

EL EFECTO INMUNOMODULADOR DE LSECTIN DURANTE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA EN MODELOS DE SOBREEXPRESIÓN

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Autor: Pablo García Martínez

Tutores: Esther Caparrós Cayuela & Rubén José Francés Guarinos

Cotutor: Sebastián Martínez López

Curso académico: 2023-2024

Junio de 2024

Universidad Miguel Hernández de Elche

Facultad de Ciencias Experimentales

Índice

Resumen	3
Abstract	3
Palabras clave	4
Abreviaturas	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Hígado-Cirrosis.....	6
1.2 Sistema inmunitario hepático	7
1.3 Lectinas tipo C.....	9
1.4 LSEctin	10
1.5 Linfocitos en la enfermedad hepática	12
2. ANTECEDENTES	15
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 Ratones de experimentación	16
4.2 Inducción de la cirrosis en ratones de experimentación	16
4.3 Laparotomía y perfusión hepática de los animales	16
4.4 IHC (Inmunohistoquímica) e IHF (Inmunohistoquímica fluorescente) en cortes de parafina	17
4.5 Extracción y cuantificación de ARN	19
4.6 RT-qPCR.....	19
4.7 Extracción y cuantificación de proteína.....	20
4.8 Western blot.....	20
4.9 Citometría de flujo	22
4.10 Análisis estadístico	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Modelo murino <i>knock-in</i> de sobreexpresión de LSEctin, inducción de cirrosis y laparotomía.....	23
5.2 Reclutamiento de leucocitos e inflamación	25
5.3 Th17 durante la cirrosis.....	27
5.4 Fibrosis	29
6. DISCUSIÓN	32
6.1 Daño hepático, respuesta inflamatoria y fibrosis	33
6.2 Poblaciones linfocitarias durante la enfermedad hepática crónica y LSEctin	35
7. CONCLUSIONES	37
8. PROYECCIÓN FUTURA	37
Bibliografía	38

Resumen

La cirrosis es una enfermedad que puede ser desencadenada por diversos factores como abuso de alcohol, infecciones virales, NAFLD u obesidad y se considera la última etapa de la enfermedad hepática. Al principio, se produce una lesión hepática que causa un daño en los hepatocitos, los cuales acaban sufriendo muerte celular en el caso de que el daño sea persistente. La muerte celular provoca una liberación de señales proinflamatorias que llevan a cabo la activación de las células del sistema inmune presentes en el parénquima hepático. Estas, a su vez, activan otras células responsables de la regeneración del tejido hepático como son las HSCs. Sin embargo, durante la cirrosis, el mecanismo de regeneración del tejido sufre una desregulación debido al aumento de la magnitud en la respuesta inflamatoria, causando así un estado de producción excesiva de matriz extracelular por parte de las HSCs conocido como fibrosis. LSECTin es una lectina de tipo C que se encuentra en el endotelio hepático y relacionada con la regulación de la inflamación, lo que supone una diana interesante tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de la enfermedad hepática crónica. De hecho, su expresión en hígados cirróticos humanos y de ratones se encuentra disminuida relacionándose esto con un aumento de la inflamación. Además, se sugiere su posible actuación como represora de determinadas subpoblaciones de linfocitos que promueven la inflamación en el hígado. En este trabajo se ha evaluado el papel inmunomodulador de LSECTin, mediante el uso de modelos murinos de cirrosis por tetracloruro de carbono (CCl₄) oral. Concretamente, se ha evaluado el daño hepático de ratones *wild type* y de ratones con sobreexpresión de LSECTin. Concluimos que LSECTin presenta un papel clave en el desarrollo de la cirrosis modulando las poblaciones linfocitarias proinflamatorias, pudiendo ser esta una diana terapéutica para el tratamiento de la cirrosis.

Abstract

Cirrhosis is a disease that can be triggered by various factors such as alcohol abuse, viral infections, NAFLD, or obesity and it is considered the final stage of liver disease. After a liver injury, cell death is induced on damaged triggering the release of pro-inflammatory signals that activate the immune cells present in the liver parenchyma. These, in turn, activate other cells responsible for liver tissue regeneration, such as HSCs. However, during cirrhosis, the tissue regeneration mechanism becomes dysregulated due to the increased magnitude of the inflammatory response, leading to a state of excessive extracellular matrix production by HSCs known as fibrosis. LSECTin is a C-type lectin found in liver endothelium and has been involved in inflammation regulation. As its expression is reduced in cirrhotic human and mouse livers it stands out as an interesting target for both the diagnosis and treatment of chronic liver disease. Additionally, it has been suggested that it may act as a repressor of certain lymphocyte subpopulations that promote liver inflammation. In this study, we evaluated the immunomodulatory role of LSECTin using a mouse model of cirrhosis by carbon tetrachloride (CCl₄) oral administration. Specifically, damage has been evaluated in wild

type mice and mice that overexpress LSECtin. We conclude that LSECtin plays a key role in the development of cirrhosis modulating proinflammatory lymphocyte populations, suggesting its potential as a therapeutic target in cirrhosis.

Palabras clave

Cirrosis, daño hepático, respuesta inflamatoria, fibrosis, LSECs, sobreexpresión.



Abreviaturas

α SMA: actina de músculo liso

APCs: células presentadoras de antígeno

cDNA: DNA complementario

CLRs: receptores de lectina tipo C

CMV: citomegalovirus

Col1a1: Colágeno I

Col3: Colágeno III

CTLD: dominios de lectina tipo C

DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño

DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule -3-Grabbing Nonintegrin*

DCs: células dendríticas

DRC: dominio de reconocimiento de carbohidratos

HC: Hígado Control

HCC: carcinoma hepatocelular

HCi: Hígado cirrótico

HCiKi: Hígado Cirrótico *knock-in*

HCKi: Hígado Control *knock-in*

HSCs: Células estrelladas hepáticas

IFN- γ : *interferon γ*

IL-10: interleucina 10

IL-13: interleucina 13

IL-17: interleucina 17

IL-22: interleucina 22

IL-4: interleucina 4

IL-6: interleucina 6

KCs: células de Kupffer

LSECs: células endoteliales del sinusoides hepático

LSEctin: lectina tipo C de células endoteliales sinusoidales del hígado y de los ganglios linfáticos

MAIT: células T invariantes asociadas a la mucosa

miARNs: micro ARNs

MMP: metaloproteinasas de matriz

Mmp2: Metalopeptidasa de matriz II

MoMFs: macrófagos derivados de monocitos

NAFLD: enfermedad hepática grasa no alcohólica

NASH: esteatohepatitis no alcohólica

NK: linfocitos natural *killer*

NKT: célula T asesina natural

NPCs: Células no parenquimales

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

ROS: especies reactivas del oxígeno

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

T_H: linfocitos T helper

Timp1: Inhibidor de metaloproteinasa I

TLRs: receptores tipo *tol*

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

Treg: Linfocitos T reguladores

WT: *wild type*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hígado-Cirrosis

La cirrosis es una patología muy común a nivel global y puede originarse por diversas razones, incluyendo la obesidad, la enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD), el abuso de alcohol, la presencia de infecciones por hepatitis B o C, enfermedades autoinmunes, hepatitis viral (4), trastornos colestáticos y la acumulación excesiva de hierro y cobre. Es decir, la cirrosis hepática representa la consecuencia patológica terminal de distintas enfermedades hepáticas crónicas (2), siendo la fibrosis del tejido hepático el estado inicial que precede a la cirrosis producido por un periodo extenso de inflamación que conlleva a la sustitución de tejido hepático sano por tejido hepático fibroso y la formación de nódulos regenerativos.

La progresión de esta enfermedad transcurre en dos fases diferentes: la fase asintomática, conocida como cirrosis compensada, y una fase en la que existen manifestaciones clínicas, conocida como cirrosis descompensada, caracterizada por la presencia de síntomas como la ictericia, ascitis, encefalopatía hepática, síndrome hepatorenal, hemorragia varicosa (5), el sangrado variceal esofágico gástrico y el carcinoma hepatocelular (7). Pueden surgir complicaciones que produzcan un aumento significativo de la mortalidad. Estas pueden ser hipertensión portal, inflamación sistémica y la insuficiencia hepática. (1) Además, en el avance de la fibrosis hepática y la cirrosis intervienen diversos tipos de células, citoquinas y miARNs (Figura 1). Se produce una activación de las células estrelladas hepáticas (HSCs), constituyendo un evento fundamental en el proceso de fibrosis junto con otras células conocidas como fibroblastos portales, fibrocitos y miofibroblastos derivados de la médula ósea y productoras de matriz (3). La pérdida de fenestraciones y la capilarización de las células sinusoidales, el endotelio hepático, implica la pérdida parcial de sus funciones, contribuyendo también a la disfunción hepática en la cirrosis. Por otro lado, las células de Kupffer, macrófagos residentes del hígado, favorecen la muerte de los hepatocitos y estimulan la activación de las HSCs. Esta situación se convierte en un ciclo de apoptosis y regeneración celular que se da repetidamente y que contribuye a la patogénesis propia de la cirrosis. (2)

En cuanto al diagnóstico de la cirrosis, esta se diagnostica con antecedentes, examen físico y pruebas no invasivas (8) que incluyen una evaluación inicial en la que se realizan serologías para detectar hepatitis viral, análisis de ferritina, saturación de transferrina, ultrasonografía abdominal, un conteo sanguíneo completo, pruebas de función hepática y una histología a partir de una biopsia de hígado (6). Se pueden realizar pruebas adicionales, pero estas están determinadas por la demografía y factores de riesgo. Las pruebas más comunes para detectar la fibrosis mediante suero y ultrasonido son: la puntuación del índice de relación entre la aspartato transaminasa y plaquetas, FibroTest/FibroSure, puntuación de fibrosis hepática grasa no alcohólica, ecografía estándar y elastografía transitoria. (4)

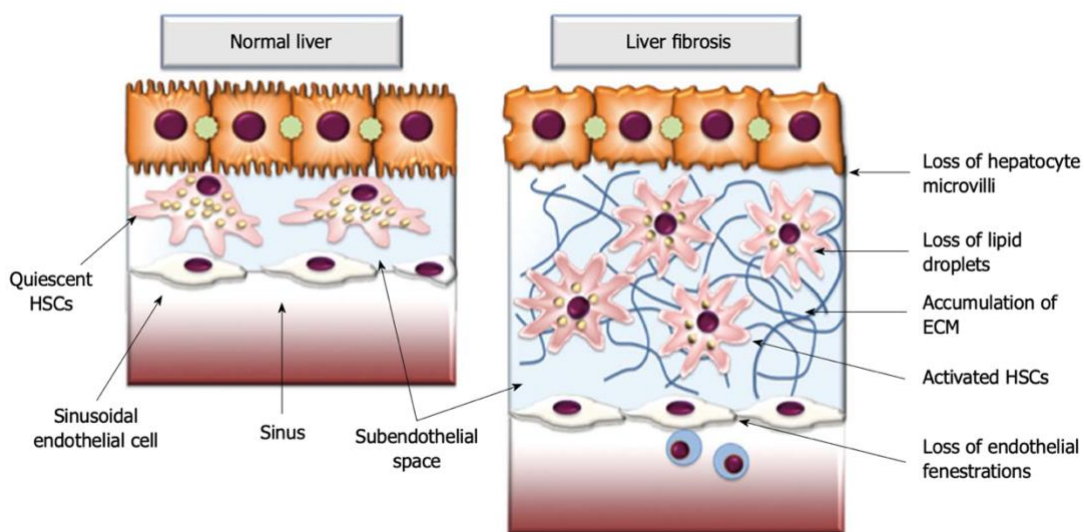


Figura 1. Proceso celular llevado a cabo en dos escenarios, el hígado sano y el hígado enfermo. La acumulación de matriz extracelular en el espacio subendotelial es producida por las células estrelladas hepáticas que se encontraban en estado quiescente, lo que conduce a la pérdida de microvellosidades de los hepatocitos y a la desaparición de las fenestraciones endoteliales. Estos cambios afectan al transporte de solutos desde el sinusoides hasta los hepatocitos, contribuyendo aún más al daño hepatocelular. ECM: Extracellular matrix; HSCs: Hepatic stellate cells. (3)

1.2 Sistema inmunitario hepático

En cuanto al sistema inmunitario hepático, el hígado es un órgano que exhibe tolerancia inmunológica de una forma única debido a que se encuentra altamente expuesto a antígenos circulantes y endotoxinas bacterianas provenientes de la microbiota intestinal a través de la vena porta (9). Este órgano constituye un lugar de actividad inmunológica compleja orquestada por diversos tipos celulares del sistema inmune, así como poblaciones celulares no hematopoyéticas (10). Entre los tipos celulares del sistema inmune hepático se encuentran macrófagos derivados de monocitos o las células linfoides innatas (NK, NKT, células T $\gamma\delta$ y las células T invariantes asociadas a la mucosa (MAIT)) (11). Estas actúan manteniendo la homeostasis hepática y la progresión de enfermedades hepáticas y cáncer (11). Asimismo, se incluyen células del sistema inmune que se encuentran en la circulación y se dirigen al hígado como son neutrófilos, células dendríticas (DCs) y linfocitos T y B. Sumado a esto, otras células presentes en el hígado no hematopoyéticas juegan un papel clave en la respuesta inflamatoria también y se clasifican como células no parenquimales (NPCs) siendo las células estrelladas hepáticas (HSCs), células de Kupffer (KCs) y otras NPCs (células endoteliales del sinusoides hepático (LSECs) y células biliares) las más relevantes (11) (Figura 2). Cabe destacar en el ámbito de la tolerancia que caracteriza al hígado el papel de las KCs y las LSECs. Estas son imprescindibles debido al papel de barrera

desempeñado por el hígado, así como su habilidad para eliminar de la sangre tanto patógenos como productos alimenticios procedentes del intestino. Además, también participan en la eliminación de diversos productos de degradación que circulan por la sangre como son células dañadas y toxinas (12).

