



Universidad Miguel Hernández de Elche

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología
Sanitaria de Elche

Programa de Doctorado en Biotecnología Sanitaria

**FUNCIÓN DE LSECTin EN EL CONTROL
DE LA INFLAMACIÓN DURANTE LA
ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA**

TESIS DOCTORAL

Sebastián Martínez-López

DIRECTOR

Dr. Rubén Francés Guarinos

CODIRECTORA

Dra. Esther Caparrós Cayuela

ALICANTE, 2025



Universidad Miguel Hernández de Elche

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología
Sanitaria de Elche

Programa de Doctorado en Biotecnología Sanitaria

**FUNCIÓN DE LSECTin EN EL CONTROL
DE LA INFLAMACIÓN DURANTE LA
ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA**

TESIS DOCTORAL

Sebastián Martínez-López

DIRECTOR

Dr. Rubén Francés Guarinos

CODIRECTORA

Dra. Esther Caparrós Cayuela

ALICANTE, 2025

La presente Tesis Doctoral, titulada “FUNCIÓN DE LSECTin EN EL CONTROL DE LA INFLAMACIÓN DURANTE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA” se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes **publicaciones**:

ARTÍCULOS

- **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 Apr;44(4):996-1010. doi: 10.1111/liv.15836.

Impact Factor: 6.0 Q1

- **Martínez-López S**, Juanola O, Gómez-Hurtado I, Ángel-Gomis E, Boix P, Fernández-Iglesias A, Gallardo-Cruz A, Cubero FJ, Gracia-Sancho J, Puig-Kröger A, Caparrós E, Francés R. *LSECTin attenuates hepatic Th17 expansion in a murine model of cirrhosis and signals through the LAG-3 receptor*. **JHEP Rep.** 2025 Jun 10;7(9):101482. doi: 10.1016/j.jhepr.2025.101482.

Impact Factor: 7.5 Q1

Empleados como indicio de calidad para la presentación de esta tesis doctoral, cumpliendo así con la normativa del **RD99/2011** y con la normativa vigente en la Universidad Miguel Hernández.

El **Dr. D. Rubén Francés Guarinos**, Catedrático de Inmunología, director, y la **Dra. Dña. Esther Caparrós Cayuela**, Profesora Titular de Inmunología, codirectora de la tesis doctoral:

INFORMAN:

Que **D. Sebastián Martínez-López**, ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado: “FUNCIÓN DE LSECtin EN EL CONTROL DE LA INFLAMACIÓN DURANTE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Alicante a de de 202...

Director de la tesis
Dr. D. Rubén Francés Guarinos

Codirectora de la tesis
Dra. Dña Esther Caparrós Cayuela



El **Dr. D. Gregorio Fernández-Ballester**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular, Coordinador del Programa de Doctorado en **Biología Sanitaria**

INFORMA:

Que **D. Sebastián Martínez-López**, ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado: "FUNCIÓN DE LSECtin EN EL CONTROL DE LA INFLAMACIÓN DURANTE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA" conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Alicante a de de 202...

Coordinador del Programa de Doctorado en Biología Sanitaria
Dr. D. Gregorio Fernández-Ballester



Para que así conste, la realización de la tesis doctoral titulada: “FUNCIÓN DE LSEctin EN EL CONTROL DE LA INFLAMACIÓN DURANTE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA” ha sido realizada con la financiación de una ayuda para contratos predoctorales para la Formación del Profesorado Universitario, de los subprogramas de Formación y Movilidad dentro del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad en I+D+i, correspondiente a la convocatoria publicada por Resolución de 16 de octubre de 2019.

Concretamente, el expediente fue **FPU19/03460** con código de proyecto UMH 2000/00188/001 y a efectos económicos y administrativos supuso el periodo comprendido entre el 1 de noviembre de 2020 y el 30 de septiembre de 2024.



ABREVIATURAS

AKT	Ak strain transforming
ANOVA	Analysis of variance
APC	Célula presentadora de antígeno
BSA	Bovine serum albumin
BTN3A3	Butyrophilin subfamily 3 member A3
CBL-b	Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene B
CCL	Chemokine (CC motif) ligand
CCl₄	Carbon tetrachloride
CD	Cluster of differentiation
CLD	Chronic liver disease
CLR	C-lectin receptor
CRD	Carbohydrate recognition domain
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CVM	Citomegalovirus
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
DAP12	Death Associated Protein12
DC-SIGN	Dendritic Cell Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FcR	Constant fraction receptor
FOXP3	Forkhead box P3
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
HA	Hyaluronic acid
HH	Harris Hematoxylin
HRP	Horseradish peroxidase
HSC	Hepatic stellate cell
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IF	Immunofluorescence
IFN- γ	Interferon-gamma
IHC	Immunohistochemistry
IL	Interleukin
INF	Interferon
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
KC	Kupffer cell
Ki	Knock-in
KO	Knock Out
LAG3	Lymphocyte Activating 3
LPS	Lipopolysaccharide
LSECs	Liver Sinusoidal Endothelial Cells
LSECtin	Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin
Ly6C	Lymphocyte antigen 6 complex
LYVE1	Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MHC	Major histocompatibility complex
MINCLE	Macrophage-inducible C-type lectin
MLKL	Mixed lineage kinase domain like pseudokinase

mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer
O/N	Overnight
OE	Overexpression
Pam3Cys	Tripalmitoyl-S-glycerol cysteine
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD1	Programmed death 1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDL1	Programmed death-ligand 1
PFA	Paraformaldehyde
PRR	Pattern recognition receptors
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
RIPK	Receptor interacting protein kinase
RORγT	Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor Gamma-T
ROS	Reactive oxygen species
RT	Room temperature
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SR	Sirius red
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAE	Tris-acetate-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TBX21	T-box transcription factor 21
TCR	T-cell receptor
TEMED	Tetramethylethylenediamide
TGFβ1	Transforming Growth Factor Beta 1
Th	Linfocito T helper
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VIM	Vimentin
WB	Western blot
Wt	Wild type
ZAP-70	Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70
α-SMA	Alpha-smooth muscle actin



Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

ÍNDICE

0. ÍNDICE

0.	ÍNDICE	16
1.	RESUMEN	20
2.	SUMMARY	22
3.	INTRODUCCIÓN.....	26
	A. ANATOMÍA DEL HÍGADO	26
	B. COMPONENTES CELULARES DEL HÍGADO	27
	C. FUNCIONES DEL HÍGADO	30
	D. FUNCIONES INMUNITARIAS DEL HÍGADO.....	31
	E. PAPEL DEL ENDOTELIO EN LA RESPUESTA INMUNITARIA HEPÁTICA	33
	F. LECTINAS TIPO C.....	35
	G. LSECTIN.....	37
	H. CIRROSIS HEPATICA	42
4.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	50
5.	HIPÓTESIS.....	53
6.	OBJETIVOS	53
7.	RESUMEN GLOBAL DE MATERIALES Y MÉTODOS	56
	A. PACIENTES Y MUESTRAS HUMANAS	56
	B. RATONES TRANSGÉNICOS Y GENOTIPADO	56
	C. INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE CIRROSIS	58
	D. CITOMETRÍA DE FLUJO	59
	E. CELL SORTING.....	60
	F. AISLAMIENTO DE CD4, DIFERENCIACIÓN Th17 o Treg Y SEÑALIZACIÓN DOWNSTREAM DE TCR E IL-6.....	60
	G. CULTIVO CELULAR.....	61
	H. INHIBICIÓN DE LSECTIN MEDIANTE <i>CRISPR-CAS</i>	62
	I. ANÁLISIS DEL SECRETOMA	62
	J. ELISA.....	63
	K. MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	63
	L. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	63
	M. ANÁLISIS DE PCR CUANTITATIVA	65
	N. WESTERN BLOT.....	66
	O. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	67
8.	ARTÍCULO 1	70
	A. OBJETIVO.....	70
	B. RESUMEN.....	70

C.	CONCLUSIÓN.....	70
9.	ARTÍCULO 2	87
A.	OBJETIVO.....	87
B.	RESUMEN.....	87
C.	CONCLUSIÓN.....	87
10.	DISCUSIÓN	103
11.	CONCLUSIONES.....	115
12.	BIBLIOGRAFÍA	118





Biblioteca
UNIVERSITAS M...

RESUMEN SUMMARY

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La cirrosis hepática es considerada un problema de salud pública grave generando una gran carga sobre los sistemas sanitarios debido a su cronicidad y más de 1 millón de muertes anuales. La progresión de la cirrosis se asocia con una disfunción inmunológica que, entre otros factores, implica la pérdida de mecanismos de tolerancia, determinados por las células presentadoras de antígeno (APCs) que pueblan el hígado, entre las que se encuentran las células endoteliales del sinusoides hepático (LSECs). Por su posición, interactúan constantemente con leucocitos circulantes en los cuales inducen un efecto de inactivación en condiciones de homeostasis gracias a los distintos receptores inmunitarios innatos que expresan. Dentro de estos receptores destaca la lectina de tipo C específica de LSECs LSECtin, conocida por participar en la regulación del sistema inmunitario hepático. Resultados previos de este laboratorio sugieren que esta proteína podría jugar un rol importante durante la enfermedad hepática crónica, donde su pérdida podría estar implicada en la progresión de la inflamación. En ese sentido, los objetivos de este trabajo fueron dilucidar los mecanismos que regulan la expresión de LSECtin en homeostasis y en cirrosis, así como esclarecer los mecanismos mediante los cuales LSECtin modula el sistema inmunitario.

MÉTODOS

En esta tesis doctoral hemos realizado experimentos con modelos animales de cirrosis experimental, apoyándonos con resultados obtenidos de muestras de pacientes cirróticos. En cuanto al modelo animal, indujimos daño hepático mediante la administración intragástrica de CCl₄. Esto nos permitió evaluar los cambios en LSECtin y su relación con la extensión del daño hepático, además de los efectos en la biología de las LSECs aisladas por *cell sorting*. Adicionalmente, el daño hepático resultante lo comparamos con animales que mantenían niveles altos de LSECtin durante la cirrosis gracias a un modelo genético de sobreexpresión (Ki). Mediante citometría de flujo examinamos las diferencias cuantitativas de los distintos compartimentos del sistema inmunitario hepático. Finalmente, exploramos el mecanismo molecular a través del

cual actúa LSECtin sobre los linfocitos mediante ensayos *in vitro*. Al disponer tanto de LSECtin recombinante soluble, así como de un anticuerpo funcional anti-LAG3 que bloqueaba las interacciones con sus ligandos, pudimos explorar los efectos de esta lectina sobre la capacidad de diferenciación de los linfocitos y las vías de transducción implicadas en el proceso.

