, Penn MS, Sprecher DL, et al. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation*. 2003 Jul 29;108(4):426–31.
315. Bahrami A, Parsamanesh N, Atkin SL, Banach M, Sahebkar A. Effect of statins on toll-like receptors: a new insight to pleiotropic effects. *Pharmacol Res*. 2018 Sep;135:230–8.
316. Khalifeh M, Penson PE, Banach M, Sahebkar A. Statins as anti-pyroptotic agents. *Arch Med Sci AMS*. 2021 Aug 9;17(5):1414–7.
317. Shakour N, Ruscica M, Hadizadeh F, Cirtori C, Banach M, Jamialahmadi T, et al. Statins and C-reactive protein: in silico evidence on direct interaction. *Arch Med Sci AMS*. 2020 Nov 2;16(6):1432–9.

318. Habeos IG, Ziros PG, Chartoumpakis D, Psyrogiannis A, Kyriazopoulou V, Papavassiliou AG. Simvastatin activates Keap1/Nrf2 signaling in rat liver. *J Mol Med Berl Ger*. 2008 Nov;86(11):1279–85.
319. Chartoumpakis D, Ziros PG, Psyrogiannis A, Kyriazopoulou V, Papavassiliou AG, Habeos IG. Simvastatin lowers reactive oxygen species level by Nrf2 activation via PI3K/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May 28;396(2):463–6.
320. Rodrigues G, Moreira AJ, Bona S, Schemitt E, Marroni CA, Di Naso FC, et al. Simvastatin Reduces Hepatic Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Nonalcoholic Steatohepatitis Experimental Model. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Jun 18;2019:3201873.
321. Xu W, Hellerbrand C, Köhler UA, Bugnon P, Kan YW, Werner S, et al. The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2008 Oct;88(10):1068–78.
322. Yan H, Huang Z, Bai Q, Sheng Y, Hao Z, Wang Z, et al. Natural product andrographolide alleviated APAP-induced liver fibrosis by activating Nrf2 antioxidant pathway. *Toxicology*. 2018 Mar 1;396–397:1–12.
323. Dwivedi DK, Jena G, Kumar V. Dimethyl fumarate protects thioacetamide-induced liver damage in rats: Studies on Nrf2, NLRP3, and NF- κ B. *J Biochem Mol Toxicol*. 2020;34(6):e22476.
324. Mansouri A, Reiner Ž, Ruscica M, Tedeschi-Reiner E, Radbakhsh S, Bagheri Ekta M, et al. Antioxidant Effects of Statins by Modulating Nrf2 and Nrf2/HO-1 Signaling in Different Diseases. *J Clin Med*. 2022 Feb 27;11(5):1313.
325. Ezhilarasan D. Oxidative stress is bane in chronic liver diseases: Clinical and experimental perspective. *Arab J Gastroenterol*. 2018 Jun 1;19(2):56–64.
326. Ezhilarasan D. Mitochondria: A critical hub for hepatic stellate cells activation during chronic liver diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int HBPDI*. 2021 Aug;20(4):315–22.

327. Ye M ping, Lu W li, Rao Q fan, Li M jun, Hong H qin, Yang X ying, et al. Mitochondrial stress induces hepatic stellate cell activation in response to the ATF4/TRIB3 pathway stimulation. *J Gastroenterol*. 2023 Jul 1;58(7):668–81.
328. Ai W lun, Dong L yue, Wang J, Li Z wei, Wang X, Gao J, et al. Deficiency in augmenter of liver regeneration accelerates liver fibrosis by promoting migration of hepatic stellate cell. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2018 Nov 1;1864(11):3780–91.
329. Bae M, Lee Y, Park YK, Shin DG, Joshi P, Hong SH, et al. Astaxanthin attenuates the increase in mitochondrial respiration during the activation of hepatic stellate cells. *J Nutr Biochem*. 2019 Sep 1;71:82–9.
330. Chen MF, Huang SJ, Huang CC, Liu PS, Lin KI, Liu CW, et al. Saikosaponin d induces cell death through caspase-3-dependent, caspase-3-independent and mitochondrial pathways in mammalian hepatic stellate cells. *BMC Cancer*. 2016 Jul 26;16(1):532.
331. Gajendiran P, Vega LI, Itoh K, Sesaki H, Vakili MR, Lavasanifar A, et al. Elevated mitochondrial activity distinguishes fibrogenic hepatic stellate cells and sensitizes for selective inhibition by mitotropic doxorubicin. *J Cell Mol Med*. 2018;22(4):2210–9.
332. Qiu YN, Wang GH, Zhou F, Hao JJ, Tian L, Guan LF, et al. PM2.5 induces liver fibrosis via triggering ROS-mediated mitophagy. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019 Jan 15;167:178–87.
333. Lee JH, Kim KM, Jung EH, Lee HR, Yang JH, Cho SS, et al. Parkin-Mediated Mitophagy by TGF- β Is Connected with Hepatic Stellate Cell Activation. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan;24(19):14826.
334. Habibi M, Ferguson D, Eichler SJ, Chan MM, LaPoint A, Shew TM, et al. Mitochondrial Pyruvate Carrier Inhibition Attenuates Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Injury in a Mouse Model of Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease. *BioRxiv Prepr Serv Biol*. 2023 Aug 25;2023.02.13.528384.