Añadido a las células mencionadas anteriormente, también contribuyen a la tolerancia excepcional del hígado las interacciones entre las células presentadoras de antígeno (APCs) residentes en el hígado y los linfocitos que circulan por el bajo flujo sanguíneo en los sinusoides hepáticos (12) determinando así la tolerancia hepática. (Figura 3)

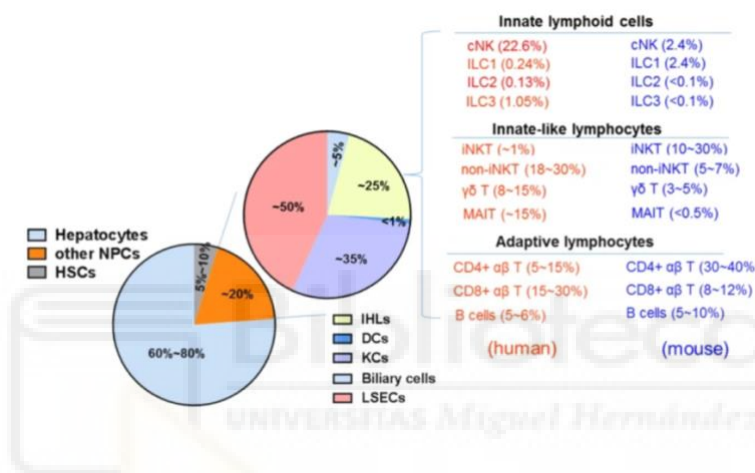


Figura 2. Composición celular del hígado sano en adultos. El hígado está compuesto por hepatocitos parenquimales y células no parenquimales (NPCs), incluyendo células estrelladas hepáticas (HSCs) y otras NPCs (KCs, LSECs, DCs, células biliares e IHLs). Las IHLs se clasifican en tres grupos: células linfoides innatas, linfocitos similares a los innatos y linfocitos adaptativos. Los números muestran la proporción estimada de cada población. (11)

Como es de esperar, durante la enfermedad hepática se dan lugar numerosos cambios en estos componentes celulares del sistema inmunitario. Concretamente, ocurre una activación y transdiferenciación permanente de las HSCs que se diferencia en dos fases, la inicial y la proliferativa (13). La inicial se caracteriza por productos de las células hepáticas, activación de las células de Kupffer juntamente con las células endoteliales y un aumento de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) presentes en el contexto hepático. La proliferativa se caracteriza principalmente por el desarrollo de fibrosis, proceso provocado por la síntesis por parte de estas células de mediadores proinflamatorios y quimiotácticos (13) que permiten el reclutamiento de macrófagos derivados de monocitos, células que migran al tejido hepático y llevan a cabo la activación de células endoteliales residentes que refuerzan el entorno profibrogénico y la preservación de las HSCs activadas. Cabe destacar dos citocinas que participan en la activación

y proliferación de las HSCs, estas son el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Todos estos factores contribuyen a la acumulación de matriz extracelular en el espacio extracelular (13), sumado a que las enzimas que degradan la matriz extracelular como las metaloproteinasas de matriz (MMP) producidas por las HSCs y otros efectores proinflamatorios participan en el reemplazo de la matriz extracelular normal por una matriz alterada (13). Todo este conjunto de sucesos colabora en los procesos de fibrogénesis, proliferación de hepatocitos y carcinogénesis (13).

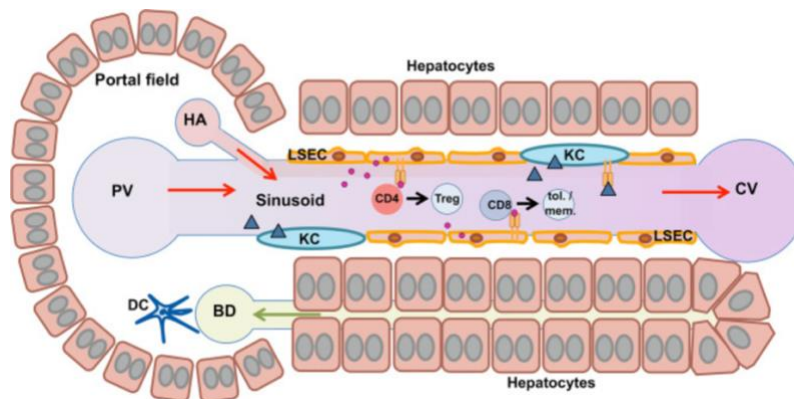


Figura 3. Células presentadoras de antígenos en el hígado en el entorno anatómico. Los sinusoides hepáticos están recubiertos por las células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSECs). Estas, al igual que las KCs, presentan los antígenos recolectados a los linfocitos y estos se diferencian a linfocitos con un fenotipo antiinflamatorio como son los linfocitos T reguladores (T_{reg}) en homeostasis. (12)

1.3 Lectinas tipo C

Entre la diversidad de moléculas que juegan un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad hepática, los receptores de lectina tipo C (CLRs) son especialmente destacados. Estos constituyen una familia de receptores de unión a ligando a menudo dependientes de Ca^{+2} (15), expresados principalmente en células mieloides (14) (15) como macrófagos y DCs (15), y que reconocen a glicanos mediante un dominio de reconocimiento de carbohidratos (15). Estos receptores reconocen tanto patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) (15) por lo que su papel en la respuesta inmunitaria es destacable. La activación de estos receptores produce una cascada de señalización que acaba en la síntesis de mediadores inflamatorios, entre otros procesos, dando lugar a la respuesta inflamatoria.

Estructuralmente, los CLRs mieloides están compuestos por uno o varios dominios de lectina tipo C (CTLD) y una región de cuello (stalk). Ambos elementos forman el dominio extracelular, junto

con un dominio transmembrana y una cola intracelular (15). Existen diversos grupos de CLR que se diferencian en sus dominios de unión a carbohidratos y Ca^{+2} y algunos poseen dominios adicionales (15).

La propiedad que caracteriza a las lectinas tipo C de membrana es su unión a diversos ligandos (PAMPs y DAMPs tanto de patógenos como de autoantígenos (15)) a través de sus dominios CTLD sumado a su habilidad para mediar la endo-/fagocitosis (15). Sin embargo, estos receptores no interactúan únicamente con glicanos, sino también con glicoproteínas y glicolípidos de otras células y estructuras cristalinas (15). La unión de estos receptores con sus ligandos desencadena funciones efectoras de gran importancia como el procesamiento del antígeno al conducir la carga antigénica hacia la vía lisosomal y así promover la presentación del antígeno (15). Además, promueven la síntesis de citocinas proinflamatorias como $TNF-\alpha$, activando así respuestas inflamatorias y antimicrobianas en fagocitos (16). Cabe destacar que las lectinas de tipo C también se pueden secretar a la sangre con el objetivo de opsonizar patógenos y su consiguiente fagocitosis por células del sistema inmune (16).

Como se ha mencionado anteriormente, existen múltiples familias de las lectinas de tipo C, que se diferencian en función de su estructura. Cabe destacar algunos ejemplos conocidos de lectinas tipo C como Dectin-1 (*CLEC7A*), esta se expresa mayormente en macrófagos mieloides, DCs y neutrófilos (16); Dectin-2 (*CLEC6A*), relacionada con la respuesta inmune antifúngica y DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Nonintegrin, *CLEC4L*), relacionada con la interacción con una amplia gama de patógenos (16). Entre estas lectinas de tipo C, una de las más relevantes en el caso del hígado es LSECtin (Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin, *CLEC4G*), ya que esta está relacionada con la desregulación de la respuesta inmune durante la enfermedad hepática. Se expresa, casi exclusivamente, en las células endoteliales del hígado que constituyen del 15 al 20% de las células hepáticas y suponen una superficie significativa de interacción con los leucocitos reclutados. (17).

1.4 LSECtin

LSECtin, es una lectina de tipo C codificada por el gen *CLEC4G* (Figura 4). Esta se expresa en las células endoteliales del hígado, concretamente, las que recubren los sinusoides hepáticos y son conocidas como células endoteliales sinusoidales del hígado (18) (17), en ganglios linfáticos y, minoritariamente, macrófagos residentes del hígado, es decir, KCs (16)(22)(23). Las LSECs revisten los canales capilares sinusoidales de bajo flujo del hígado y constituyen la población celular no parenquimatosa más abundante de este órgano (18). Además, estas destacan por sus funciones fisiológicas y en gran parte por su función inmunológica incluyendo la endocitosis, reclutamiento de diferentes leucocitos al hígado, presentación de antígenos (18) y contribuyendo

al mantenimiento de la quiescencia de las HSCs (21). Por estas características, las LSECs promueven la tolerancia inmune en el hígado en condiciones fisiológicas al estar involucradas en el transporte de moléculas y eliminación de residuos metabólicos (19). A pesar de generar tolerancia en el hígado, durante la enfermedad hepática aguda y crónica pueden inducir la respuesta inmune mediante la presentación de antígenos (19) y además promover la angiogénesis y vasoconstricción (21). En conclusión, tienen un papel regulador estableciendo el equilibrio entre la regeneración y la fibrosis hepática (19).

LSECTin se considera un receptor del sistema inmunitario innato con diversas funciones biológicas incluyendo el reconocimiento e internalización de glicanos (como manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc) y fucosa)(25), participa en la adhesión celular, actúa durante la infección por patógenos ya que reconoce PAMPs y DAMPs, interacciona con el virus del Ébola interviniendo en la respuesta inmune provocada por la infección de este virus (16) y con la proteína *spike*, que forma parte del coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo grave (SARS) (20). Además, existen estudios que demuestran que LSECTin reconoce CD44 presente en células T activadas endógenas (23) por lo que no sólo reconoce a patógenos, sino también participa en la regulación de la respuesta inmune. Concretamente, en la regulación negativa de la respuesta inflamatoria producida por linfocitos T activados. Esto se demostró en ratones que padecían una enfermedad hepática aguda conducida por linfocitos T en la que la ausencia de LSECTin produjo el avance de la enfermedad acelerado mientras que la administración exógena de esta lectina llevó finalmente a una mejoría de la enfermedad (24). Adicionalmente, tal y como mencionaba anteriormente, LSECTin es capaz de unirse a linfocitos T activados y más recientemente se ha demostrado que también es capaz de interactuar con linfocitos NK controlando el número de estos durante la enfermedad hepática (25). Estas uniones se dan gracias al DRC presente en LSECTin (*Figura 4*).

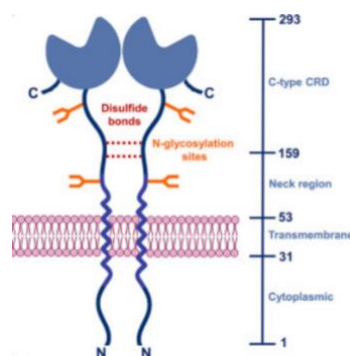


Figura 4. Modelo estructural de LSECTin. La estructura de la proteína transmembrana se basa en un dímero formado por dos monómeros los cuales constan de 293 aminoácidos. En la figura se puede observar el dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) el cual permite su unión a diversos ligandos dependiente de Ca^{+2} , tanto los que proceden de patógenos como los propios. (20)

En conclusión, por todas estas razones LSECtin se considera una proteína con un papel inmunomodulador fundamental, participando en diferentes vías de respuesta ante diversos virus, patógenos y enfermedades hepáticas.

1.5 Linfocitos en la enfermedad hepática

Durante las enfermedades hepáticas crónicas como la enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD), la hepatitis viral o la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) (26), las cuales tienen en común la condición inflamatoria persistente y la posterior fibrosis hepática, se observa una respuesta en la que contribuyen y cooperan diversos tipos celulares, mediadores inflamatorios y factores extrahepáticos (como metabolitos microbianos) a la muerte de los hepatocitos. Entre las células del sistema inmune que participan durante la enfermedad hepática se encuentran los KCs y macrófagos derivados de monocitos (MoMFs). Estos contribuyen en el proceso de inflamación tras el daño y en la resolución de la fibrosis. Además, estudios recientes han demostrado que las DCs también contribuyen a la inflamación y fibrosis del hígado (26). Sin embargo, se ha evidenciado que estas limitan la inflamación y fibrogénesis en modelos murinos (26). Más células involucradas son los neutrófilos, los cuales se infiltran en el tejido, producen citocinas proinflamatorias, activan a las KCs y reclutan otras células inmunitarias (26). Sumado a estas células, existe una infiltración de mastocitos, los cuales tienen un papel predominante en alergias, sin embargo, su aumento está relacionado también con mayor inflamación y fibrosis (26).

En cuanto a las células de la inmunidad adaptativa, están presentes en el hígado en baja proporción, no obstante, se ha demostrado que producen citoquinas proinflamatorias durante la enfermedad hepática (26). En cuanto a los linfocitos T, concretamente, los linfocitos T helper (T_H) tienen gran relevancia en la fibrosis hepática, sobre todo los T_{H2} y T_{H17} . Los linfocitos T_{H2} producen las citocinas interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13) las cuales se caracterizan por favorecer la fibrogénesis, activando los fibroblastos y promoviendo la remodelación de la matriz extracelular (26). Los linfocitos T_{H17} propician la fibrosis hepática sintetizando las citocinas interleucina-17 (IL-17) e interleucina-22 (IL-22). Estas citoquinas promueven la síntesis de factor de crecimiento transformante- β (TGF- β 1) por parte de las HSCs en el hígado lo que promueve la activación de estas y la consecuente formación de colágeno y citocinas proinflamatorias tanto por estas células como por las KCs (Figura 5) (26). En este contexto cabe destacar a los linfocitos T reguladores (T_{reg}) ya que estos producen interleucina-10 (IL-10) que tiene un papel antiinflamatorio, inhibiendo la síntesis de colágeno, la activación de las KCs y restringiendo la producción de IL-17 por los linfocitos T_{H17} (26). Todo ello evita la activación de las HSCs, lo que conlleva a que la inflamación no lleve a una situación de fibrosis hepática. No obstante, los

linfocitos T_{reg} pueden entorpecer la resolución de la fibrosis hepática ya que inhiben la síntesis de metaloproteinasas de matriz (MMP) por las KCs, favoreciendo la presencia de fibrosis (26).