RESULTADOS

En el primer estudio comprobamos que tanto en pacientes como en animales cirróticos existía una pérdida de la expresión de LSECtin en el endotelio hepático comparado con animales control y sujetos sanos. Además, estas LSECs promovían respuestas proinflamatorias en lugar de tolerogénicas. Comprobamos también que detrás de los cambios de expresión de esta lectina se encontrarían las citocinas. Las proinflamatorias la reprimían, mientras que las antiinflamatorias la inducían, sugiriendo un posible mecanismo de recuperación de la homeostasis durante la cirrosis. En el segundo trabajo, y para explorar este escenario, estudiamos los efectos de mantener niveles altos de LSECtin en el modelo Ki. La sobreexpresión de LSECtin mitigaba la progresión de la fibrosis y el daño inflamatorio. Concretamente, observamos una modulación de las poblaciones linfocitarias con un aumento de Tregs en detrimento de las Th17. Tras comprobar que tanto en el modelo animal como los pacientes encontrábamos Th17 con niveles altos de LAG3, ligando conocido de LSECtin, demostramos cómo esta lectina prevenía su diferenciación, alterando la señalización del TCR y de la IL-6 que eran cruciales en este proceso.

CONCLUSIONES

La pérdida de expresión de LSECtin se encuentra involucrada en la progresión de la inflamación durante la cirrosis hepática. Su papel como modulador de poblaciones linfocitarias proinflamatorias a través de LAG3, así como la posibilidad de recuperar su expresión en cirrosis mediante el uso de citocinas la convierten en una diana con potencial interés terapéutico en esta patología.

2. SUMMARY

BACKGROUND AND OBJECTIVES

Liver cirrhosis is considered a serious public health problem generating a major burden on our health sector due to its chronicity and more than 1 million deaths annually. The progression of cirrhosis is associated with an immune dysfunction, which involves the loss of different tolerance mechanisms determined by the antigen-presenting cells (APCs) that populate the liver, among which the liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) stand out. Due to their location, they constantly interact with circulating leukocytes in which they induce an inactivating effect under homeostatic conditions through the different innate immune receptors they express. One of these receptors is the LSEC-specific C-type lectin LSECtin, known for its role in the regulation of the hepatic immune system. Previous results from this laboratory suggest that this protein could play an important role during chronic liver diseases, where its loss has been associated with the progression of inflammation. Thus, the objectives of this work were to elucidate the mechanisms by which LSECtin is regulated in homeostasis and disease as well as to ascertain how LSECtin mechanistically modulates the immune system.

METHODS

We have performed experiments with animal models of experimental cirrhosis supported by results obtained from samples of cirrhotic patients. Regarding the animal model, we induced liver damage by the intragastric administration of CCl₄. This allowed us to evaluate the changes in LSECtin expression, the relationship of these changes with the extent of liver damage and their effects on the biology of LSECs isolated by cell sorting. Additionally, we compared the magnitude of liver damage in animals that maintained high levels of LSECtin during cirrhosis using a genetic model of LSECtin overexpression (Ki). Using flow cytometry, we examined the quantitative differences in the various compartments of the hepatic immune system. Finally, we explored *in vitro* assays the molecular mechanism through which LSECtin acts on lymphocytes. By having both soluble recombinant LSECtin, as well as a functional anti-LAG3 antibody that blocked interactions with its ligands, we were able to explore the effects of this

lectin on the differentiation capabilities of lymphocytes and the transduction pathways involved in those processes.

RESULTS

In the first study we found a loss of LSECtin expression in the hepatic endothelium of cirrhotic mice and patients compared to control mice and healthy volunteers, respectively. LSECs had a compromised signalling, promoting proinflammatory rather than tolerogenic responses. In addition, we found that proinflammatory cytokines repressed the expression of this lectin, while anti-inflammatory cytokines induced it, suggesting a possible mechanism of recovery of homeostasis during cirrhosis. In the second study, and to explore this scenario, we focused on evaluating the effects of maintaining high levels of LSECtin during this pathology in the Ki model. We found that LSECtin overexpression mitigated fibrosis progression and inflammatory damage. Specifically, we observed a modulation of lymphocyte populations with an increase in Tregs at the expense of Th17 cells. After verifying that Th17 cells from cirrhotic animals and patients highly expressed LAG3, a known ligand of LSECtin, we demonstrated how this lectin prevented their pro-inflammatory differentiation, altering the TCR and IL-6 signalling, also crucial for the Th17 phenotype.

CONCLUSIONS

The loss of LSECtin expression is involved in the progression of inflammation during liver cirrhosis. Its role as a modulator of proinflammatory lymphocyte populations through LAG3, as well as the possibility of recovering its expression in cirrhosis using cytokines, underscore LSECtin as a target of potential therapeutic interest in this pathology.



INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAS Miguel Hernández

3. INTRODUCCIÓN

A. ANATOMÍA DEL HÍGADO

El hígado es la glándula y el órgano más grande del cuerpo en vertebrados. En los humanos adultos supone cerca del 2 % del peso corporal siendo este porcentaje algo mayor en caso de los ratones [1]. Situado bajo el diafragma y a la derecha del estómago, el hígado está recubierto por peritoneo visceral y una capa de tejido conjuntivo denominada cápsula de Glisson, que lo separan del resto de órganos [1].

En cuanto a su vascularización, el hígado se trata de un órgano único (**Fig. 1**). Por un lado, recibe sangre arterial oxigenada de la arteria hepática (30 % del total). Por otro, recibe sangre desoxigenada rica en nutrientes y productos bacterianos provenientes del sistema gastrointestinal a través de la vena porta (70 % restante) [2].

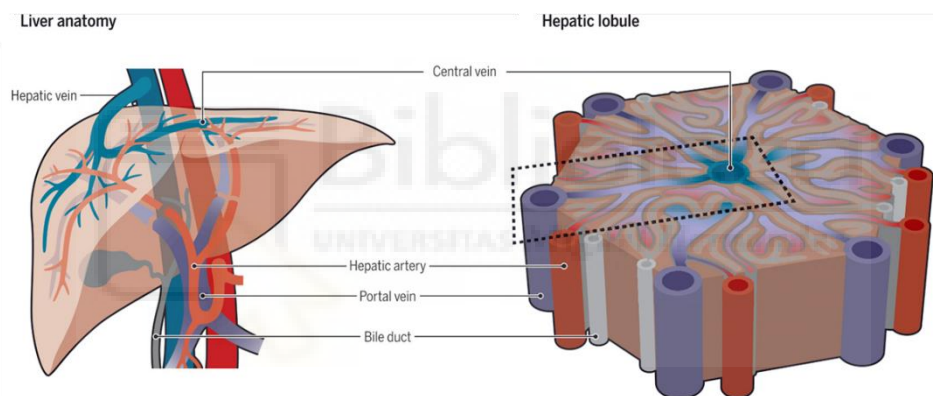


Figura 1 Anatomía hepática. Aspecto externo y organización microscópica del hígado. La sangre proveniente de ramas de la arteria hepática y de la vena porta bañan estructuras de forma hexagonal que constituyen la unidad básica funcional del hígado: el lobulillo hepático. Este, a su vez está formado, por cordones de hepatocitos que procesan la sangre que volverá a la circulación a través de las venas centrales que desembocan en la vena cava inferior. Imagen modificada de Ficht, X. *et al.*, *Sci. Immunol.* 5, eaba2351 (2020).

Estos dos suministros de sangre se mezclan en los sinusoides hepáticos irrigando las distintas estructuras de la arquitectura hepática. Principalmente, los hepatocitos se organizan en cordones paralelos rodeados de las células del endotelio hepático (LSECs) que forman los sinusoides (**Fig. 1**). A su vez, estos cordones se agrupan en estructuras hexagonales funcionales llamadas lobulillos hepáticos, en cuyos vértices encontramos las triadas portales (ramificaciones de la vena porta, la arteria hepática y del árbol biliar). En su centro, una vena central recoge la sangre procesada por el parénquima hepático y la devuelve a la circulación vía la vena cava inferior [2].

La bilis, por otro lado, es considerada un producto del metabolismo hepático que fluye por el sistema biliar en dirección contraria a la sangre a lo largo del lobulillo. Este sistema confluye en el conducto hepático por el que la bilis alcanza la vesícula biliar para su almacenamiento hasta que sea necesaria su actuación durante la digestión [3].

B. COMPONENTES CELULARES DEL HÍGADO

El hígado se caracteriza por estar compuesto de un gran número de tipos celulares diferentes que podemos clasificar en parenquimatosos y no parenquimatosos (**Fig. 2**). El primer grupo está compuesto por los hepatocitos y colangiocitos. El segundo se trata de un grupo más heterogéneo compuesto por células vasculares y células inmunológicas, entre otras.

Dentro del parénquima del órgano, los hepatocitos suponen cerca del 80 % de la masa hepática. Estos están dispuestos radialmente en el lobulillo hepático, separados del torrente sanguíneo por una capa de LSECs. Entre ambos aparece el espacio de Disse que consiste en una fina zona llena de plasma sanguíneo donde ocurre un gran intercambio de sustancias entre los hepatocitos y la circulación [4].

Estos hepatocitos desempeñan una amplia gama de funciones metabólicas y secretoras. Debido a ello, poseen una extensa red endoplásmica y un gran número de mitocondrias involucradas en procesos como la β -oxidación, liberación de glucosa a partir de glucógeno o detoxificación de amoníaco por citar algunos [3]. Además, se caracterizan por una gran capacidad regenerativa a pesar de que en homeostasis rara vez se dividan, lo cual es fundamental para la reparación del daño hepático [5].