335. Jeon KI, Kumar A, Callan CL, DeMagistris M, MacRae S, Nehrke K, et al. Blocking Mitochondrial Pyruvate Transport Alters Corneal Myofibroblast Phenotype: A New Target for Treating Fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2023 Oct 3;64(13):36.
336. Iommarini L, Ghelli A, Tropeano CV, Kurelac I, Leone G, Vidoni S, et al. Unravelling the Effects of the Mutation m.3571insC/MT-ND1 on Respiratory Complexes Structural Organization. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 7;19(3):764.
337. Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med.* 2010 Jun 1;31(3):227–85.
338. Serasinghe MN, Chipuk JE. Mitochondrial Fission in Human Diseases. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;240:159–88.
339. Sun Z, Ji Z, Meng H, He W, Li B, Pan X, et al. Lactate facilitated mitochondrial fission-derived ROS to promote pulmonary fibrosis via ERK/DRP-1 signaling. *J Transl Med.* 2024 May 21;22:479.
340. Zhou H, Zhu P, Wang J, Toan S, Ren J. DNA-PKcs promotes alcohol-related liver disease by activating Drp1-related mitochondrial fission and repressing FUNDC1-required mitophagy. *Signal Transduct Target Ther.* 2019;4:56.
341. Palma E, Riva A, Moreno C, Odena G, Mudan S, Manyakin N, et al. Perturbations in mitochondrial dynamics are closely involved in the progression of Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Clin Exp Res.* 2020 Apr;44(4):856–65.
342. Yamada T, Murata D, Adachi Y, Itoh K, Kameoka S, Igarashi A, et al. Mitochondrial Stasis Reveals p62-Mediated Ubiquitination in Parkin-Independent Mitophagy and Mitigates Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 2018 Oct 2;28(4):588-604.e5.
343. Krishnasamy Y, Gooz M, Li L, Lemasters JJ, Zhong Z. Role of mitochondrial depolarization and disrupted mitochondrial homeostasis in non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2019;11(5):190–204.

344. Rodríguez-Rodríguez DR, Lozano-Sepulveda SA, Delgado-Montemayor C, Waksman N, Cordero-Perez P, Rivas-Estilla AM. Turnera diffusa extract attenuates profibrotic, extracellular matrix and mitochondrial markers in activated human hepatic stellate cells (HSC). *Ann Hepatol.* 2021;22:100281.
345. Smith-Cortinez N, van Eunen K, Heegsma J, Serna-Salas SA, Sydor S, Bechmann LP, et al. Simultaneous Induction of Glycolysis and Oxidative Phosphorylation during Activation of Hepatic Stellate Cells Reveals Novel Mitochondrial Targets to Treat Liver Fibrosis. *Cells.* 2020 Nov;9(11):2456.
346. Nguyen G, Park SY, Do DV, Choi DH, Cho EH. Gemigliptin Alleviates Succinate-Induced Hepatic Stellate Cell Activation by Ameliorating Mitochondrial Dysfunction. *Endocrinol Metab.* 2022 Dec;37(6):918–28.
347. Peng X, Yang H, Tao L, Xiao J, Zeng Y, Shen Y, et al. Fluorofenidone alleviates liver fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell autophagy via the TGF- β 1/Smad pathway: implications for liver cancer. *PeerJ.* 2023;11:e16060.
348. Luangmonkong T, Parichatikanond W, Olinga P. Targeting collagen homeostasis for the treatment of liver fibrosis: Opportunities and challenges. *Biochem Pharmacol.* 2023 Sep;215:115740.
349. Ryaboshapkina M, Hammar M. Human hepatic gene expression signature of non-alcoholic fatty liver disease progression, a meta-analysis. *Sci Rep.* 2017 Sep 27;7(1):12361.
350. Yuan B, Chen Y, Wu Z, Zhang L, Zhuang Y, Zhao X, et al. Proteomic Profiling of Human Hepatic Stellate Cell Line LX2 Responses to Irradiation and TGF- β 1. *J Proteome Res.* 2019 Jan 4;18(1):508–21.
351. Ji J, Yu F, Ji Q, Li Z, Wang K, Zhang J, et al. Comparative proteomic analysis of rat hepatic stellate cell activation: A comprehensive view and suppressed immune response. *Hepatology.* 2012;56(1):332–49.
352. Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, et al. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006 Feb;38(2):135–51.

353. Koda Y, Teratani T, Chu PS, Hagihara Y, Mikami Y, Harada Y, et al. CD8+ tissue-resident memory T cells promote liver fibrosis resolution by inducing apoptosis of hepatic stellate cells. *Nat Commun.* 2021 Jul 22;12(1):4474.
354. Hammerich L, Bangen JM, Govaere O, Zimmermann HW, Gassler N, Huss S, et al. Chemokine receptor CCR6-dependent accumulation of $\gamma\delta$ T cells in injured liver restricts hepatic inflammation and fibrosis. *Hepatology*. 2014 Feb;59(2):630–42.
355. Su Y, Lu S, Hou C, Ren K, Wang M, Liu X, et al. Mitigation of liver fibrosis via hepatic stellate cells mitochondrial apoptosis induced by metformin. *Int Immunopharmacol.* 2022 Jul;108:108683.
356. Yang C, Geng X, Wan G, Song L, Wang Y, Zhou G, et al. Transcriptomic and proteomic investigation of the ameliorative effect of total polyphenolic glycoside extract on hepatic fibrosis in *Lamiophlomis rotata* Kudo via the AGE/RAGE pathway. *J Ethnopharmacol.* 2024 Apr 24;324:117720.
357. Wan G, Chen Z, Lei L, Geng X, Zhang Y, Yang C, et al. The total polyphenolic glycoside extract of *Lamiophlomis rotata* ameliorates hepatic fibrosis through apoptosis by TGF- β /Smad signaling pathway. *Chin Med.* 2023 Feb 24;18(1):20.
358. Loomba R, Lawitz E, Mantry PS, Jayakumar S, Caldwell SH, Arnold H, et al. The ASK1 inhibitor selonsertib in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, phase 2 trial. *Hepatology*. 2018 Feb;67(2):549–59.
359. Younossi ZM, Stepanova M, Lawitz E, Charlton M, Loomba R, Myers RP, et al. Improvement of hepatic fibrosis and patient-reported outcomes in non-alcoholic steatohepatitis treated with selonsertib. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2018 Oct;38(10):1849–59.
360. Harrison SA, Wong VW, Okanoue T, Bzowej N, Vuppalanchi R, Younes Z, et al. Selonsertib for patients with bridging fibrosis or compensated cirrhosis due to NASH: Results from randomized phase III STELLAR trials. *J Hepatology*. 2020 Jul;73(1):26–39.