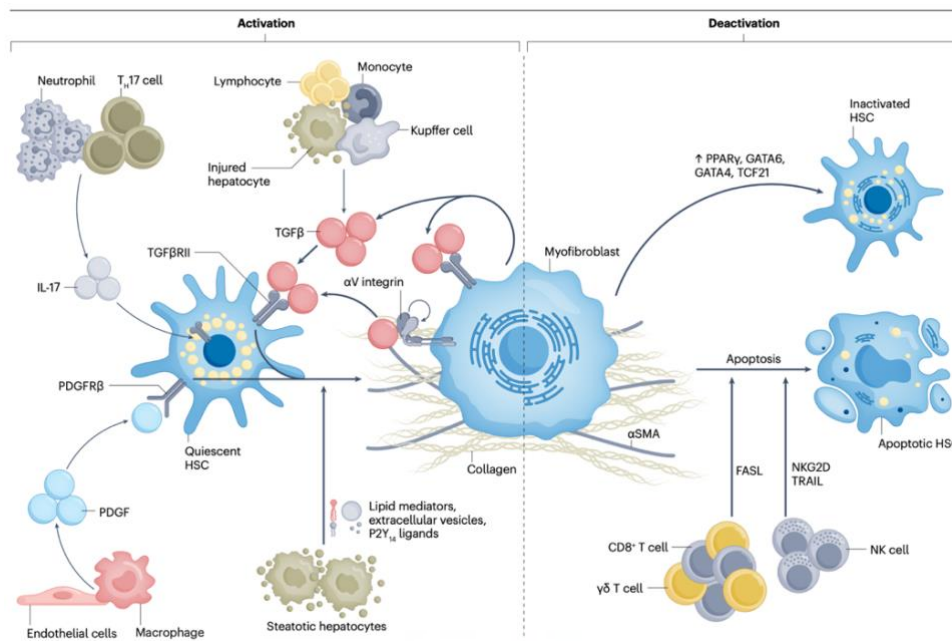


Figura 5. Respuesta celular coordinada que lleva tanto a la producción de fibrosis en el hígado como a la resolución de esta. Se observa como las HSCs quiescentes presentes en el parénquima hepático reconocen mediadores proinflamatorios producidos por diversos tipos de células inmunes como los linfocitos T_H17 , KCs, monocitos infiltrados y células no inmunes como son las células endoteliales. Esto produce la activación de las HSCs y la subsiguiente producción de fibras de colágeno I. Por otra parte, se observa la resolución de la fibrosis hepática gracias a la inactivación de las HSCs y apoptosis de estas. (26)

De hecho, es conocida la importancia del balance de células T_H17/ T_{reg} en la progresión de enfermedades de carácter inflamatorio. Este balance influye en el proceso de sustitución del tejido hepático y cicatrización lo que conlleva al padecimiento de cirrosis y fibrosis hepática (27). Como he comentado anteriormente, los linfocitos T_{reg} impulsan la fibrosis hepática al inhibir la síntesis de MMP (26) (27) y los linfocitos T_H17 promueven la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1, factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) por parte de las células endoteliales, fibroblastos y queratinocitos (27) para promover la infiltración de células inmunitarias al tejido hepático.

Se pudo observar en pacientes con cirrosis grave una mayor proporción de linfocitos T_{reg} en circulación, no obstante, también se percibió una disminución del balance T_H17/ T_{reg} relacionado con el avance de la enfermedad (27). Concretamente, la presencia abundante de las citocinas IL-6 y $TGF-\beta$ estimulan la diferenciación de linfocitos T_H en linfocitos T_H17 . Todo ello contribuye al

riesgo de desarrollar un carcinoma hepatocelular (HCC) (27). En conclusión, el balance de células T_{H17} / T_{reg} en el hígado es fundamental tanto en homeostasis como en enfermedad. En homeostasis, el equilibrio favorece respuestas inmunes eficaces e impide el daño tisular. En cambio, durante la enfermedad, la actuación de linfocitos T_{H17} puede contribuir a la condición inflamatoria de la enfermedad y a la progresión de esta.



2. ANTECEDENTES

El laboratorio de inmunología hepática e intestinal en los últimos años ha dirigido su actividad en investigar la respuesta inflamatoria producida en diferentes órganos del sistema digestivo como son el hígado e intestino. Concretamente, en el hígado se han centrado en el papel de la lectina LSECtin del sistema inmunitario innato en modelos murinos cirróticos y su pérdida durante la enfermedad hepática crónica. De hecho, recientemente han observado que en pacientes cirróticos aumenta el número de células T_H17 y T_{reg} en el hígado, siendo mayor el aumento de las primeras y coincidiendo con la disminución de LSECtin, ya que esta limita la síntesis y liberación de moléculas con efecto proinflamatorio (28). En el artículo *Cirrhosis-downregulated LSECtin can be retrieved by cytokines, shifts the TLR-induced LSECs secretome and correlates with the hepatic Th response*, se evidencia, además como la expresión de la proteína LSECtin se ve reducida en los tejidos hepáticos de modelos cirróticos. Por otro lado, se observó una restricción de la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y CCL2 cuando LSECtin influía en la respuesta generada en los receptores tipo *toll* (TLRs). En cambio, se produjo un aumento de la síntesis de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y CCL4 cuando se expresaba LSECtin en las LSECs.

Tras los experimentos realizados, con el fin de profundizar en el estudio de la función de LSECtin, el laboratorio generó un modelo murino de sobreexpresión o *knock-in* de *Clec4g*. Este modelo transgénico se ha obtenido tras la inserción aleatoria del DNA complementario (cDNA) del gen de interés (*Clec4g*) y bajo el control de un promotor ubicuo de citomegalovirus (CMV) englobado en un vector e insertado en el genoma del ratón. Para este proyecto de TFG, se utilizarán muestras obtenidas de estos ratones de sobreexpresión, extraídas en el laboratorio durante el verano de 2023 en una estancia tutelada.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal del proyecto está relacionado con la gran relevancia que presenta la lectina LSECtin en el contexto de las enfermedades hepáticas crónicas. Esta proteína, al tener un papel inmunomodulador en el hígado, puede desempeñar una función relevante durante la respuesta inflamatoria en ratones. Los objetivos establecidos son:

- ◇ Comparar el incremento o descenso de los marcadores de daño hepático a nivel transcripcional, postranscripcional y su posible relación con la sobreexpresión de LSECtin.
- ◇ Observar el potencial inmunomodulador de LSECtin comparando el daño hepático en ratones cirróticos y ratones cirróticos con sobreexpresión de LSECtin atendiendo al aumento de poblaciones de linfocitos proinflamatorios.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ratones de experimentación

Para llevar a cabo el protocolo de inducción de cirrosis hepática se utilizaron ratones macho C57Bl6/J de 6 a 8 semanas (*Harlan Laboratories en Barcelona, España*) además de ratones macho *knock-in* de sobreexpresión de *Clec4g* (*Transgenic Core Facility, University of Copenhagen*). Estos fueron obtenidos mediante la introducción del *cDNA* de *Clec4g* en un plásmido que contenía un sitio de clonación múltiple (MCS), dos marcadores de resistencia a dos antibióticos, uno a la ampicilina y otro a la neomicina, una secuencia señal de poliA y un promotor ubicuo de citomegalovirus (CMV). Con este plásmido se transformaron bacterias DH5 α y posteriormente se liberó la secuencia CMV-*Clec4g* mediante digestión con enzimas de restricción. Finalmente, se introdujo esta secuencia en un buffer de microinyección (5 mM de Tris, 0.1 mM de EDTA, pH de 7.4). El buffer junto con el DNA se inyectó en el pronúcleo de cigotos provenientes de ratonas C57BL/6NR y estos se sembraron y posteriormente se transfirieron a otras ratonas hembras.

4.2 Inducción de la cirrosis en ratones de experimentación

El procedimiento de inducción de cirrosis consiste en el tratamiento de los ratones durante 4 semanas con fenobarbital (inductor de la actividad hepática) durante 4 semanas, seguido de 12 semanas con un compuesto hepatotóxico (tetracloruro de carbono, CCl₄), diluido en aceite de oliva mediante sondaje intragástrico. Todos los ratones fueron alimentados con pienso estándar para roedores, además en condiciones de temperatura y humedad de 21 \pm 2°C y 60 \pm 10% respectivamente. A su vez, estuvieron sujetos a ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas.

Durante el procedimiento, los animales fueron atendidos según los cuidados incluidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Este estudio ha sido aceptado por el Comité de investigación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante, España) bajo el código de identificación UMH-HA-RFG-01-19. Este protocolo fue llevado a cabo por Isabel Gómez Hurtado, investigadora y veterinaria del Grupo además de responsable del control y manejo de los animales.

4.3 Laparotomía y perfusión hepática de los animales

Los animales fueron anestesiados con isoflurano inhalado (*IsoFlo, Esteve*) y apoyados sobre una superficie correctamente esterilizada. Seguidamente, se desinfectó el vientre abdominal del animal para llevar a cabo la laparotomía. Este procedimiento consiste en realizar una incisión en el vientre

abdominal del ratón continuando la línea alba hasta el nivel del diafragma. Una vez realizada la laparotomía, se inyectaron 0.1 ml de heparina al 1% (*Laboratorios ROVI, S.A*) por la vena cava inferior para así prevenir la coagulación de la sangre en el tejido hepático. Posteriormente, se siguió con la canulación de la misma vena y subsiguiente perfusión hepática de los animales con PBS a un flujo de 4 ml/minuto utilizando una bomba peristáltica (*Harvard Apparatus*). Todo este proceso fue llevado a cabo sólo por Isabel Gómez Hurtado y otros integrantes del laboratorio que fueron los que manejaron los ratones.

Una vez finalizada la perfusión, se extrajeron los hígados de los animales, así como otros órganos de interés. Seguidamente, se fragmentaron los hígados mediante el uso de un bisturí y unas pinzas de laboratorio, ambos esterilizados. El material se dividió para diversas técnicas de histología y biología celular. Para realizar el trabajo, se utilizaron muestras de hígado provenientes de estos ratones.

4.4 IHC (Inmunohistoquímica) e IHF (Inmunohistoquímica fluorescente) en cortes de parafina

Uno de los fragmentos de los hígados de los ratones tras la laparotomía se incluye en un buffer neutro de formalina al 10% (*Sigma Aldrich*) y se incuban durante 24 horas. Tras la incubación se lleva a cabo la deshidratación de los tejidos con concentraciones crecientes de etanol y finalmente se integran en parafina. Tras obtener los bloques de parafina con el tejido incluido, se procede a realizar cortes de los bloques en un microtomo de parafina (*Leica*) obteniéndose segmentos de 5 µm de grosor. Los segmentos se colocaron sobre portaobjetos de cristal y posteriormente se llevó a cabo el desparafinado en una placa calefactora a una temperatura de 75°C. Seguidamente, para eliminar completamente la parafina se incluyeron los portaobjetos en soluciones con xylol y se rehidrataron con soluciones con concentración decreciente de etanol.

Para el desenmascarado (retrival) del antígeno, los portaobjetos se pusieron en una cesta de tinción, después en una caja de plástico a la que se le añadió un buffer de citrato de sodio 10 mM con un pH 6 y se hirvieron durante 20 min. A continuación, para la IHC, se llevó a cabo el bloqueo de la peroxidasa endógena. Los portaobjetos se pusieron en una cubeta de tinción coplin a la que se le adicionó una disolución de peróxido de hidrógeno al 1,5 % seguido de un bloqueo completo con FBS-BSA durante 1 hora. Posteriormente, se realizó el bloqueo de la avidina y biotina endógenas mediante el kit comercial (*Abcam*). Tras el bloqueo, se incubaron los portaobjetos con los anticuerpos primarios (*Tabla 1*) toda la noche a 4°C. Continuando con el protocolo, se volvieron a incubar los portaobjetos, pero esta vez con los anticuerpos secundarios biotinilados correspondientes durante 1 hora y después con el sistema ABC (*Thermo Scientific, Rockford, IL*). Después, se procede a realizar el revelado con la ayuda del cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (*Vector Labs*). Tras el revelado, se realizó el contrateñido sumergiendo los portaobjetos en

una solución de hematoxilina (PanReac), seguido de HCl al 0,3% (Sigma Aldrich), agua del grifo y NH₄OH al 0,3% (Thermo Fisher Scientific) para deshidratarlos posteriormente en etanol. Finalmente, se cubrieron los portaobjetos con cubreobjetos gracias al montaje con *Eukitt* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Las imágenes de las inmunohistoquímicas fueron obtenidas gracias al microscopio *Leica DMR*.

En el caso de la IHF, tras el desenmascarado del antígeno se procede a realizar el bloqueo con FBS-BSA durante 1 hora. A continuación, se incuban los portaobjetos con los anticuerpos primarios (*Tabla 1*) toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizan lavados de los portaobjetos de 3, 5 y 10 minutos en PBS y se incuban posteriormente con el anticuerpo secundario y DAPI, utilizado para teñir los núcleos a una concentración de 1:500 (*Tabla 1*) que se encuentra unido a un fluoróforo durante 1 hora. Tras la incubación, se cubren los portaobjetos con cubreobjetos gracias al compuesto añadido moviol (Sigma Aldrich) y se dejan secar en vertical.