Los colangiocitos, por otro lado, sólo representan alrededor del 4 % de todas las células hepáticas. Sin embargo, son las principales células encargadas de la homeostasis de la bilis. Estas, son clasificadas como células epiteliales y revisten los conductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos. De esta manera, coordinan el transporte solutos y agua a través de la membrana plasmática apical en respuesta a diferentes señales hormonales, modificando la composición de la bilis en función de las necesidades del organismo [6].

El 20 % restante de las células del hígado son las consideradas no parenquimatosas. Entre ellas, las más numerosas son las LSECs. Este endotelio vascular, es considerado uno de los más especializados del organismo, ya que carece de membrana basal y posee fenestraciones sin diafragma [7], [8]. Ambas características le otorgan a estos sinusoides la capacidad única de facilitar el intercambio de sustancias con el parénquima hepático contribuyendo al funcionamiento del órgano. A pesar de esta aparente permisividad, las LSECs también juegan un rol fundamental en la vigilancia frente a agentes dañinos provenientes de la circulación hepática. De hecho, además de poseer un complejo repertorio de receptores del sistema inmunitario, se consideran reguladoras esenciales de la respuesta inmunitaria hepática [9].

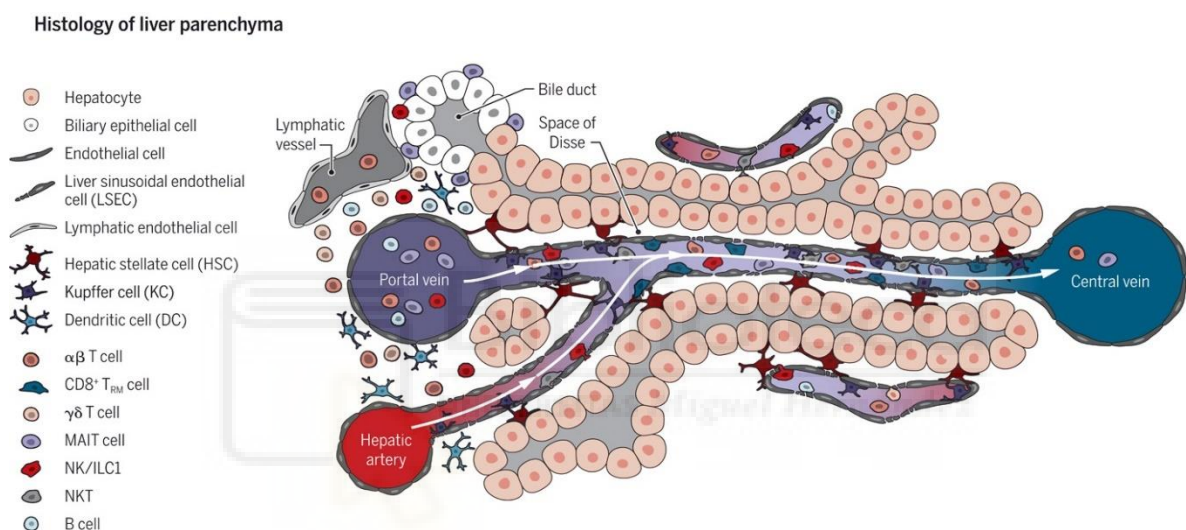


Figura 2 Células hepáticas. Representación esquemática de la estructura de un sinusoides hepático. Los cordones de hepatocitos definen los canalículos hepáticos que conducen la bilis hacia los conductos biliares. La sangre, que fluye en sentido opuesto, proviene de la mezcla de la sangre portal y arterial y es procesada por los hepatocitos. Debido a su origen y la consecuente carga antigénica de la sangre portal, existe un gran número de leucocitos que patrullan los sinusoides hepáticos, promoviendo la homeostasis. Imagen modificada de Ficht, X. *et al.*, *Sci. Immunol.* 5, eaba2351 (2020).

Contribuyendo a esta vigilancia encontramos a las células de Kupffer (KC), la mayor población de macrófagos residentes en el organismo [10]. Estas células del sistema fagocítico mononuclear se encuentran adheridas a las LSECs mientras extienden procesos citoplasmáticos hacia el espacio de Disse, lo que les permite fagocitar eficazmente patógenos o material de desecho procedente de la circulación portal o arterial [10]. Se activan en respuesta a estas sustancias potencialmente dañinas o a lesiones de las células hepáticas y cuando lo hacen secretan numerosas citocinas proinflamatorias y especies reactivas del oxígeno [11]. Estas moléculas contribuyen, a

su vez, al reclutamiento y activación de otros tipos celulares como las células estrelladas (HSC) o distintos leucocitos, promoviendo una respuesta inmunitaria local necesaria para la reparación del daño [12].

Localizadas en el espacio de Disse, encontramos a las HSCs (**Fig. 2**). Almacenan principalmente lípidos y vitamina A y en condiciones fisiológicas mantienen un fenotipo no proliferativo y quiescente. Sin embargo, tras un daño hepático, las HSCs se activan, proliferan y adquieren un fenotipo profibrogénico similar al miofibroblasto que promueve la deposición de matriz extracelular [13]. Si el daño es persistente, puede generarse una cicatriz fibrosa permanente propia de estados tardíos de la enfermedad hepática crónica (CLD). Esta alteración de la arquitectura hepática conduce a disfunción hepatocelular y al aumento de la resistencia intrahepática al flujo sanguíneo provocando graves consecuencias para la salud [13].