-
361. Ke PY. Mitophagy in the Pathogenesis of Liver Diseases. *Cells*. 2020 Mar 30;9(4):831.
362. Ding Q, Xie XL, Wang MM, Yin J, Tian JM, Jiang XY, et al. The role of the apoptosis-related protein BCL-B in the regulation of mitophagy in hepatic stellate cells during the regression of liver fibrosis. *Exp Mol Med*. 2019 Jan 11;51(1):6.
363. Lee JH, Seo KH, Yang JH, Cho SS, Kim NY, Kim JH, et al. CCCP induces hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis via mitochondrial and lysosomal dysfunction. *Free Radic Biol Med*. 2024 Nov 20;225:181–92.
364. Dou SY, Zhang JN, Xie XL, Liu T, Hu JL, Jiang XY, et al. MitoQ inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by enhancing PINK1/parkin-mediated mitophagy. *Open Med*. 2021 Nov 12;16(1):1718–27.
365. Kang JW, Hong JM, Lee SM. Melatonin enhances mitophagy and mitochondrial biogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *J Pineal Res*. 2016;60(4):383–93.
366. Wu H, Chen G, Wang J, Deng M, Yuan F, Gong J. TIM-4 interference in Kupffer cells against CCL4-induced liver fibrosis by mediating Akt1/Mitophagy signalling pathway. *Cell Prolif*. 2020;53(1):e12731.
367. Yong H, Shan S, Wang S, Liu Z, Liu Z, Zhang C, et al. Activation of mitophagy by rapamycin eliminated the accumulation of TDP-43 on mitochondrial and promoted the resolution of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Toxicology*. 2022 Apr 15;471:153176.
368. Chen Y, Choi SS, Michelotti GA, Chan IS, Swiderska-Syn M, Karaca GF, et al. Hedgehog Controls Hepatic Stellate Cell Fate by Regulating Metabolism. *Gastroenterology*. 2012 Nov 1;143(5):1319-1329.e11.
369. Mejias M, Gallego J, Naranjo-Suarez S, Ramirez M, Pell N, Manzano A, et al. CPEB4 Increases Expression of PFKFB3 to Induce Glycolysis and Activate Mouse and Human Hepatic Stellate Cells, Promoting Liver Fibrosis. *Gastroenterology*. 2020 Jul;159(1):273–88.

370. Gilgenkrantz H, Mallat A, Moreau R, Lotersztajn S. Targeting cell-intrinsic metabolism for antifibrotic therapy. *J Hepatol*. 2021 Jun;74(6):1442–54.
371. Grise F, Bidaud A, Moreau V. Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2009 Apr 1;1795(2):137–51.
372. Kawada N, Seki S, Kuroki T, Kaneda K. ROCK inhibitor Y-27632 attenuates stellate cell contraction and portal pressure increase induced by endothelin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Dec 20;266(2):296–300.
373. Nakamura M, Nagano T, Chikama T, Nishida T. Role of the small GTP-binding protein rho in epithelial cell migration in the rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Apr;42(5):941–7.
374. Li L, Wang JY, Yang CQ, Jiang W. Effect of RhoA on transforming growth factor β 1-induced rat hepatic stellate cell migration. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2012 Aug;32(7):1093–102.
375. Li L, Li J, Wang J yao, Yang C qing, Jia M lei, Jiang W. Role of RhoA in platelet-derived growth factor-BB-induced migration of rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)*. 2010 Sep;123(18):2502.
376. Guo P, Yu H, Wang Y, Xie X, Chen G. Exosome: An Emerging Participant in the Development of Liver Disease. *Hepat Mon [Internet]*. 2017 [citado 3 de diciembre de 2024];17(8). Disponible en: <https://brieflands.com/articles/hepatmon-58021#abstract>
377. Sun LJ, Yu JW, Shi YG, Zhang XY, Shu MN, Chen MY. Hepatitis C virus core protein induces dysfunction of liver sinusoidal endothelial cell by down-regulation of silent information regulator 1. *J Med Virol*. 2018 May;90(5):926–35.
378. Hamada-Tsutsumi S, Onishi M, Matsuura K, Isogawa M, Kawashima K, Sato Y, et al. Inhibitory Effect of a Human MicroRNA, miR-6133-5p, on the Fibrotic Activity of Hepatic Stellate Cells in Culture. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 1;21(19):7251.
379. Saha B, Kodys K, Szabo G. Hepatitis C Virus-Induced Monocyte Differentiation Into Polarized M2 Macrophages Promotes Stellate Cell Activation via TGF- β . *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016 Jan 8;2(3):302-316.e8.

380. Bai Q, An J, Wu X, You H, Ma H, Liu T, et al. HBV promotes the proliferation of hepatic stellate cells via the PDGF-B/PDGFR- β signaling pathway in vitro. *Int J Mol Med*. 2012 Dec;30(6):1443–50.
381. Ninomiya M, Inoue J, Krueger EW, Chen J, Cao H, Masamune A, et al. The Exosome-Associated Tetraspanin CD63 Contributes to the Efficient Assembly and Infectivity of the Hepatitis B Virus. *Hepatol Commun*. 2021 Mar 31;5(7):1238–51.
382. Huang R, Pan Q, Ma X, Wang Y, Liang Y, Dai B, et al. Hepatic Stellate Cell-Derived Microvesicles Prevent Hepatocytes from Injury Induced by APAP/H₂O₂. *Stem Cells Int*. 2016;2016:8357567.
383. Brandon-Warner E, Feilen N, Culberson CR, Field CO, deLemos AS, Russo MW, et al. Processing of miR17-92 Cluster in Hepatic Stellate Cells Promotes Hepatic Fibrogenesis During Alcohol-Induced Injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016 Jul;40(7):1430–42.
384. Charrier A, Chen R, Chen L, Kemper S, Hattori T, Takigawa M, et al. Exosomes mediate intercellular transfer of pro-fibrogenic connective tissue growth factor (CCN2) between hepatic stellate cells, the principal fibrotic cells in the liver. *Surgery*. 2014 Sep;156(3):548–55.
385. Benbow JH, Marrero E, McGee RM, Brandon-Warner E, Attal N, Feilen NA, et al. HEPATIC STELLATE CELL-DERIVED EXOSOMES MODULATE MACROPHAGE INFLAMMATORY RESPONSE. *Exp Cell Res*. 2021 Aug 1;405(1):112663.
386. Lemoine S, Cadoret A, Rautou PE, El Mourabit H, Ratziu V, Corpechot C, et al. Portal myofibroblasts promote vascular remodeling underlying cirrhosis formation through the release of microparticles. *Hepatol Baltim Md*. 2015 Mar;61(3):1041–55.
387. Witek RP, Yang L, Liu R, Jung Y, Omenetti A, Syn WK, et al. Liver Cell-Derived Microparticles Activate Hedgehog Signaling and Alter Gene Expression in Hepatic Endothelial Cells. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):320-330.e2.