Anticuerpo	Especie	Concentración	Almacenamiento	Proveedor
PRIMARIOS				
ACTA2	Conejo	1:250	-20	Cell Signaling
COL1A1	Conejo	1:150	-20	Sigma-Aldrich
VIMENTINA	Conejo	1:200	-20	Cell Signaling
CD4	Cabra	1:200	4	R&D systems
F4/80	Conejo	1:300	-20	Cell Signaling
CD45	Cabra	1:300	4	R&D systems
CD8	Conejo	1:200	-20	Cell Signaling
FOXP3	Rata	1:250	4	Thermo Fisher Scientific
ROR γ T	Rata	1:250	4	Thermo Fisher Scientific
SECUNDARIOS				
488 anti-rabbit	Burro	1:250	4	Biolegend
594 anti-rabbit	Burro	1:250	4	Thermo Fisher Scientific
647 anti-rabbit	Burro	1:250	-20	Abcam
488 anti-goat	Burro	1:250	-20	Abcam
647 anti-goat	Burro	1:250	4	Thermo Fisher Scientific
594 anti-rat	Burro	1:250	-20	Abcam
647 anti-rat	Burro	1:250	-20	Abcam
Biotin anti-rat	Burro	1:250	4	Vector Laboratories
Biotin anti-rabbit	Burro	1:250	4	Vector Laboratories

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios, especie de procedencia, concentración utilizada, temperatura de almacenamiento y proveedores de los que provienen

4.5 Extracción y cuantificación de ARN

Se extrajo ARN mediante el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) de las muestras de hígado de ratones tanto jóvenes cirróticos como jóvenes *knock-in*. Para ello, se obtuvo un fragmento de hígado congelado a -80°C y se siguieron las instrucciones del fabricante.

En cuanto a la cuantificación del ARN, se realizó mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Una vez sabida la concentración de ARN, se elaboraron alícuotas con una concentración final de 5 ng/μl para llevar a cabo la RT-qPCR.

4.6 RT-qPCR

Las alícuotas de ARN preparadas se utilizaron para evaluar la expresión de diferentes genes mediante el uso del kit *qScript One-Step SYBR Green quantitative real-time PCR Kit* (Quanta BioScience, Gaithersburg, MD) en placas de PCR multipocillo. Para llevar a cabo la RT-qPCR, de acuerdo con el protocolo del proveedor, se prepararon distintas MasterMix en función de los genes a estudio y estas incluían el compuesto SYBR Green, el agua libre de ribonucleasas para evitar la degradación del ARN, los cebadores o *primers* adecuados (Tabla 2) y la enzima RT-Polimerasa. Además, se utilizó el sistema *CFX Connect Real-time PCR* (Bio-Rad, Hercules, CA) para llevar a cabo la caracterización de la expresión génica. Los valores obtenidos tras la PCR se normalizaron mediante el gen de la β-actina que actuaba como gen *housekeeping*. Concluyendo, los valores umbral de ciclos (Ct) adquiridos que corresponden con el ciclo en el que la cantidad de ARN en la muestra cruza ese umbral fueron interpretados mediante el método relativo del ΔΔCt.

Gen	Secuencia (5'→3')	Proveedor
Timp1 F	CCA GAA CCG CAG TGA AGA GT	IDT DNA Technologies
Timp1 R	GAA ACA CTG TGC ACA CCC CA	IDT DNA Technologies
αSMA F	GTC CCA GAC ATC AGG GAG TAA	IDT DNA Technologies
αSMA R	TCG GAT ACT TCA GCG TCA GGA	IDT DNA Technologies
Mmp2 F	CCG AGG ACT ATG ACC GGG ATA	IDT DNA Technologies
Mmp2 R	CTT GTT GCC CAG GAA AGT GAA	IDT DNA Technologies
β-actin F	GCT CCG GCA TGT GCA AAG	IDT DNA Technologies
β-actin R	CCT TCT GAC CCA TTC CCA CC	IDT DNA Technologies
Col1a1 F	GTG TTC CCT ACT CAG CCG	IDT DNA Technologies
Col1a1 R	ACT CGA ACG GGA ATC CAT	IDT DNA Technologies
Col 3 F	TTC TGG TGG TCC TGG TAC	IDT DNA Technologies
Col 3 R	AGG AGA ACC ACT GTT GCC	IDT DNA Technologies
IL-6 F	CTC TGC AAG AGA CTT CCA TCC A	IDT DNA Technologies
IL-6 R	TGG AAA TTG GGG TAG GAA GGA C	IDT DNA Technologies
IL-10 F	GAG GCG CTG TCA TCG ATT TCT	IDT DNA Technologies

IL-10 R	GTT TTC AGG GAT GAA GCG GC	IDT DNA Technologies
IFN-γ F	CGG CAC AGT CAT TGA AAG CCT A	IDT DNA Technologies
IFN-γ R	GTT GCT GAT GGC CTG ATT GTC	IDT DNA Technologies
IL-17 F	GCT CCA GAA GGC CCT CAG A	IDT DNA Technologies
IL-17 R	CTT TCC CTC CGC ATT GAC A	IDT DNA Technologies

Tabla 2. Genes, los cuales representan marcadores de inflamación y fibrosis, utilizados en el estudio y las secuencias correspondientes de los cebadores, tanto forward como reverse.

4.7 Extracción y cuantificación de proteína

Se extrajo proteína de las muestras de hígado de ratones tanto jóvenes cirróticos como jóvenes *knock-in*. Para ello, se obtuvo un fragmento de hígado congelado a -80°C . Este se introdujo en buffer RIPA 1x (Thermo Fisher Scientific). Además del buffer, se añadió un inhibidor de proteasas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los tubos de ensayo fueron introducidos en un instrumento de segmentación por agitación intensa, *TissueLyser* (Qiagen, Hilden, Alemania). Tras finalizar, las muestras se pusieron en hielo para que no se produjera la desnaturalización de las proteínas y fueron centrifugadas posteriormente.

En cuanto a la cuantificación de las proteínas, esta se llevó a cabo mediante el uso de un kit comercial (*BioRad DC Protein Assay*). Este consiste en el uso de una placa multipocillo de 96 pocillos (BioRad) en la que se añadía una recta patrón de BSA (Sigma Aldrich) en concentraciones decrecientes por duplicado y las muestras de las proteínas. Posteriormente, se midió la absorbancia de la reacción, basada en el ensayo de Lowry, a una longitud de onda de 750 nm mediante el *Espectrofotómetro de microplacas Epoch*, Biotek. Tras la medición, se procedió a realizar alícuotas de las muestras de proteína para utilizarlas posteriormente en la técnica Western blot tras el análisis del archivo obtenido gracias al programa (*Gen5 TS 2.06*).

4.8 Western blot

Tras la cuantificación y realización de alícuotas de proteínas explicados anteriormente se llevó a cabo su evaluación mediante Western blot. Se prepararon alícuotas adicionales a partir de las realizadas anteriormente que contenían 25 μg de proteína para cada una de las muestras. La técnica Western blot fue llevada a cabo con el objetivo de obtener imágenes de quimioluminiscencia de las proteínas de interés (actina de músculo liso y colágeno I) mediante el uso del instrumento ChemiDoc (*BioRad, Hercules, CA*).

Para llevar a cabo la técnica, se prepararon geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El gel presentaba un grosor de 1,5 mm. Se elaboró el gel a partir del gel separador o *resolving gel* y el gel concentrador. Ambos geles se prepararon mezclando tampón Tris (Sigma Aldrich), SDS al 10% (Sigma Aldrich), TEMED (BioRad) y una disolución de acrilamida/bis al 30%

(BioRad) y persulfato de amonio (APS) (Serva). Posteriormente se llevó a cabo la carga del gel a partir de 20 µl de cada una de las alícuotas preparadas anteriormente que contenían las muestras de proteína, agua correspondiente y *loading buffer* en función de la concentración de las muestras de forma individual. Las muestras de 20 µl que se iban a cargar se sometieron a un calentamiento a 95°C en un termobloque durante 10 minutos. Durante este tiempo, se preparó la cubeta de electroforesis, llenándola de *Running Buffer 1x* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*) y se cargaron las muestras posteriormente.

Una vez transcurrido este tiempo, se llevó a cabo la transferencia de membrana, que en este caso es semiseca, mediante el instrumento *Trans-Blot Turbo Transfer System* (*BioRad*). Se prosiguió teniendo en cuenta el procedimiento proporcionado por el proveedor. Las membranas de transferencia (*BioRad*) se activaron a priori sumergiéndolas en metanol y después en *transfer buffer 5x*. Además, los *stacks* de papel (*BioRad*) también se sumergieron en *transfer buffer 1x*. Se procedió a montar el sándwich y se seleccionó el programa adecuado, *2 Gel-1,5 mm*.

Finalmente, se llevó a cabo el revelado de las membranas. Se pusieron las membranas en tubos Falcon de 50 ml que contenían buffer de bloqueo o *blocking buffer* (TBST 1x, BSA al 3% y azida al 10%) y se incubaron 1 hora en el rotor a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió a cada tubo el anticuerpo primario con la dilución adecuada (*Tabla 3*) y se incubó con este *overnight* a 4°C. Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se llevaron a cabo lavados rápidos de 5, 8 y 10 minutos con TBST. Tras los lavados, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario durante 1 hora (*Tabla 3*) en la dilución adecuada. A continuación, se realizaron lavados y se colocaron las membranas en tubos Falcon de 50 ml recubiertos con papel de plata los cuales incluían el buffer de revelado (*SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate, Thermo Scientific, NY*). Para llevar a cabo el revelado se utilizó el instrumento *ChemiDoc* (*BioRad, Hercules, CA*) y se adquirieron imágenes quimioluminiscentes de las membranas.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Proveedor
PRIMARIOS			
ACTA2	Conejo	1:1000	Cell Signaling
COL1A1	Conejo	1:1000	Sigma Aldrich
ACTIN	Ratón	1:10000	Sigma Aldrich
GADPH	Ratón	1:5000	MyBiosource
SECUNDARIOS			
HRP Anti-rabbit		1:3000	Boster Biological Technology
HRP Anti-mouse		1:3000	Santa Cruz Biotechnology

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para llevar a cabo los ensayos de Western blot, diluciones adecuadas y proveedores de cada uno de los anticuerpos. Las diluciones fueron preparadas a partir de los stocks de anticuerpos que estaban disponibles en el laboratorio.

4.9 Citometría de flujo

De los hígados de los ratones extraídos durante la laparotomía se separó un lóbulo y se digirió en un buffer con colagenasa I y DNAsa para obtener finalmente una suspensión celular. Con esta suspensión celular se llevó a cabo una centrifugación por gradiente de densidad para aislar los leucocitos del resto de la suspensión de células en percoll al 40%. Tras aislar los leucocitos del percoll y lavarlos, estos fueron estimulados con *GolgiPlug* (BD Biosciences), que además contienen inhibidores del transporte de vesículas, para que produjeran una gran cantidad de citocinas. Siguiendo con el protocolo, se realizó una tinción extracelular con un anticuerpo α CD3-PE (Thermo Fisher). Posteriormente se fijaron y permeabilizaron las células mediante un kit específico (Thermo Fisher) y tras esto se realizó una tinción intracelular durante toda la noche con el anticuerpo α IL-17-APC (Thermo Fisher). Al día siguiente se prepararon las células para la lectura en un sistema FACS Canto II (BD Biosciences) del servicio de ómicas del instituto de Neurociencias de Alicante y se analizaron los resultados con el programa FlowJo (BD Biosciences).

4.10 Análisis estadístico

Las variables continuas fueron expresadas como media \pm desviación estándar. La expresión de las proteínas de las inmunohistoquímicas y western blot se cuantificaron utilizando el software ImageJ (*ImageJ Software Inc., Wayne Rasband*). Además, la significancia estadística fue calculada a partir del análisis ANOVA del programa GraphPad Prism 8.0.2 (*GraphPad Software Inc., California, USA*) el cual comparaba tanto los valores dentro de un grupo como los valores entre grupos diferentes. Este programa se utilizó para el tratamiento de todos los datos y representaciones gráficas de los datos adquiridos de los ensayos y así facilitar la comprensión de los resultados. Los p-valores menores de 0.05 se consideraron significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Modelo murino *knock-in* de sobreexpresión de LSECtin, inducción de cirrosis y laparotomía

Con el objetivo de entender el papel de LSECtin durante la patología hepática, el laboratorio encargó un modelo murino de sobreexpresión del gen de interés mediante la introducción del *cDNA* de *Clec4g* bajo el control del promotor ubicuo de citomegalovirus (CMV) a través de microinyección de cigotos.