Finalmente, completando el grupo de las células no parenquimales, encontramos los leucocitos restantes. Dada su posición en la circulación, el hígado recibe una carga antigénica considerable por parte de los alimentos ingeridos y de los microorganismos comensales del tracto digestivo *a priori* inofensivos. Sin embargo, por esta misma vía de entrada, el hígado está expuesto a virus, bacterias patógenas, parásitos etc., por lo que no es de extrañar que, junto a LSECs y KCs, encontremos otras poblaciones inmunitarias contribuyendo a la vigilancia [14]. Aunque habría que diferenciar entre condiciones de homeostasis o patológicas, a grandes rasgos podemos hallar componentes tanto de la inmunidad innata como de inmunidad adaptativa poblando los sinusoides hepáticos. Entre estos, uno de los más llamativos son las células linfoides innatas, como las células *natural killer* (NK), que suponen la mayor reserva de estas células del organismo y pueden responder rápidamente a ligandos conservados [15]. En el caso de que se generase una respuesta inmunitaria, también podrían verse reclutados de la circulación neutrófilos, monocitos y células dendríticas que, con su papel de APC, favorecen el componente adaptativo de la respuesta a través de los linfocitos T y B [16]. Estos linfocitos, en especial los T, juegan un papel crítico en la iniciación, mantenimiento y resolución de la inflamación intrahepática, por lo que su modulación es responsable de la homeostasis, así como de la progresión de diferentes patologías hepáticas [16].

C. FUNCIONES DEL HÍGADO

El hígado participa en numerosas funciones cruciales para el mantenimiento de la homeostasis en seres humanos y otros mamíferos. Entre ellas encontramos, la digestión, el metabolismo, la detoxificación de drogas o alcohol o la propia defensa del organismo [14], [17].

Respecto al metabolismo, quizás la función más conocida, el hígado juega un papel fundamental junto con el páncreas, en el mantenimiento de los niveles glucosa a través de su almacenamiento (glucogénesis) o liberación (glucogenólisis/gluconeogénesis) en respuesta a la insulina o el glucagón, respectivamente [18]. También participa de forma importante en el metabolismo de los lípidos y el colesterol, promoviendo su absorción mediante la secreción lipoproteínas involucrados en el proceso. Por otro lado, puede utilizar los ácidos grasos como fuente de energía interna, promover su almacenamiento en el tejido adiposo en caso de exceso, o puede proporcionar energía a otros órganos a partir de estos en forma de cuerpos cetónicos si existiese un ayuno prolongado [3]. En caso de las proteínas, no sólo es responsable de la producción de cerca del 90 % de las proteínas circulantes, sino que el hígado también se ocupa de la eliminación, en colaboración con el riñón, de los residuos nitrogenados procedentes de la degradación de estas. Dentro de las proteínas producidas por el hígado, destaca el papel de la albúmina, la más abundante del plasma. Esta, es esencial para mantener la presión oncótica que regula el volumen sanguíneo y es necesaria para el transporte de numerosas moléculas entre las que destacan las hormonas, lo que la hace indispensable para el funcionamiento del sistema endocrino [19].

Dentro del abanico de funciones metabólicas también podemos destacar la capacidad crítica del hígado de desintoxicar xenobióticos. Ya sea por degradación lisosomal o por transformación química en el complejo sistema enzimático del hígado, este neutraliza y elimina sustancias como el alcohol, drogas u otros químicos que supondrían efectos nocivos para el organismo [20].

El hígado también desempeña un papel clave en el proceso de coagulación sanguínea. Es el responsable de la síntesis de todos los factores de coagulación y sus inhibidores, así como de factores trombopoyéticos. Tanto es así, que el daño hepático está

implicado en alteraciones de la hemostasia relacionándose con ambos, la tendencia al sangrado o la trombosis en función de la afectación hepática [21].

D. FUNCIONES INMUNITARIAS DEL HÍGADO

Quizás uno de los roles menos asociados con el hígado, lo que contrasta con la importancia del papel que juega en este sentido, es precisamente la defensa del organismo. Nos proporciona componentes fundamentales de la inmunidad innata sistémica como las proteínas del complemento o las proteínas de fase aguda, además de ser fuente de citocinas y quimiocinas moduladoras de la respuesta inmunitaria [17]. Por otro lado, gracias a su ubicación única en la circulación y a su particular red de células inmunitarias que ya hemos mencionado (**Fig. 2**), el hígado se posiciona junto con el bazo, como los principales centros de detección y aclaramiento de patógenos sanguíneos y sus antígenos [22]. Tanto es así, que enfermedades hepáticas crónicas conducen a un deterioro de esta función, favoreciendo, en consecuencia, la aparición de infecciones oportunistas como peritonitis bacteriana espontánea o infecciones del tracto urinario graves aumentado el riesgo de mortalidad en este tipo de pacientes [23], [24].