388. Zhang X, Chen F, Huang P, Wang X, Zhou K, Zhou C, et al. Exosome-depleted MiR-148a-3p derived from Hepatic Stellate Cells Promotes Tumor Progression via ITGA5/PI3K/Akt Axis in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Biol Sci.* 2022 Mar 6;18(6):2249–60.
389. Peng Y, Li Z, Chen S, Zhou J. DHFR silence alleviated the development of liver fibrosis by affecting the crosstalk between hepatic stellate cells and macrophages. *J Cell Mol Med.* 2021 Nov;25(21):10049–60.
390. Chen L, Charrier A, Zhou Y, Chen R, Yu B, Agarwal K, et al. Epigenetic regulation of connective tissue growth factor by microRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells. *HepatoL Baltim Md.* 2014 Mar;59(3):1118–29.
391. Chen L, Chen R, Kemper S, Charrier A, Brigstock DR. Suppression of fibrogenic signaling in hepatic stellate cells by Twist1-dependent microRNA-214 expression: Role of exosomes in horizontal transfer of Twist1. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 2015 Sep 15;309(6):G491–9.
392. Benbow JH, Marrero E, McGee RM, Brandon-Warner E, Attal N, Feilen NA, et al. Hepatic stellate cell-derived exosomes modulate macrophage inflammatory response. *Exp Cell Res.* 2021 Aug 1;405(1):112663.
393. Marrero E, Attal N, Nimeri A, McGee RM, Benbow JH, Thompson KJ, et al. Ectodysplasin-A mRNA in exosomes released from activated hepatic stellate cells stimulates macrophage response. *Exp Cell Res.* 2022 Oct 15;419(2):113297.
394. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles.* 2024;13(2):e12404.
395. Gonçalves CM, Castro MAA, Henriques T, Oliveira MI, Pinheiro HC, Oliveira C, et al. Molecular cloning and analysis of SSc5D, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *Mol Immunol.* 2009 Aug;46(13):2585–96.

396. Verschuren L, Mak AL, van Koppen A, Özsezen S, Difrancesco S, Caspers MPM, et al. Development of a novel non-invasive biomarker panel for hepatic fibrosis in MASLD. *Nat Commun*. 2024 May 29;15(1):4564.
397. Kopec AK, Luyendyk JP. Role of Fibrin(ogen) in Progression of Liver Disease: Guilt by Association? *Semin Thromb Hemost*. 2016 Jun;42(4):397–407.
398. Luyendyk JP, Kassel KM, Allen K, Guo GL, Li G, Cantor GH, et al. Fibrinogen Deficiency Increases Liver Injury and Early Growth Response-1 (Egr-1) Expression in a Model of Chronic Xenobiotic-Induced Cholestasis. *Am J Pathol*. 2011 Mar;178(3):1117–25.
399. Bezerra JA, Bugge TH, Melin-Aldana H, Sabla G, Kombrinck KW, Witte DP, et al. Plasminogen deficiency leads to impaired remodeling after a toxic injury to the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21;96(26):15143–8.
400. Joshi N, Kopec AK, O'Brien KM, Towery KL, Cline-Fedewa H, Williams KJ, et al. Coagulation-driven platelet activation reduces cholestatic liver injury and fibrosis in mice. *J Thromb Haemost JTH*. 2015 Jan;13(1):57–71.
401. Joshi N, Kopec AK, Ray JL, Cline-Fedewa H, Nawabi A, Schmitt T, et al. Fibrin deposition following bile duct injury limits fibrosis through an α M β 2-dependent mechanism. *Blood*. 2016 Jun 2;127(22):2751–62.
402. Joshi N, Kopec AK, Towery K, Williams KJ, Luyendyk JP. The Antifibrinolytic Drug Tranexamic Acid Reduces Liver Injury and Fibrosis in a Mouse Model of Chronic Bile Duct Injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014 Jun;349(3):383–92.
403. Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest*. 2001 May 1;107(9):1049–54.
404. Frizell E, Liu SL, Abraham A, Ozaki I, Eghbali M, Sage EH, et al. Expression of SPARC in normal and fibrotic livers. *Hepatology*. 1995 Mar;21(3):847–54.

405. Blazejewski S, Le Bail B, Boussarie L, Blanc JF, Malaval L, Okubo K, et al. Osteonectin (SPARC) expression in human liver and in cultured human liver myofibroblasts. *Am J Pathol.* 1997 Sep;151(3):651–7.
406. Camino AM, Atorrasagasti C, Maccio D, Prada F, Salvatierra E, Rizzo M, et al. Adenovirus-mediated inhibition of SPARC attenuates liver fibrosis in rats. *J Gene Med.* 2008 Sep;10(9):993–1004.
407. Atorrasagasti C, Peixoto E, Aquino JB, Kippes N, Malvicini M, Alaniz L, et al. Lack of the Matricellular Protein SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine) Attenuates Liver Fibrogenesis in Mice. *PLoS ONE.* 2013 Feb 11;8(2):e54962.
408. Dees C, Distler JHW. Canonical Wnt signalling as a key regulator of fibrogenesis – implications for targeted therapies? *Exp Dermatol.* 2013;22(11):710–3.
409. Hu HH, Cao G, Wu XQ, Vaziri ND, Zhao YY. Wnt signaling pathway in aging-related tissue fibrosis and therapies. *Ageing Res Rev.* 2020 Jul 1;60:101063.
410. Nishikawa K, Osawa Y, Kimura K. Wnt/ β -Catenin Signaling as a Potential Target for the Treatment of Liver Cirrhosis Using Antifibrotic Drugs. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 10;19(10):3103.
411. Perugorria MJ, Olaizola P, Labiano I, Esparza-Baquer A, Marzioni M, Marin JJG, et al. Wnt– β -catenin signalling in liver development, health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019 Feb;16(2):121–36.
412. Lee JM, Yang J, Newell P, Singh S, Parwani A, Friedman SL, et al. β -Catenin signaling in hepatocellular cancer: Implications in inflammation, fibrosis, and proliferation. *Cancer Lett.* 2014 Feb 1;343(1):90–7.
413. Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Jan 3;7:3.
414. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell.* 2017 Jun 1;169(6):985–99.