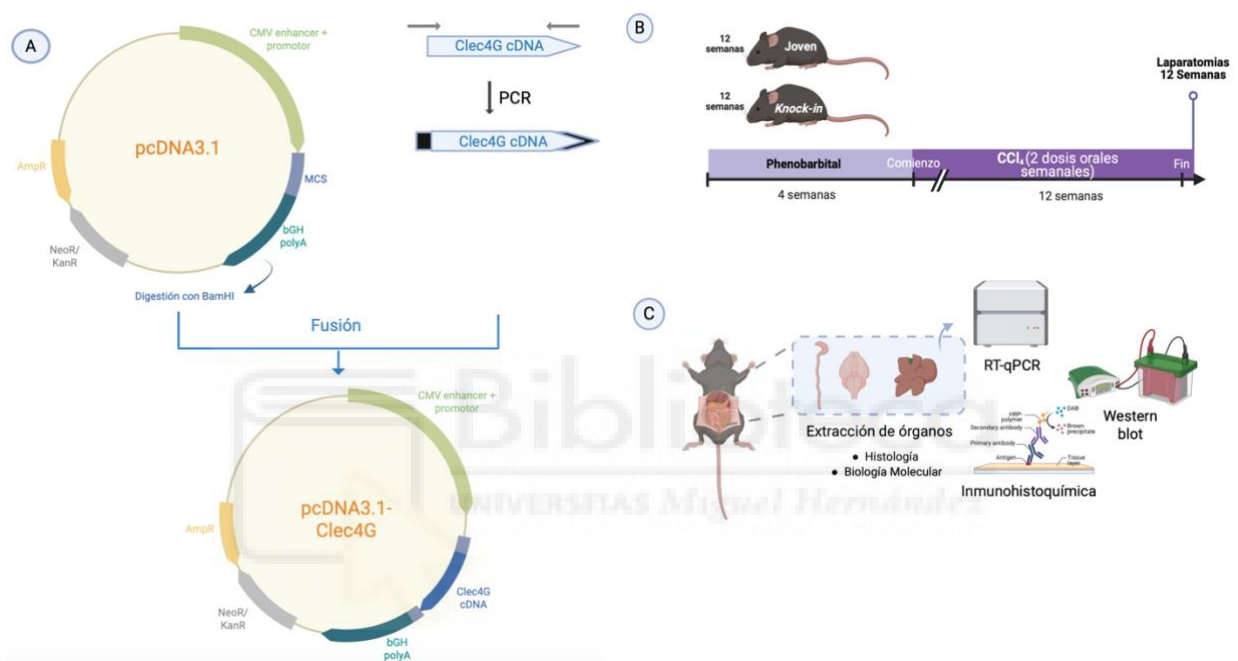


Figura 6. Modelo murino de sobreexpresión de LSECtin. A: inserción del gen *Clec4g* en el MCS y la obtención del vector. B: protocolo de inducción de cirrosis de los ratones. C: laparotomía con la que se extraen diferentes órganos y las posteriores técnicas de biología molecular.

La figura 6A corresponde con la inserción del *cDNA* de *Clec4g* en el MCS y la obtención del vector que se insertará aleatoriamente en el genoma de los cigotos que se implantarán posteriormente. Una vez establecida una colonia de estos animales y comprobar su total viabilidad, se sometieron a un protocolo de inducción de cirrosis junto con ratones *wild type* (WT) en el que fueron tratados con fenobarbital durante 4 semanas y posteriormente con 2 dosis orales semanales de tetracloruro de carbono durante 12 semanas (fig. 6B). Para comprobar los efectos de la inducción de cirrosis, se realizó una laparotomía con la que se extraen diferentes órganos, aunque este proyecto se centrará únicamente en los hígados. Estos tejidos se procesaron y obtuvieron muestras para llevar a cabo las posteriores técnicas de biología molecular como son RT-qPCR, Western blot e Inmunohistoquímica, tanto colorimétrica como fluorescente (fig 6C).

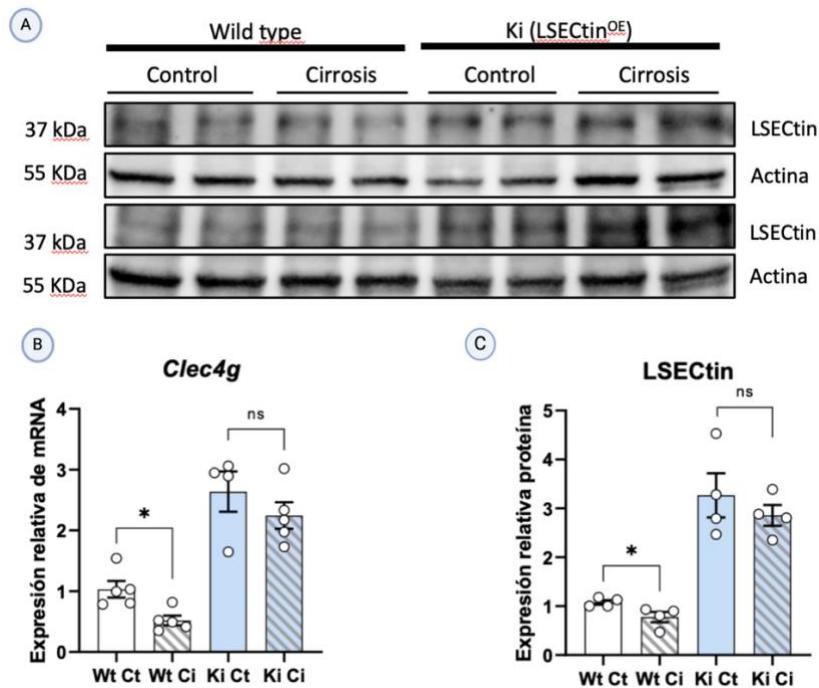


Figura 7. Expresión de LSECtin en los animales de sobreexpresión. A: expresión de LSECtin por Western blot en hígado total. B: cuantificación de la expresión de mRNA del gen *Clec4g* de las cuatro condiciones, control WT, cirrótico WT, knock-in control y knock-in cirrótico. C: Cuantificación de la expresión a nivel postraduccional del gen *Clec4g* de las cuatro condiciones.

Dentro de la caracterización hepática inicial, se puede observar que existe una mayor expresión del gen *Clec4g* en los ratones *knock-in* control y *knock-in* cirróticos, mientras que la expresión de este es menor en los ratones WT, especialmente en los cirróticos donde existe una represión (fig 7B). Además, a nivel postraduccional también se observa una mayor expresión de LSECtin, codificada por *Clec4g*, en los ratones *knock-in* control y *knock-in* cirróticos, mientras que la expresión de esta proteína se encuentra disminuida específicamente en los ratones (WT) cirróticos (fig 7C) (fig 7A). Con estos resultados, podemos concluir que los ratones a los que se les había insertado el vector recombinante (fig 6A) presentan una sobreexpresión del gen *Clec4g* que no baja durante la cirrosis como en el caso de los WT.

5.2 Reclutamiento de leucocitos e inflamación

En primer lugar quisimos estudiar la relación de la sobreexpresión de LSECtin con distintos marcadores de leucocitos que estarían involucrados de manera directa en la inflamación. Ambos tipos de marcadores influyen de manera significativa en la progresión de la cirrosis.

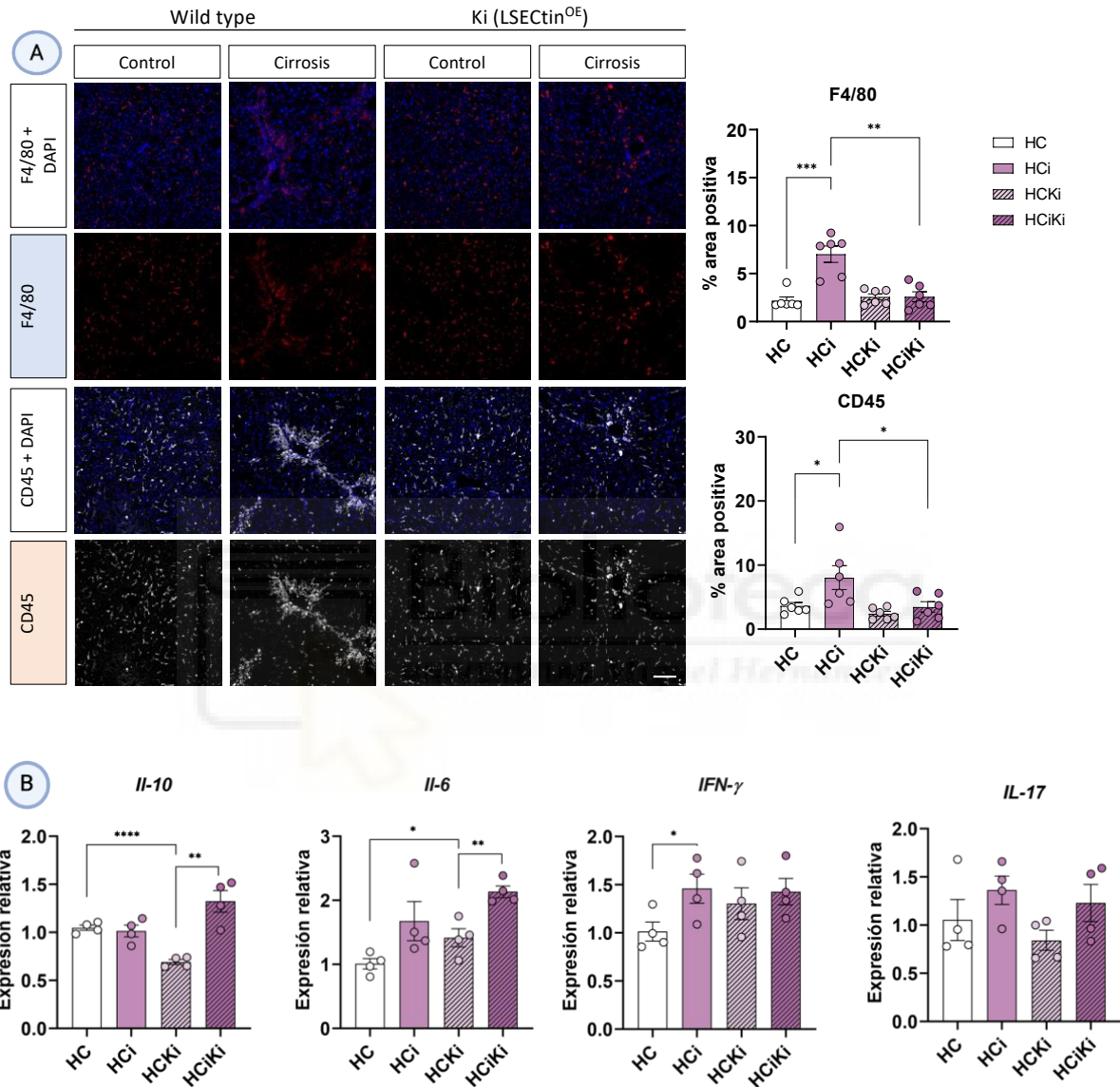


Figura 10. Expresión y cuantificación de los marcadores de leucocitos F4/80, CD45, IL-10, IL-6, IL-17 y IFN- γ . A: Imágenes de fluorescencia de las cuatro condiciones ($n=3$), se han representado dos fotos por condición. Las imágenes se corresponden con el marcador de inflamación junto con DAPI y de forma individual. Se representan los porcentajes de área positiva con la media \pm desviación estándar. La cuantificación de las proteínas se expresa como gráfico de barras. B: análisis de marcadores de inflamación mediante RT-qPCR ($n=4$). Se representa la

expresión relativa junto con la media \pm desviación estándar. Escala: 50 μ m. HC: Hígado Control. HCl: Hígado Cirrótico. HCKi: Hígado Control knock-in. HClKi: Hígado Cirrótico knock-in; IFN- γ : Interferón γ . Los valores de p se indican como (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$; (****) $p < 0.0001$.

En la figura 10A se puede observar una distribución relativamente normal en los hígados control WT de leucocitos, tanto linfocitos como macrófagos u otras células del sistema inmune mientras que en los cirróticos WT el reclutamiento es mayor, encontrándose este principalmente a las zonas periportales y a los vasos sanguíneos. La distribución de leucocitos es similar en los WT control y en los *knock-in* control. En cambio, en los *knock-in* cirróticos la distribución de leucocitos generalmente es más limitada en comparación con los WT cirróticos. Teniendo en cuenta la presencia de leucocitos en el tejido que secretan citocinas proinflamatorias como *IL-6* (*interleucina 6*), *IL-17* (*interleucina 17*) y *IFN- γ* observamos en su expresión generalmente una tendencia en su expresión al aumento en cirróticos (fig 10B). Observamos, además, una expresión similar en los WT control y *knock-in* control mientras que no se observa una diferencia significativa en la expresión de estos marcadores comparando los WT cirróticos y *knock-in* cirróticos. En cuanto a la *IL-10*, que es una citocina antiinflamatoria, se observa que existe una tendencia mayor expresión de esta en los *knock-in* cirróticos en comparación con los WT cirróticos (fig 10B).

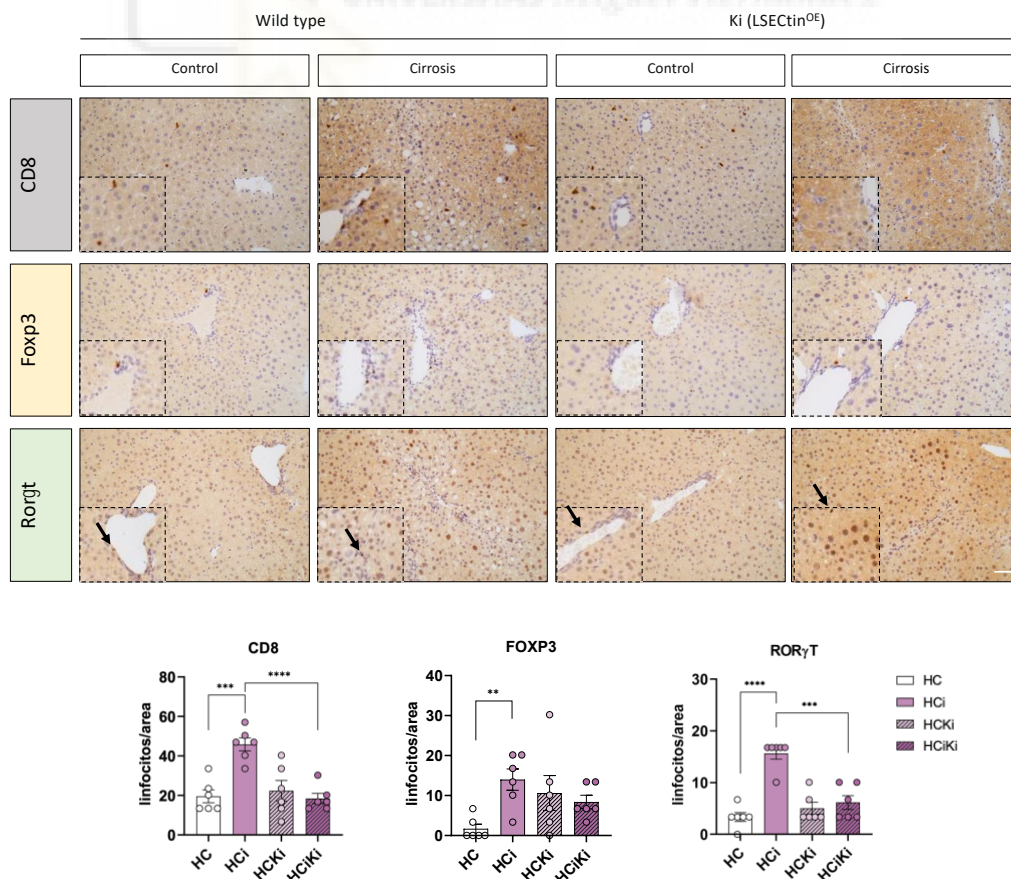


Figura 11. Expresión y cuantificación de los marcadores de linfocitos CD8, FOXP3 y ROR γ T. Imágenes de inmunohistoquímica colorimétrica de marcadores de linfocitos. Se representan los linfocitos por área de tejido. La cuantificación de las proteínas se expresa como gráfico de barras. Escala: 50 μ m. HC: Hígado Control. HCl: Hígado Cirrótico. HCKi: Hígado Control knock-in. HCKiKi: Hígado Cirrótico knock-in. Los valores de p se indican como (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$; (****) $p < 0.0001$.