Precisamente como centinela inmunitario, el hígado tiene la capacidad de discriminar entre los distintos estímulos que recibe, generando una respuesta dual a medida (**Fig. 3**). Por un lado, frente a antígenos propios o derivados de alimentos y microbiota comensal que no suponen una amenaza, la respuesta inmunitaria local del hígado se caracteriza por la tolerancia. Hay una inducción de poblaciones inmunitarias reguladoras; existe liberación de citoquinas como la IL-10 o el TGF- β 1 por parte de KCs y LSECs que previenen la inflamación; y, en especial, las APCs hepáticas inducen la supresión de las actividades efectoras de los linfocitos T previniendo respuestas proinflamatorias [22], [25]. Por otro lado, si se exceden los niveles aceptables de productos bacterianos o existe una activación paralela de diversos receptores innatos como los Toll-like Receptor (TLR), lectinas y otros receptores de reconocimiento (PRR) de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que indiquen potenciales infecciones, el hígado es perfectamente capaz de orquestar una respuesta inmunitaria robusta [25]. En esta, el sistema inmunitario innato local coordinaría una reacción inmediata con inducción de inflamación local y reclutamiento activo de leucocitos

circulantes, controlando la potencial infección. Mientras tanto, el sistema adaptativo sistémico prepararía una respuesta específica en días que culminaría con la resolución de la infección [14], [26].

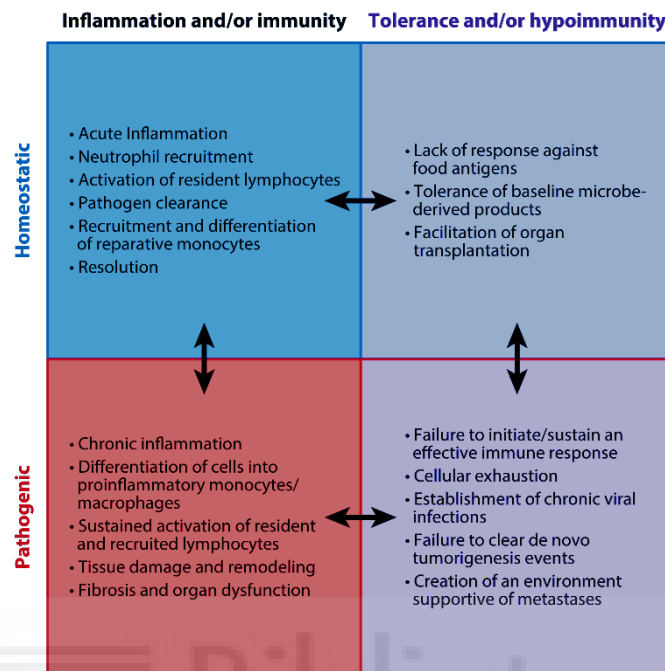


Figura 3 Inmunidad hepática. La respuesta inmunitaria hepática se caracteriza por el equilibrio dinámico entre la tolerancia y la inflamación. Normalmente hipoinmunológico frente a antígenos inocuos, el hígado puede generar una respuesta aguda y efectiva si hay señales de invasión por patógenos o lesiones endógenas. La desregulación de este balance acarrea consecuencias que van desde enfermedades inflamatorias crónicas como la cirrosis o permisividad con infecciones víricas. Imagen modificada de Kubes P and Jenne C., *Annu Rev Immunol.* 36:247-277 (2018).

Por supuesto, existe un delicado balance entre la tolerancia inmunológica y la generación de una respuesta inmunitaria efectiva. La inducción de una o de otra es el resultado de la respuesta articulada de todas las poblaciones inmunitarias locales y reclutadas, frente a los estímulos que recibe el hígado. Cuando existe algún desequilibrio en este proceso, podemos observar patologías como la esteatohepatitis o la cirrosis, si las respuestas inflamatorias son inapropiadamente fuertes y persistentes. Por otro lado, si en un exceso de tolerancia no se generan respuestas eficientes ni contundentes, se corre el riesgo de padecer enfermedades virales crónicas, así como de no eliminar potenciales células tumorales que resulten en cáncer (**Fig. 3**) [14], [26]. En cualquiera de los casos, la habilidad de mantener el equilibrio en esta respuesta, así como sus implicaciones para la inmunidad sistémica, señalan al hígado como un órgano inmunitario fundamental para nosotros.

E. PAPEL DEL ENDOTELIO EN LA RESPUESTA INMUNITARIA HEPÁTICA

Las LSECs no se limitan a formar una barrera física dentro de los sinusoides hepáticos. Por el contrario, juegan un papel central en la fisiología, y de forma especial, en la inmunología del hígado. Por su posición privilegiada en la circulación hepática están implicadas en procesos fundamentales como el reclutamiento leucocitario, la filtración y limpieza de partículas de la sangre a través de procesos de endocitosis, e incluso contribuyen a la presentación antigénica a los linfocitos T, mereciéndose por ello el título de APC semiprofesional (**Fig. 4**) [27], [28].