415. Koehler A, Schlupf J, Schneider M, Kraft B, Winter C, Kashef J. Loss of *Xenopus* cadherin-11 leads to increased Wnt/ β -catenin signaling and up-regulation of target genes c-myc and cyclin D1 in neural crest. *Dev Biol*. 2013 Nov 1;383(1):132–45.
416. Jiang F, Parsons CJ, Stefanovic B. Gene expression profile of quiescent and activated rat hepatic stellate cells implicates Wnt signaling pathway in activation. *J Hepatol*. 2006 Sep;45(3):401–9.
417. Osawa Y, Oboki K, Imamura J, Kojika E, Hayashi Y, Hishima T, et al. Inhibition of Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP)-response Element-binding Protein (CREB)-binding Protein (CBP)/ β -Catenin Reduces Liver Fibrosis in Mice. *eBioMedicine*. 2015 Nov 1;2(11):1751–8.
418. Yin X, Yi H, Wu W, Shu J, Wu X, Yu L. R-Spondin2 Activates Hepatic Stellate Cells and Promotes Liver Fibrosis. *Dig Dis Sci*. 2014 Oct 1;59(10):2452–61.
419. Yin X, Yi H, Wang L, Wu W, Wu X, Yu L. RSPOs facilitated HSC activation and promoted hepatic fibrogenesis. *Oncotarget*. 2016 Aug 27;7(39):63767–78.
420. Li W, Zhu C, Li Y, Wu Q. Mest Attenuates CCl₄-Induced Liver Fibrosis in Rats by Inhibiting the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. 2014 May 29;8(3):282–91.
421. Xiong WJ, Hu LJ, Jian YC, Wang LJ, Jiang M, Li W, et al. Wnt5a participates in hepatic stellate cell activation observed by gene expression profile and functional assays. *World J Gastroenterol*. 2012 Apr 21;18(15):1745–52.
422. Duspara K, Bojanic K, Pejic JI, Kuna L, Kolaric TO, Nincevic V, et al. Targeting the Wnt Signaling Pathway in Liver Fibrosis for Drug Options: An Update. *J Clin Transl Hepatol*. 2021 Dec 28;9(6):960–71.
423. Wen Y, Feng D, Wu H, Liu W, Li H, Wang F, et al. Defective Initiation of Liver Regeneration in Osteopontin-Deficient Mice after Partial Hepatectomy due to Insufficient Activation of IL-6/Stat3 Pathway. *Int J Biol Sci*. 2015 Aug 21;11(10):1236–47.

424. Li T, Zhong W, Li M, Shao Z, Zhang G, Wang W, et al. TRIM26 deficiency enhancing liver regeneration through macrophage polarization and β -catenin pathway activation. *Cell Death Dis.* 2024 Jun 26;15(6):1–14.
425. Mitchell C, Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc.* 2008 Jul;3(7):1167–70.
426. Song S, Peng H, Li Y, Zhao T, Cao R, Zheng L, et al. Oleanolic acid promotes liver regeneration after partial hepatectomy via regulating pregnane X receptor signaling pathway in mice. *Chem Biol Interact.* 2024 Apr 25;393:110970.
427. Liang Y, Mei Q, He E, Ballar P, Wei C, Wang Y, et al. MANF serves as a novel hepatocyte factor to promote liver regeneration after 2/3 partial hepatectomy via doubly targeting Wnt/ β -catenin signaling. *Cell Death Dis.* 2024 Sep 18;15(9):1–15.
428. Sun R, Zhao H, Huang S, Zhang R, Lu Z, Li S, et al. Prediction of Liver Weight Recovery by an Integrated Metabolomics and Machine Learning Approach After 2/3 Partial Hepatectomy. *Front Pharmacol.* 2021 Nov 30;12:760474.
429. Li Y, Yang X, Bao T, Sun X, Li X, Zhu H, et al. Radix Astragali decoction improves liver regeneration by upregulating hepatic expression of aquaporin-9. *Phytomedicine.* 2024 Jan 1;122:155166.
430. Li X, Sun J, Fan X, Guan L, Li D, Zhou Y, et al. Schisandrol B promotes liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Eur J Pharmacol.* 2018 Jan 5;818:96–102.
431. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* Baltim Md. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S45-53.
432. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, et al. Liver Failure and Defective Hepatocyte Regeneration in Interleukin-6-Deficient Mice. *Science.* 1996;274(5291):1379–83.
433. Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* Baltim Md. 1999 Feb;29(2):403–11.