En la figura 11 se observa la distribución de distintas poblaciones de linfocitos. En el caso de los linfocitos T CD8, los cuales son citotóxicos, son reclutados por el tejido a causa de la liberación de citocinas proinflamatorias cuya expresión se encuentra aumentada en estos hígados a pesar de que no haya significancia estadística (fig 10), de ahí la señal observada en las imágenes de inmunohistoquímica (fig 11). En cuanto a los *knock-in* control no se observan diferencias significativas con respecto a los WT control lo que se puede confirmar observando los gráficos de barras de los marcadores (fig 11). Cabe destacar que los *knock-in* cirróticos presentan generalmente un menor reclutamiento de todas las poblaciones con respecto a los WT cirróticos tanto en los vasos sanguíneos como en las zonas periportales. Destacamos, por tanto, los marcadores CD8 y ROR γ T (que marca a las Th17), en los cuales se observa la diferencia significativa de la presencia de linfocitos entre los *knock-in* cirróticos y los WT cirróticos siendo mayor en estos últimos. En el caso de Foxp3, los animales *knock-in* parecen mantener niveles elevados independientemente de la condición.

5.3 Th17 durante la cirrosis

Tras la inflamación producida por la liberación de citocinas, se produce el reclutamiento de diferentes poblaciones de linfocitos entre las que se encuentran los linfocitos Th. Entre estos destacan los Th17, fundamentales en la patología hepática ya que la citocina IL-17 que producen mayoritariamente, contribuye a la progresión de distintos aspectos de la enfermedad:

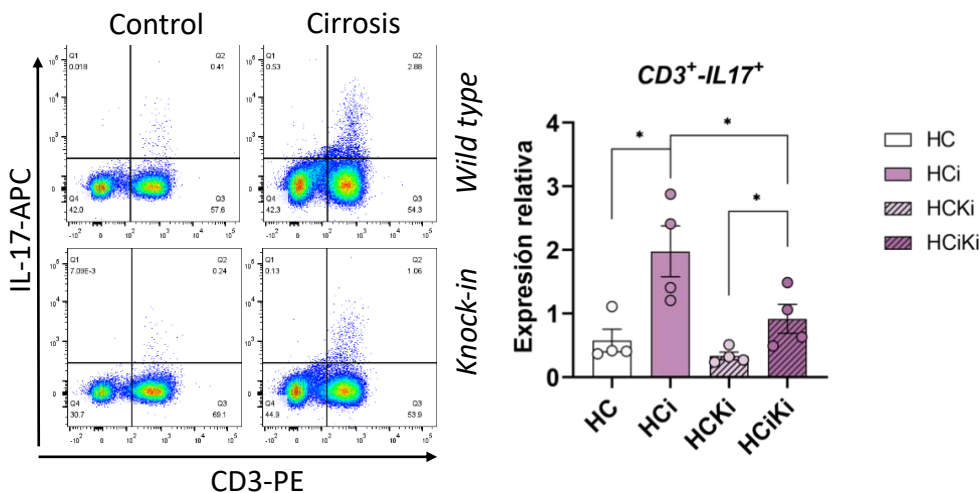


Figura 12. Cuantificación de las poblaciones linfocitos CD3⁺IL-17⁺ por citometría de flujo. Gráficos obtenidos mediante archivos citometría de flujo analizados en el software flowjo que representa porcentaje de células que expresan CD3 y IL-17. Las dobles positivas (cuadrante superior derecho) se consideran linfocitos Th17. La cuantificación de las poblaciones se expresa como gráfico de barras. HC: Hígado Control. HCl: Hígado Cirrótico. HCKi: Hígado Control knock-in. HClKi: Hígado Cirrótico knock-in. Los valores de p se indican como (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$; (****) $p < 0.0001$.

En la figura 12 se observan los niveles de linfocitos Th17 por citometría de flujo en los hígados de los animales. En primer lugar, se observan unos niveles bajos de linfocitos Th17 en los animales control. En el caso de los cirróticos se evidencia una mayor presencia de linfocitos Th17 en los WT en comparación con los *knock-in* lo que sugiere que en los WT cirróticos existe una mayor maduración y reclutamiento de estos durante el transcurso de la cirrosis. Esta hipótesis se confirma con la gráfica correspondiente a la cuantificación, en la que se observa una tendencia marcada a tener menores niveles de estos linfocitos en los hígados de los *knock-in*. Estos resultados, irían en la misma línea de lo que se observa en la histología, donde se ven menores niveles de células positivas para ROR γ T, confirmando que los animales de sobreexpresión de LSEctin, tienen menores niveles de linfocitos proinflamatorios en sus hígados.

5.4 Fibrosis

Dado que el objetivo es comparar el incremento o descenso de los marcadores de daño hepático a nivel transcripcional, postranscripcional y su posible relación con la sobreexpresión de LSECTin, se llevó a cabo también una comparación de la expresión de marcadores profibrogénicos en los hígados de los animales.

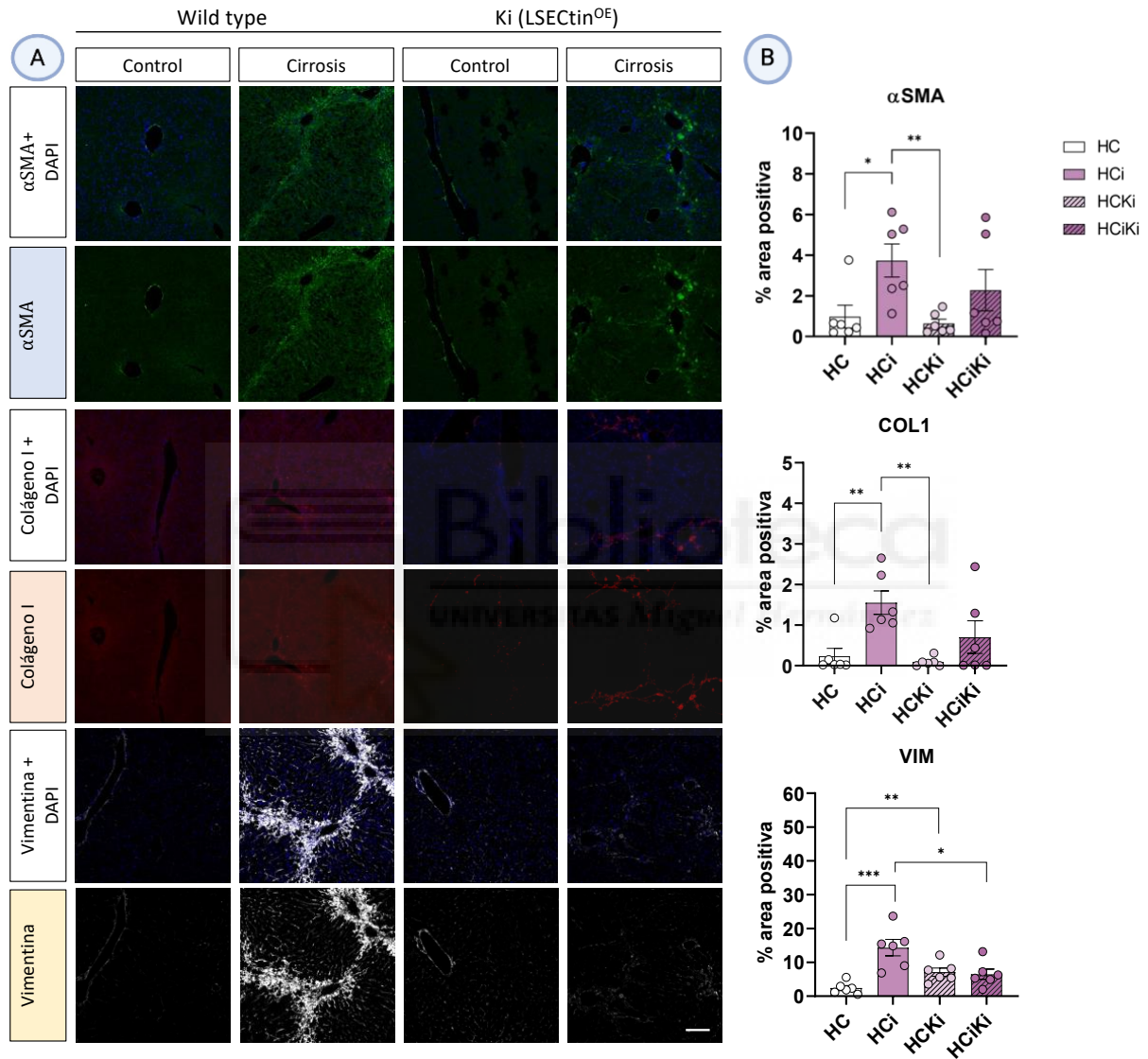


Figura 8. Expresión y cuantificación de los marcadores de fibrosis α SMA, COL1 y VIM. A: Imágenes de fluorescencia de las cuatro condiciones ($n=3$), se han representado dos fotos por condición. Las imágenes se corresponden con el marcador de fibrosis junto con DAPI y de forma individual. Escala: $50 \mu\text{m}$. B: La cuantificación de las proteínas se expresa como gráfico de barras. Se representan los porcentajes de área positiva con la media \pm desviación estándar. HC: Hígado Control. HCl: Hígado Cirrótico. HCKi: Hígado Control knock-in. HCKiKi: Hígado Cirrótico knock-in; α SMA: actina de músculo liso. Los valores de p se indican como (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

En la figura 8A se puede observar, en primer lugar, la expresión de la actina de músculo liso. En los hígados WT control existe expresión únicamente alrededor de los vasos sanguíneos mientras que en los hígados WT cirróticos hay una mayor presencia tanto en los vasos sanguíneos como en las zonas periportales. Esto indica que se está produciendo la activación de las HSCs las cuales se encuentran formando matriz extracelular, de ahí la gran señal de fluorescencia que se observa. En cuanto al *knock-in* control no se observa una diferencia significativa con respecto a los controles WT lo que se puede confirmar observando la gráfica de α SMA (fig 8B) mientras que los *knock-in* cirróticos presentan una menor expresión tanto en los vasos sanguíneos como en la zona periportal con respecto a los cirróticos WT (fig 8A). En cuanto al *Colágeno I*, no se observa una señal específica en los hígados WT control mientras que se observa una mayor expresión de este en los WT cirróticos, en la zona periportal donde se sitúan las HSCs activadas (fig 8A). En los hígados *knock-in* ocurre una situación similar a la de la actina de músculo liso. Finalmente, en cuanto a la Vimentina, se observa claramente como en los hígados *knock-in* cirróticos existe una menor expresión de esta tanto en los vasos sanguíneos como en la zona periportal en comparación con los hígados de los WT cirróticos donde se observa una expresión significativa de esta mientras que en los hígados de los controles se observa una expresión similar (fig 8A).

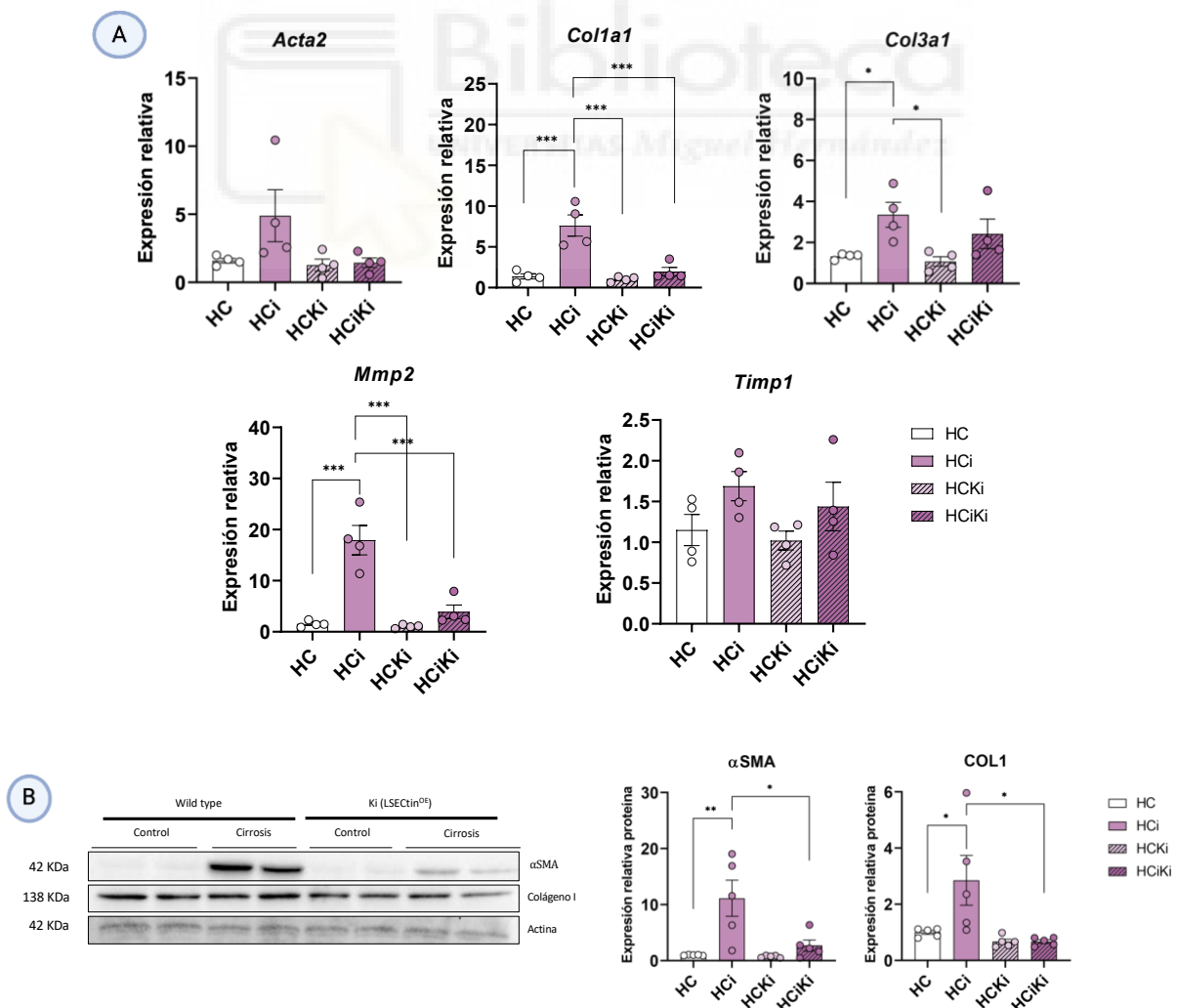


Figura 9. Expresión relativa a nivel postranscripcional y postraducciona l de genes profibrogénicos mediante RT-qPCR y Western blot. A: cuantificación de los genes en cuatro condiciones y se expresa como gráfico de barras (n=4). B: imágenes representativas y análisis de marcadores de fibrosis por WB en cuatro condiciones (n=5). Se representa la expresión relativa junto con la media \pm desviación estándar. HC: Hígado Control. HCl: Hígado Cirrótico. HCKi: Hígado Control knock-in. HCKi: Hígado Cirrótico knock-in; α SMA: actina de músculo liso; Col1a1: colágeno I; Col3: colágeno III; Mmp2: metaloproteinasa de matriz II; Timp1: Inhibidor de metaloproteinasa I. Los valores de p se indican como (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

En la figura 9A aparece la expresión de mRNA de una serie de marcadores de fibrosis en el hígado de los ratones. Aunque para los genes de *Col3a1* y *Timp1* no se observan unas tendencias claras, la expresión de *Acta2*, sin embargo, sí refleja una diferencia entre los animales cirróticos, aunque no sea significativa. Para *Col1a1* y para *Mmp2* sí que se observan diferencias significativas entre cirróticos. En definitiva, en los WT y *knock-in* control la expresión es relativamente similar mientras que esta cambia en los WT y *knock-in* cirróticos. En los primeros se observa mayor expresión de estos marcadores profibrogénicos en comparación con los *knock-in* cirróticos de manera general. De una manera similar, podemos observar que en los Western blot de α SMA como de colágeno (fig 9B) existe un aumento de la expresión en los WT cirróticos que no se observa en los *knock-in* en la misma condición, sugiriendo cierta protección frente a la fibrosis en estos últimos.

6. DISCUSIÓN

El propósito principal del estudio es evidenciar el papel inmunomodulador de la lectina LSECtin durante la enfermedad hepática crónica en ratones. Para ello se lleva a cabo este estudio en ratones tanto *wild type* como los que sobre expresan esta proteína. En estudios anteriores, se ha demostrado que, en condiciones de homeostasis, las LSECs, las cuales expresan LSECtin, colaboran en la eliminación de sustancias de desecho producidas por el metabolismo hepático y contribuyen activamente en fomentar la tolerancia inmunológica (32). En condiciones patológicas, concretamente, en la enfermedad hepática crónica inducida por CCl₄, estas células pierden LSECtin (28), favoreciendo una respuesta inflamatoria coordinada en el hígado a través de la presentación de antígenos, fomentando, a su vez, poblaciones de linfocitos como las Th17 (19) (29) (28). Además, en estudios anteriores se demostró que la presencia de LSECtin en el endotelio del hígado inhibía la respuesta aumentada producida por linfocitos T activados en ratones con daño hepático agudo y su ausencia provocaba que la patología se acelerara (24). Por esto, se ha determinado que estas células, y su expresión de LSECtin, tienen un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis y en el desarrollo de la fibrosis hepática producida por la respuesta inflamatoria. Es por ello por lo que en este trabajo se intenta explicar el efecto inmunomodulador de LSECtin en ratones *wild type* y con sobreexpresión de LSECtin.

En el modelo de enfermedad hepática crónica usado en este TFG, estudiamos las diferencias de daño hepático provocado por el CCl₄. Este, al metabolizarse en el hígado por los hepatocitos, los daña provocando su muerte. Esta muerte celular, a su vez, pone en marcha una respuesta proinflamatoria que, de no detenerse la fuente de estrés original, genera más daño hepático. Una de las consecuencias de esta respuesta inflamatoria durante la cirrosis, es la promoción de fibrosis debido a una producción de matriz extracelular excesiva por parte de las HSCs. Estas células permanecen en estado quiescente en ausencia de daño. Sin embargo, ante una lesión persistente del hígado, como en el caso del modelo de CCl₄, se activan gracias a lipotoxicidad, estrés celular, factores de crecimiento e inflamación provocando la deposición excesiva de colágeno. La inflamación, por otro lado, se mantiene debido al reclutamiento de monocitos que, junto con los macrófagos residentes del hígado, secretan más citocinas promoviendo a su vez mayor activación de las HSCs. Entre estas citocinas destacan algunas proinflamatorias como TNF α , interleucinas y quimiocinas, y la antiinflamatoria TGF- β 1 que se ve sobrepasada por la inflamación y sólo ejerce su capacidad profibrogénica (30). Las citocinas, en particular TNF α e IL-1 β favorecen la persistencia de las HSCs activadas mediante la activación de la vía NF κ B (30). Además, ambas promueven la fibrogénesis impulsando la sobreexpresión de metaloproteinasas de tipo I, codificadas por el gen *Timp1* (30). Adicionalmente a la inducción de la activación mediante señales químicas, las HSCs se activan debido a que expresan receptores del sistema inmune innato de tipo *toll* que reconocen mediadores del daño hepático liberados por los hepatocitos. Además, esta

activación lleva consigo una diferenciación fenotípica, ya que aumenta la proliferación de las HSCs, que también favorecen la quimiotaxis permitiendo así la infiltración de células inmunes en el tejido hepático en estadios más avanzados (31). Estas células inmunes, en especial los linfocitos, serán los encargados de promover el mantenimiento del daño en estados crónicos como en el modelo del CCl₄. En este sentido, pretendemos comprobar en este trabajo si mantener niveles altos de LSECtin durante la enfermedad hepática crónica (ratones *knock-in*), influiría en los niveles de daño que presentan estos animales en modelos de la enfermedad.

6.1 Daño hepático, respuesta inflamatoria y fibrosis

En ocasiones se puede producir un daño hepático puntual, a causa del abuso de alcohol, infecciones virales o múltiples factores (4). Pero cuando el daño es persistente, como es en el caso de los ratones tratados con CCl₄, produce un estrés oxidativo en los hepatocitos los cuales liberan radicales libres que son detectados por las KCs y esto provoca que estos sintetizen citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento con el objetivo de regenerar el tejido.

Además de las KCs (F4/80) presentes en el tejido, también se encuentran otras poblaciones celulares del sistema inmune como los linfocitos T, células dendríticas o neutrófilos (CD45) dispuestas homogéneamente por todo el tejido sano independientemente del genotipo. Por el contrario, ambas poblaciones se distribuyen mayoritariamente en las zonas periportales, donde se produce el daño, en los animales WT cirróticos. Con respecto a los *knock-in* cirróticos el reclutamiento parece menor, existiendo diferencias significativas entre ambos grupos. Esto podría implicar una respuesta inflamatoria de mayor magnitud en los WT cirróticos. Respecto a las citocinas anteriormente comentadas, no encontramos diferencia de expresión significativas en los hígados de estos animales. Sin embargo, existen tendencias a un mayor aumento en animales WT cirróticos con respecto a los *knock-in* en algunas de ellas como IFN- γ e IL-17. La IL-17, en particular, es producida por una población de linfocitos Th17, conocidos por favorecer la respuesta inflamatoria en los WT cirróticos y con los que LSECtin ya ha sido relacionada (28) (29). Destaca también la expresión de IL-10, la cual es una citocina antiinflamatoria, que parece estar aumentada en los animales *knock-in* cirróticos con respecto a los WT cirróticos, sugiriendo el posible efecto protector de LSECtin en estos animales. Estos resultados encajarían con estudios recientes del laboratorio donde se observó cómo la presencia de LSECtin en una línea celular murina de LSECs favorecía un patrón de citocinas antiinflamatorias como IL-10 frente a citocinas proinflamatorias como TNF- α (28), confirmando así que la presencia de LSECtin favorecía el ambiente antiinflamatorio en el tejido hepático. De ahí la necesidad de sobre expresar LSECtin en un modelo murino, para así comprobar su efecto protector frente al daño hepático producido por el agente CCl₄.

Por otro lado, como este modelo consiste en daño crónico, como hemos comentado comenzará el desarrollo de la cirrosis caracterizada por una etapa inicial de fibrosis debido a un periodo

extenso de respuesta inflamatoria en la que se producirá la sustitución del tejido hepático sano por fibrótico. El estado de fibrosis se produce inicialmente con la intención de regenerar el tejido. Los DAMPs liberados por los hepatocitos dañados producen la activación de las KCs, linfocitos y HSCs. Además, las HSCs se activan gracias a citocinas proinflamatorias como IL-17 y estas se diferencian a miofibroblastos aumentando así la expresión de α -SMA, sintetizando fibras de colágeno I e inhibidores de la degradación de la matriz (*Timp1*) mediada por metaloproteasas como MMP2 (26). Debido a la magnificación en la respuesta inflamatoria, se produce más matriz extracelular de la que se degrada, generando finalmente el estado de fibrosis en el hígado de los ratones cirróticos.

En los resultados, se puede observar un aumento de la expresión de los marcadores de fibrosis α -SMA, COL1 y VIM en las zonas periportales de los ratones WT cirróticos, manifestando una alteración en la cicatrización del tejido y deposición descontrolada producida por la enfermedad hepática crónica. Esto no ocurre de forma tan evidente en los animales *knock-in* cirróticos, ya que en estos la expresión de los marcadores es mayor con respecto a los controles, pero no de manera tan significativa como ocurre con los WT cirróticos. En ese sentido, destaca el marcador VIM, del cual se observa una diferencia significativa en su expresión entre los ratones WT cirróticos y los *knock-in* cirróticos. En adición, se observa claramente la diferencia en la expresión de los marcadores α -SMA y COL1 en los ratones WT cirróticos con respecto a los *knock-in* cirróticos mediante imágenes de Western blot también.

En el análisis de los genes que codifican marcadores profibrogénicos, en el caso de *Col1a1*, se puede observar cómo la expresión de este es significativamente mayor en los ratones WT cirróticos que en los *knock-in* cirróticos. Esto es debido a que en los WT cirróticos existe una mayor presencia de fibras de colágeno en las zonas periportales sintetizadas por las HSCs activadas, correspondiéndose así con los resultados mencionados anteriormente. En la expresión de *Col3a1* no se puede observar una tendencia clara pero el marcador *Acta2* sí refleja la diferencia entre los animales cirróticos. En el caso de los genes *Mmp2* y *Timp1*, podemos observar cómo la expresión de las metaloproteasas es significativamente mayor en los ratones WT cirróticos con respecto a los *knock-in* cirróticos mientras que la expresión de inhibidores de las proteasas es menor en los animales *knock-in* cirróticos. Esto podría demostrar una mayor protección frente a la fibrosis en los ratones *knock-in* cirróticos debido al efecto antiinflamatorio de LSECtin mencionado de estudios recientes, comparado con los ratones WT cirróticos en los que el daño hepático es mayor y el mecanismo de cicatrización se encuentra descompensado, favoreciendo así el desarrollo de la fibrosis en estos animales. En los ratones *knock-in* cirróticos la necesidad de degradación de la matriz extracelular por parte de las metaloproteasas es significativamente menor ya que como se ha mencionado antes, la expresión de las proteínas profibrogénicas es relativamente menor en estos animales. Sin embargo, la inhibición de estas metaloproteasas en estos ratones es menor

que en los WT cirróticos, ya que a pesar de sobre expresar LSECtin, presentan también daño hepático por lo que es necesaria la cicatrización correcta del tejido hepático.