-
434. Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* Baltim Md. 2003 Sep;38(3):674–82.
435. Sun R, Jaruga B, Kulkarni S, Sun H, Gao B. IL-6 modulates hepatocyte proliferation via induction of HGF/p21cip1: regulation by SOCS3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 30;338(4):1943–9.
436. Wuestefeld T, Klein C, Streetz KL, Betz U, Lauber J, Buer J, et al. Interleukin-6/Glycoprotein 130-dependent Pathways Are Protective during Liver Regeneration. *J Biol Chem*. 2003 Mar;278(13):11281–8.
437. Drucker C, Gewiese J, Malchow S, Scheller J, Rose-John S. Impact of interleukin-6 classic- and trans-signaling on liver damage and regeneration. *J Autoimmun*. 2010 Feb;34(1):29–37.
438. Wang H, Park O, Lafdil F, Shen K, Horiguchi N, Yin S, et al. Interplay of hepatic and myeloid signal transducer and activator of transcription 3 in facilitating liver regeneration via tempering innate immunity. *Hepatology* Baltim Md. 2010 Apr;51(4):1354–62.
439. Moya IM, Halder G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Apr;20(4):211–26.
440. Ma B, Chen Y, Chen L, Cheng H, Mu C, Li J, et al. Hypoxia regulates Hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase. *Nat Cell Biol*. 2015 Jan;17(1):95–103.
441. Hong AW, Meng Z, Guan KL. The Hippo pathway in intestinal regeneration and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 Jun;13(6):324–37.
442. Wang W, Xiao ZD, Li X, Aziz KE, Gan B, Johnson RL, et al. AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nat Cell Biol*. 2015 Apr;17(4):490–9.
443. Grijalva JL, Huizenga M, Mueller K, Rodriguez S, Brazzo J, Camargo F, et al. Dynamic alterations in Hippo signaling pathway and YAP activation during

liver regeneration. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 2014 Jul 15;307(2):G196–204.

444. Oh SH, Swiderska-Syn M, Jewell ML, Premont RT, Diehl AM. Liver regeneration requires Yap1-TGF β -dependent epithelial-mesenchymal transition in hepatocytes. *J Hepatol.* 2018 Aug 1;69(2):359–67.

445. Hora S, Wuestefeld T. Liver Injury and Regeneration: Current Understanding, New Approaches, and Future Perspectives. *Cells.* 2023 Jan;12(17):2129.

ANEXOS

ANEXO I. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA PARA EL ESTUDIO CLÍNICO



Hospital Clínic Universitari



INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI DE VALENCIA

Doña Cristina Gomis Gozalbo, Vicepresidenta del Comité Ético de Investigación del Hospital Clínic Universitari de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de fecha 20 de diciembre de 2018, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos (Protocolo versión 1 de 21 de noviembre de 2018; HIP/CI Paciente Cirugía Pancreática o Biliar versión 2 de 21 de diciembre de 2018; HIP/CI Paciente con Enfermedad Hepática versión 2 de 21 de diciembre de 2018) y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

Nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad hepática crónica: rutas de señalización JAK-STAT1 y JAK-STAT3 como punto de partida. (2018/272)

Mismo que será llevado a cabo en el Servicio de Gastroenterología y en la Universitat de València y cuyos investigadores principales son el Dr. Joan Tosca Cuquerella, la Dra. Nadezda Apostolova y la Dra. Ana García Blas, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la ***Declaración de Helsinki*** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo), (Octubre 2008 Seúl, Corea) y (Octubre 2013 Fortaleza, Brasil) y en la ***Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO*** y los acuerdos del ***Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina*** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos.

Valencia, 20 de diciembre de 2018.

Fdo. : Doña Cristina Gomis Gozalbo
Vicepresidenta del Comité Ético de Investigación Clínica

2018/272

En Valencia, a 20 de diciembre de 2018

D. **Andrés Cervantes Ruipérez**, en calidad de Director General de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia – Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA

CERTIFICA

Que el proyecto con título **“Nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad hepática crónica: rutas de señalización JAK-STAT1 y JAK-STAT3 como punto de partida”**, presentado por **Joan Tosca Cuquerella, Nadezda Apostolova y Ana Blas García**, ha sido evaluado por la Comisión de Investigación de INCLIVA en su reunión del día 20 de diciembre de 2018, encontrándolo **conforme** con los requisitos de capacitación del solicitante, la adecuación del proyecto a los medios existentes, la adecuación de la memoria y el interés de los resultados del proyecto para el área de salud.

Y para que conste, se firma en la ciudad y fecha arriba indicadas

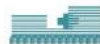


Fdo.: D. Andrés Cervantes Ruipérez
Director General
INCLIVA Instituto de Investigación Sanitaria

ANEXO II. CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS PACIENTES SOMETIDOS A CIRUGÍA PANCRÁTICA O BILIAR



Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALVA-ROSA

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE SOMETIDO A CIRUGÍA PANCRÁTICA O BILIAR

TÍTULO DEL ESTUDIO: Nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad hepática crónica: rutas de señalización JAK-STAT1 y JAK-STAT3 como punto de partida	
PROMOTOR	
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Joan Tosca Cuquerella
SERVICIO	Gastroenterología
CENTRO	Hospital Clínic Universitario

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de su centro, de acuerdo a la legislación vigente, Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda decidir si acepta o no participar en este estudio. Lea esta hoja de información con atención y nosotros le aclaremos las dudas que le puedan surgir. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno. Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. **Joan Tosca Cuquerella** en el teléfono **961 97 35 00 Ext: 436 448**.

1. Participación voluntaria

Le invitamos a participar en el estudio porque se va a someter a una cirugía pancreática o biliar. Debe saber que su participación en este estudio es totalmente voluntaria y que puede decidir NO participar. Si decide participar, puede cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su atención sanitaria. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

2. Justificación y Objetivo del estudio

La enfermedad hepática crónica y, particularmente, la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) representa actualmente un problema creciente en nuestra sociedad, especialmente debido al importante aumento en la incidencia de diabetes mellitus y obesidad. De hecho, se ha convertido en la causa más frecuente de disfunción hepática en los países desarrollados - se estima que en España una de cada cuatro personas padece esta enfermedad. Aunque en algunos pacientes se manifiesta solo como acumulación de lípidos en el hígado, en muchos otros progresa a estadios más graves como es la esteatohepatitis, la fibrosis, la cirrosis y el cáncer de hígado. Desgraciadamente, no existen tratamientos específicos ni efectivos para su diagnóstico y pronóstico. Por todo ello, existe un gran interés en la identificación de posibles moléculas útiles para el tratamiento y el diagnóstico de la enfermedad. El objetivo de este estudio es buscar estas dianas moleculares con potencial diagnóstico, pronóstico o terapéutico para la enfermedad hepática crónica.