6.2 Poblaciones linfocitarias durante la enfermedad hepática crónica y LSECtin

LSECtin presenta una función fundamental en la regulación de la respuesta inflamatoria. En estudios recientes se ha demostrado que, al reducir su expresión en las LSECs, aumentaba el perfil de citocinas proinflamatorias en la respuesta T dependiente (28). Durante el trascurso de la inflamación, existen poblaciones de linfocitos T que infiltran desde las zonas portales hacia el parénquima hepático reclutados por las quimiocinas liberadas por las KCs entre otros tipos celulares. Estas poblaciones se diferencian en función del microambiente de citocinas que exista. En los resultados obtenidos, en el caso los linfocitos T CD8, los cuales son citotóxicos, existe una diferencia significativa en la distribución de estos entre los animales WT cirróticos en comparación con los *knock-in* cirróticos. Los CD8 son reclutados por el tejido debido a la producción excesiva de matriz extracelular por parte de las HSCs por lo que favorecen el proceso de fibrosis en los animales cirróticos al tener una función citotóxica para los hepatocitos. La mayor distribución de estos linfocitos en los hígados WT cirróticos sugiere además que se está produciendo una inflamación del hígado a causa de la liberación de citocinas proinflamatorias.

En cuanto al marcador de linfocitos T_{reg}, FOXP3, no se observa una significancia estadística pero sí una tendencia a la mayor distribución de linfocitos T_{reg} en los animales WT cirróticos en comparación con los *knock-in* cirróticos. Estos linfocitos tienen la función de reducir la inflamación e inhibir la síntesis de fibras de colágeno mediante la liberación de citocinas antiinflamatorias como IL-10, por lo que su mayor reclutamiento en los animales cirróticos es de esperar. Por otro lado, al existir menores niveles de daño en los *knock-in* podría entenderse que hubiese menores niveles de Treg también. Sin embargo, en diferentes estudios se ha observado la correlación inversa entre la expresión del gen de LSECtin y los genes FOXP3 y ROR γ t (28). Esto explicaría por qué los animales WT cirróticos, que presentan una expresión menor de LSECtin debido a la cirrosis, tienen una mayor distribución de linfocitos T_{reg} pero no explicaría los altos niveles de esta población en los animales *knock-in*. Este resultado parece sugerir que el reclutamiento de las T_{reg} en los animales WT se debe al estado inflamatorio mientras que en los *knock-in*, LSECtin podría promover su reclutamiento a la vez que inhibe la función de otras poblaciones proinflamatorias.

En cuanto a la expresión del factor de transcripción ROR γ t sí es significativamente mayor en los ratones WT cirróticos en comparación con los *knock-in* cirróticos. Este factor de transcripción está involucrado en la diferenciación de linfocitos T_h a Th17, los cuales favorecen la respuesta inflamatoria y desarrollo de la fibrosis en el hígado de los ratones cirróticos mediante la liberación de la IL-17. Mientras que en los animales control hay un número reducido de estos linfocitos en el

tejido hepático, las células ROR γ t⁺ aumentan en hígados de ratones WT cirróticos en comparación con los *knock-in* de la misma condición. En concordancia con esto último, los análisis de citometría de flujo, *gold standard* para el análisis de células sanguíneas, también señala que existen mayores niveles de linfocitos Th17 (CD3⁺IL-17⁺) en los hígados WT enfermos en comparación con los animales de sobreexpresión. Estudios recientes sugieren que la pérdida de expresión de LSECtin tanto en hígados humanos como de ratones supone una mayor expansión de las subpoblaciones de linfocitos Th que favorecen el ambiente proinflamatorio durante la enfermedad hepática crónica como son los linfocitos Th17. Por ello, los resultados apoyan que LSECtin podría restringir la expansión de linfocitos Th17 en los hígados cirróticos, demostrando así su papel regulador de la inflamación (28).



7. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas a partir de los resultados expuestos son las siguientes:

- ◇ En los animales cirróticos WT se reprime la expresión de LSEctin mientras que en los *knock-in* se mantiene elevada a pesar de la enfermedad.
- ◇ El daño hepático crónico por CCl₄ es mayor en los animales WT que en los *knock-in*. Esta reducción del daño se produce potencialmente por una reducción de la respuesta inflamatoria y la consecuente menor fibrogénesis en los *knock-in*. Esto indica que LSEctin contribuye a la regulación de la inflamación, ejerciendo un efecto protector
- ◇ Las subpoblaciones de linfocitos proinflamatorios como los CD8 o los Th17 se encuentran menos expandidas en los animales *knock-in*. Esto sugiere que el mecanismo de la reducción del daño involucra una inhibición directa de este tipo de linfocitos.

8. PROYECCIÓN FUTURA

El estudio de LSEctin, tanto en este trabajo como en trabajos anteriores, permite comprender la función que presenta esta proteína en los procesos inflamatorios del hígado de modelos animales y pacientes durante la enfermedad hepática crónica. Se ha confirmado que su expresión se pierde durante la cirrosis mediante diferentes técnicas y que su represión podría estar involucrada en el enriquecimiento hepático de linfocitos proinflamatorios durante la enfermedad. Dado que como hemos visto en este trabajo, mantener niveles altos de LSEctin durante la cirrosis parece proteger frente al daño, evaluar la posible inducción de su expresión mediante tratamientos exógenos sería el siguiente paso lógico. La literatura indica que LSEctin se regula mediante mediadores del sistema inmunitario. Sería interesante comprobar si distintas interleucinas podrían tener efectos beneficiosos *in vivo* a través de LSEctin abriendo un camino al control de la inflamación durante la cirrosis en pacientes enfermos mediante la reexpresión de LSEctin. Adicionalmente sería relevante caracterizar *in vitro* el mecanismo de inhibición de LSEctin sobre las Th17, estudiando particularmente, si inhibe la diferenciación, la proliferación o la liberación de citocinas de este tipo de linfocitos.

Bibliografía

- (1) Ginès P, Krag A, Abraldes JG, Solà E, Fabrellas N, Kamath PS. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2021 Oct 9;398(10308):1359-1376. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01374-X. Epub 2021 Sep 17. PMID: 34543610.
- (2) Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 21;20(23):7312-24. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7312. PMID: 24966602; PMCID: PMC4064077.
- (3) Elpek GÖ. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 21;20(23):7260-76. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7260. PMID: 24966597; PMCID: PMC4064072.
- (4) Smith A, Baumgartner K, Bositis C. Cirrhosis: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*. 2019 Dec 15;100(12):759-770. PMID: 31845776.
- (5) Mansour D, McPherson S. Management of decompensated cirrhosis. *Clin Med (Lond)*. 2018 Apr 1;18(Suppl 2):s60-s65. doi: 10.7861/clinmedicine.18-2-s60. PMID: 29700095; PMCID: PMC6334027.
- (6) Poordad FF. Presentation and complications associated with cirrhosis of the liver. *Curr Med Res Opin*. 2015 May;31(5):925-37. doi: 10.1185/03007995.2015.1021905. PMID: 25697811.
- (7) Nan YM. [Current status and perspectives of diagnosis and treatment of complications related to liver cirrhosis]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2017 Apr 20;25(4):241-245. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.04.001. PMID: 28494539.
- (8) Baumgartner K, Cooper J, Smith A, St Louis J. Liver Disease: Cirrhosis. *FP Essent*. 2021 Dec;511:36-43. PMID: 34855340.
- (9) Zheng M, Tian Z. Liver-Mediated Adaptive Immune Tolerance. *Front Immunol*. 2019 Nov 5;10:2525. doi: 10.3389/fimmu.2019.02525. PMID: 31787967; PMCID: PMC6856635.
- (10) Robinson MW, Harmon C, O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol*. 2016 May;13(3):267-76. doi: 10.1038/cmi.2016.3. Epub 2016 Apr 11. PMID: 27063467; PMCID: PMC4856809.
- (11) Chen, Y., Tian, Z. Innate lymphocytes: pathogenesis and therapeutic targets of liver diseases and cancer. *Cell Mol Immunol* **18**, 57–72 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00561-z>
- (12) Gottwick C, Carambia A, Herkel J. Harnessing the liver to induce antigen-specific immune tolerance. *Semin Immunopathol*. 2022 Jul;44(4):475-484. doi: 10.1007/s00281-022-00942-8. Epub 2022 May 5. PMID: 35513495; PMCID: PMC9256566.
- (13) Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*. 2020 Apr 3;9(4):875. doi: 10.3390/cells9040875. PMID: 32260126; PMCID: PMC7226751.

- (14) Drouin M, Saenz J, Chiffolleau E. C-Type Lectin-Like Receptors: Head or Tail in Cell Death Immunity. *Front Immunol.* 2020 Feb 18;11:251. doi: 10.3389/fimmu.2020.00251. PMID: 32133013; PMCID: PMC7040094.
- (15) Fischer S, Stegmann F, Gnanapragassam VS, Lepenies B. From structure to function - Ligand recognition by myeloid C-type lectin receptors. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022 Oct 20;20:5790-5812. doi: 10.1016/j.csbj.2022.10.019. PMID: 36382179; PMCID: PMC9630629.
- (16) Li K, Underhill DM. C-Type Lectin Receptors in Phagocytosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2020;429:1-18. doi: 10.1007/82_2020_198. PMID: 32060644.
- (17) De Rudder M, Dili A, Stärkel P, Leclercq IA. Critical Role of LSEC in Post-Hepatectomy Liver Regeneration and Failure. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 28;22(15):8053. doi: 10.3390/ijms22158053. PMID: 34360818; PMCID: PMC8347197.
- (18) Shetty S, Lalor PF, Adams DH. Liver sinusoidal endothelial cells - gatekeepers of hepatic immunity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018 Sep;15(9):555-567. doi: 10.1038/s41575-018-0020-y. PMID: 29844586; PMCID: PMC7096836.
- (19) Jiang T, Hu Y, Cao J. [The role of sinusoidal endothelial cells in liver injury: a review]. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi.* 2023 Feb 23;35(1):92-97. Chinese. doi: 10.16250/j.32.1374.2022118. PMID: 36974022.
- (20) Bertuzzi S, Peccati F, Serna S, Artschwager R, Notova S, Thépaut M, Jiménez-Osés G, Fieschi F, Reichardt NC, Jiménez-Barbero J, Ardá A. Immobilization of Biantennary N-Glycans Leads to Branch Specific Epitope Recognition by LSECtin. *ACS Cent Sci.* 2022 Oct 26;8(10):1415-1423. doi: 10.1021/acscentsci.2c00719. Epub 2022 Sep 20. PMID: 36313162; PMCID: PMC9615123.
- (21) Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, Rautou PE. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol.* 2017 Jan;66(1):212-227. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.009. Epub 2016 Jul 14. PMID: 27423426.
- (22) Liu W, Tang L, Zhang G, Wei H, Cui Y, Guo L, Gou Z, Chen X, Jiang D, Zhu Y, Kang G, He F. Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSECtin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node. *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):18748-58. doi: 10.1074/jbc.M311227200. Epub 2004 Jan 7. PMID: 14711836.
- (23) Tang L, Yang J, Tang X, Ying W, Qian X, He F. The DC-SIGN family member LSECtin is a novel ligand of CD44 on activated T cells. *Eur J Immunol.* 2010 Apr;40(4):1185-91. doi: 10.1002/eji.200939936. PMID: 20127679.
- (24) Tang L, Yang J, Liu W, Tang X, Chen J, Zhao D, Wang M, Xu F, Lu Y, Liu B, Sun Q, Zhang L, He F. Liver sinusoidal endothelial cell lectin, LSECtin, negatively regulates hepatic T-cell immune response. *Gastroenterology.* 2009 Oct;137(4):1498-508.e1-5. doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.051. Epub 2009 Jul 24. PMID: 19632227; PMCID: PMC7127102.

- (25) Yang J, Wang H, Wang M, Liu B, Xu H, Xu F, Zhao D, Hu B, Zhao N, Wang J, Liu D, Tang L, He F. Involvement of LSECtin in the hepatic natural killer cell response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Jul 15;476(1):49-55. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.072. Epub 2016 May 14. PMID: 27184407; PMCID: PMC7092936.
- (26) Hammerich, L., Tacke, F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 20, 633–646 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00807-x>
- (27) Drescher HK, Bartsch LM, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Intrahepatic TH17/TReg Cells in Homeostasis and Disease-It's All About the Balance. *Front Pharmacol.* 2020 Oct 2;11:588436. doi: 10.3389/fphar.2020.588436. PMID: 33123017; PMCID: PMC7566778.
- (28) Martínez-López S, Ángel-Gomis E, Gómez-Hurtado I, Fernández-Iglesias A, Morante J, Gracia-Sancho J, Boix P, Cubero FJ, Zapater P, Caparrós E, Francés R. Cirrhosis-downregulated LSECtin can be retrieved by cytokines, shifts the TLR-induced LSECs secretome and correlates with the hepatic Th response. *Liver Int.* 2024 Jan 31. doi: 10.1111/liv.15836. Epub ahead of print. PMID: 38293766.
- (29) Caparrós E, Juanola O, Gómez-Hurtado I, Puig-Kroger A, Piñero P, Zapater P, Linares R, Tarín F, Martínez-López S, Gracia-Sancho J, González-Navajas JM, Francés R. Liver Sinusoidal Endothelial Cells Contribute to Hepatic Antigen-Presenting Cell Function and Th17 Expansion in Cirrhosis. *Cells.* 2020 May 15;9(5):1227. doi: 10.3390/cells9051227. PMID: 32429209; PMCID: PMC7290576.
- (30) Zisser A, Ipsen DH, Tveden-Nyborg P. Hepatic Stellate Cell Activation and Inactivation in NASH-Fibrosis-Roles as Putative Treatment Targets? *Biomedicines.* 2021 Mar 31;9(4):365. doi: 10.3390/biomedicines9040365. PMID: 33807461; PMCID: PMC8066583.