3. Descripción del estudio

Teniendo en cuenta que el número de pacientes con enfermedad hepática crónica de los que se podrá obtener muestras de su hígado va a ser bastante baja, se obtendrán también muestras hepáticas obtenidas de pacientes sin enfermedad hepática crónica. En este caso, se utilizarán

Hospital Clínic Universitari

resecciones hepáticas de pacientes intervenidos de colecistectomía o cirugía pancreática. Se prevé la inclusión de 10 pacientes.

4. Actividades del estudio

Se prevé obtener el número total de muestras a lo largo de 1 año (10 pacientes). A partir de la última muestra recogida se añadirán 6 meses para el análisis y publicación de los datos. En un principio, no se prevé que su participación en el estudio conlleve la realización de más visitas y más pruebas de las que se realizarían si no participara. Tampoco se prevé la realización de exploraciones y actividades complementarias o extraordinarias por su participación en el estudio. En el caso de que sean necesarias por el desarrollo del proyecto, Ud. será informado debidamente.

5. Riesgos y molestias derivados de su participación en el estudio

En el caso de la donación de una muestra de tejido hepático, el riesgo es la presencia de hemorragia, pero se trata de una reacción cuya frecuencia es muy baja. Además, la probabilidad de esta complicación es aún menor dado el tamaño tan reducido de la muestra extraída. No se prevén molestias de ningún otro tipo.

6. Posibles beneficios

Es muy posible que usted no obtenga ningún beneficio para su salud por participar en este estudio, pero podrá ayudar a conocer mejor la enfermedad hepática crónica, y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

7. Protección de datos personales

El investigador/promotor y el centro son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor, la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales, el Real Decreto que la desarrolla (RD 1720/2007) y el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD).

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

El acceso a su información personal identificada quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades competentes, al Comité de Ética de la Investigación y personal autorizado por el promotor (monitores del estudio, auditores), cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

De acuerdo a lo que establece la legislación de protección de datos, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos, pero sí se utilizarán los que ya se hayan recogido.

Además, puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio. Para ejercitar

Hospital Clínic Universitari

sus derechos, diríjase al investigador principal del estudio o al Delegado/a de Protección de Datos del centro/institución en dpd@gva.es. Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Los datos codificados pueden ser transmitidos a terceros y a otros países, pero en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito o para su uso en publicaciones científicas, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

8. INFORMACION RELATIVA A MUESTRAS BIOLÓGICAS

Su participación en este estudio conlleva la obtención y utilización de muestras biológicas con fines de investigación, para lo que se observará la Ley 14/2007 de investigación biomédica y el Real Decreto 1716/2011 de Biobancos, normativas que garantizan el respeto a los derechos que le asisten.

Al firmar este documento, revisado y evaluado favorablemente por el Comité de Ética de Investigación de su centro, usted acepta que se utilicen sus muestras para las finalidades del presente estudio.

8.1 Procedimientos de obtención de muestras, molestias y posibles riesgos

Las muestras serán obtenidas durante el seguimiento habitual de su enfermedad o proceso asistencial, pero se trata de un procedimiento fuera de la práctica clínica habitual.

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos una muestra de su hígado. Se le pedirá que done una pequeña muestra hepática durante la intervención quirúrgica que se le vaya a realizar como parte de proceso asistencial. No espera ningún efecto negativo de este procedimiento para Ud. y la única reacción indeseada sería hemorragia en la zona de extracción del tejido pero es un efecto muy poco frecuente.

Las muestras estarán asociadas a un código que solo podrá ser relacionado con su identidad por personal autorizado, de la misma manera que se ha explicado previamente con los datos obtenidos durante el estudio.

Los datos que se deriven de la utilización de estas muestras se tratarán del mismo modo que el resto de datos que se obtengan durante este estudio en cuanto a la protección de datos.

Las muestras y los datos asociados se mantendrán bajo las condiciones de seguridad adecuadas y se garantiza que los sujetos no podrán ser identificados a través de medios considerados razonables por personas distintas a las autorizadas.

Es posible que sea necesario algún dato o muestras adicionales. En ese caso, su médico se pondrá en contacto con usted para solicitarle de nuevo su colaboración. Se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

8.2 Beneficios esperados

No se espera un beneficio directo por su participación en el estudio. No obstante, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de sus muestras y de muchas otras pueden ayudar al avance científico.

Hospital Clínic Universitari

No percibirá ningún beneficio económico por la donación de las muestras y la cesión de los datos proporcionados, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación efectuada.

8.3. Lugar de análisis y almacenamiento de muestras

Durante el desarrollo del estudio sus muestras pueden ser analizadas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Durante este proceso el responsable de las muestras será el promotor/investigador del estudio.

8.4. Implicaciones de la información obtenida al analizar las muestras

En el caso de que usted lo solicite, se le podrá facilitar información acerca de los estudios generales del presente estudio.

En el caso de que en este estudio se obtengan datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted, e interesar a su salud o a la de su familia, podrá solicitar que le sean comunicados por su médico del estudio.

No obstante, si usted manifiesta su negativa a ser informado, pero según criterio del médico responsable, la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta al Comité de Ética Asistencial del centro. La comunicación de esta información se llevará a cabo por profesionales que le podrán explicar adecuadamente su relevancia y las opciones que se pudieran plantear. En caso de información genética clínicamente relevante podrá recibir el preceptivo consejo genético.

8.5. Uso futuro de las muestras

Las muestras serán conservadas en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia hasta que sean procesadas (no más de un mes), tras lo cual se destruirán.

Una vez finalizado el estudio, las muestras sobrantes serán destruidas. Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

Hospital Clínic Universitari

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: Nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad hepática crónica: rutas de señalización JAK-STAT1 y JAK-STAT3 como punto de partida	
PROMOTOR	
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Joan Tosca Cuquerella
SERVICIO	Gastroenterología
CENTRO	Hospital Clínic Universitario

Yo, _____ <<nombre y apellidos del participante>>
(Nombre de puño y letra por el paciente)

He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ <<nombre del investigador>>
(Nombre de puño y letra por el paciente)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.

- Sin tener que dar explicaciones.

- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Consiento al uso y tratamiento de mis datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Uso de Muestras

Consiento al almacenamiento y uso de las muestras y de los datos asociados para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

SI NO

Deseo que el médico del estudio me comunique la información derivada de la investigación (genética o no genética, a matizar dependiendo del caso) que pueda ser relevante y aplicable para mi salud o la de mis familiares:

SI NO Teléfono o e-mail de contacto

Consiento a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

SI NO Teléfono o e-mail de contacto

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado

Firma del participante
Fecha: ___/___/___

Firma del investigador
Fecha: ___/___/___

(Firma y fecha de puño y letra por el paciente)

Hospital Clínic Universitari

CONSENTIMIENTO INFORMADO REPRESENTANTE LEGAL

TÍTULO DEL ESTUDIO: Nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad hepática crónica: rutas de señalización JAK-STAT1 y JAK-STAT3 como punto de partida	
PROMOTOR	
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Joan Tosca Cuquerella
SERVICIO	Gastroenterología
CENTRO	Hospital Clínic Universitario

Yo, _____ <<nombre y apellidos del representante>>, en calidad de _____
(Nombre de puño y letra por el representante)
_____ <<indicar parentesco>>, de _____ <<nombre y apellidos del participante>>
(Nombre de puño y letra por el representante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ <<nombre del investigador>>
(Nombre de puño y letra por el representante)

Comprendo que su participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para su participación en el estudio

Consiento al uso y tratamiento de sus datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Uso de Muestras

Consiento al almacenamiento y uso de las muestras y de los datos asociados para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

SI NO

Deseo que el médico del estudio me comunique la información derivada de la investigación (genética o no genética, a matizar dependiendo del caso) que pueda ser relevante y aplicable para mi salud o la de mis familiares:

SI NO Teléfono o e-mail de contacto: _____

Consiento a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

SI NO Teléfono o e-mail de contacto _____

Recibirá una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado

Firma del representante legal, familiar o persona vinculada de hecho

Fecha: ____/____/____

(Firma y fecha de puño y letra por el representante)

Firma del investigador

Fecha: ____/____/____

Hospital Clínic Universitari

CONSENTIMIENTO INFORMADO ORAL ANTE TESTIGOS

TÍTULO DEL ESTUDIO: Nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad hepática crónica: rutas de señalización JAK-STAT1 y JAK-STAT3 como punto de partida	
CÓDIGO DEL ESTUDIO	
PROMOTOR	/
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Joan Tosca Cuquerella
SERVICIO	Gastroenterología
CENTRO	Hospital Clínic Universitario

Yo, _____ <<nombre y apellidos del testigo>>,

(Nombre de puño y letra por el testigo)

como testigo, afirmo que en mi presencia se ha informado a D/Dª

_____ <<nombre y apellidos del participante>>

(Nombre de puño y letra por el testigo)

y se ha leído la hoja de información que se le ha entregado sobre el estudio, de modo que:

Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.

Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

Ha hablado con _____ <<nombre del investigador>>

(Nombre de puño y letra por el testigo)

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Presta libremente su conformidad para su participación en el estudio.

Consiente al uso y tratamiento de sus datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Uso de Muestras

Consiente al almacenamiento y uso de las muestras y de los datos asociados para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

SI NO

Desea que el médico del estudio me comunique la información derivada de la investigación (genética o no genética, a matizar dependiendo del caso) que pueda ser relevante y aplicable para mi salud o la de mis familiares:

SI NO Teléfono o e-mail de contacto _____

Consiente a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

SI NO Teléfono o e-mail de contacto _____

Recibirá una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado

Firma del testigo

Fecha: ___/___/___

(Firma y fecha de puño y letra por el testigo)

Firma del investigador

Fecha: ___/___/___

ANEXO III. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA PARA EL MODELO MURINO



Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca
Ciudad Administrativa 0 de Octubre
Calle de La Democracia, 77 · 46018 València
www.gva.es

PROCEDIMIENTO 2022 VSC PEA 0109

Vista la solicitud realizada en fecha 03/05/22 con nº reg. entrada GVRTE/2022/1370821 por D/D^a. Carlos Hermenegildo Caudevilla, Vicerrector de Investigación y Política Científica, centro usuario ES462500001003, para realizar el procedimiento:

"Estudio del efecto del fármaco Rilpivirina sobre la regeneración hepática en un modelo animal de hepatectomía parcial"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero.

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

La realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2022 VSC PEA 0109** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: Universitat de València

Responsable del proyecto: Nadezda Apostolova Atanasovska

Establecimiento: Animalario Facultad de Medicina - Campus Blasco Ibañez

Necesidad de evaluación retrospectiva: No

Condiciones específicas: No

Valencia a, fecha de la firma electrónica
El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Firmado por Antonio Quintana Martínez el
08/06/2022 08:38:31
Cargo: Director General de Agricultura,
Ganadería y Pesca

ANEXO IV. PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA ASOCIADA A ESTA TESIS

1. **Benedicto AM***, Lucantoni F, Fuster-Martínez I, Diaz-Pozo P, Dorcaratto D, Muñoz-Fornier E, et al. Interference with mitochondrial function as part of the antifibrogenic effect of Rilpivirine: A step towards novel targets in hepatic stellate cell activation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024 Sep 1;178:117206.
2. **Benedicto AM***, Fuster-Martínez I*, Tosca J, Esplugues JV, Blas-García A, Apostolova N. NNRTI and Liver Damage: Evidence of Their Association and the Mechanisms Involved. *Cells*. 2021 Jul;10(7):1687.
3. Moragrega AB, Gruevska A, Fuster-Martínez I, **Benedicto AM**, Tosca J, Montón C, et al. Anti-inflammatory and immunomodulating effects of rilpivirine: Relevance for the therapeutics of chronic liver disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023 Nov 1;167:115537.
4. Lucantoni F, **Benedicto AM**, Gruevska A, Moragrega ÁB, Fuster-Martínez I, Esplugues JV, et al. Implication of autophagy in the antifibrogenic effect of Rilpivirine: when more is less. *Cell Death Dis*. 2022 Apr 20;13(4):385.