Las LSECs son consideradas las células con mayor capacidad endocítica del cuerpo, superando incluso a células mieloides [29], [30]. Para ello, las células endoteliales están equipadas con un gran repertorio de receptores innatos, entre los que encontramos, TLRs, Lectinas tipo C, receptores *scavenger*, que contribuyen por ejemplo al aclaramiento de virus hepatotrópicos [31], [32], o receptores para la fracción constante de anticuerpos (FcR), estos últimos fundamentales para la limpieza de inmunocomplejos de la circulación (**Fig. 4**) [33], [34]. El en caso de los TLRs, las LSECs expresan a casi todos los componentes de la familia, intracelulares incluidos, resaltando la función de vigilancia de estas células. Sin embargo, al estar expuestas de manera constante a concentraciones bajas de sus ligandos provenientes de la circulación portal, como el lipopolisacárido (LPS), las LSECs no generan respuestas habitualmente. Por el contrario, sólo si existe una subida clara de estas moléculas se produce la liberación de mediadores proinflamatorios, garantizando la tolerancia en homeostasis [35], [36].

Adicionalmente las LSECs son fundamentales para el reclutamiento de otros leucocitos de la circulación. A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los órganos donde el reclutamiento ocurre en las vénulas postcapilares [37], en el caso del hígado sucede en el mismo sinusoides. Debido a que las fuerzas de flujo en este vaso sanguíneo son mínimas, la densidad de receptores necesarios para este proceso, como las selectinas, es bajo [38]. Sin embargo, en respuesta algún tipo de estímulo nocivo, las LSECs aumentan la expresión de moléculas de la familia de las inmunoglobulinas ICAM1 o VCAM1, entre otros, para favorecer el reclutamiento [39], [40]. Otra molécula implicada en este proceso en el sinusoides sería el ácido hialurónico

(HA). Este glucosaminoglicano se encontraría en altas concentraciones en la cara luminal de las LSECs [41] gracias a receptores para el HA como LYVE1 o Stabilin1 [42], [43]. Su ligando, CD44, se expresaría en células inmunitarias, como neutrófilos o linfocitos, y facilitaría su reclutamiento en el hígado [44]. Además de estas moléculas integrales de membrana, las LSECs también contribuyen al reclutamiento leucocitario liberando citocinas quimioatrayentes directamente [45], [46] o generando dominios ricos en moléculas liberadas por otros tipos celulares, contribuyendo de esta manera a la atracción de leucocitos también (**Fig. 4**) [47].

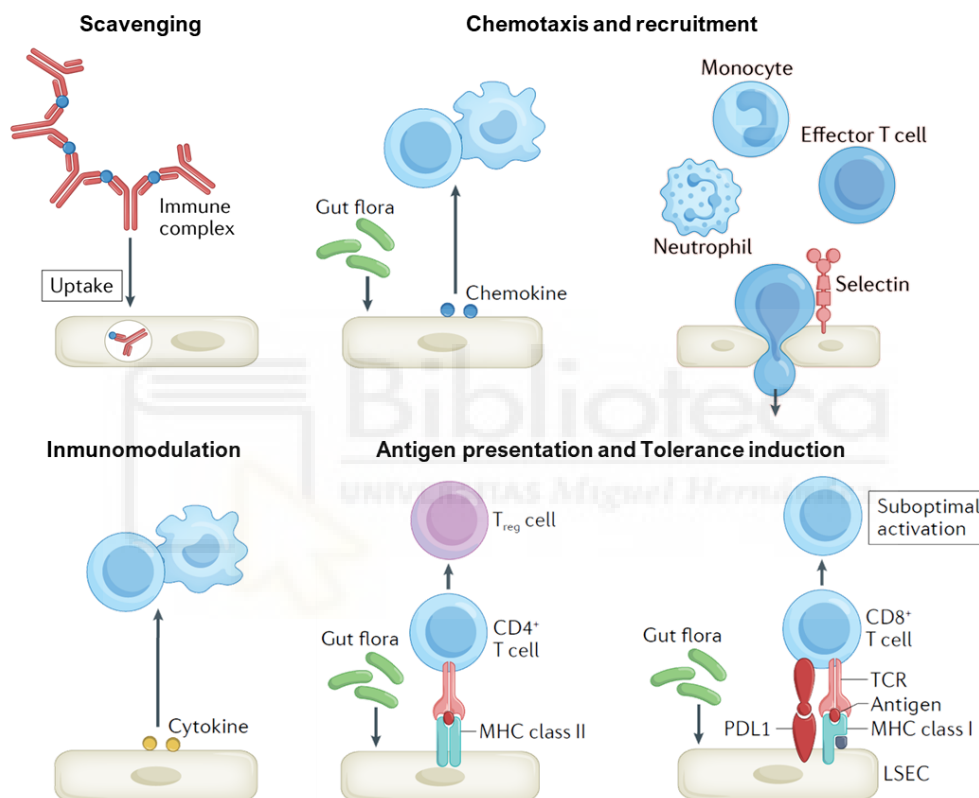


Figura 4 Funciones inmunitarias de las LSECs. Lejos de constituir simples barreras, las LSECs contribuyen activamente a la defensa del hígado. Eliminan de la circulación inmunocomplejos, virus y partículas bacterianas antes de que puedan generar daños; participan activamente en el reclutamiento de distintos leucocitos durante una respuesta inflamatoria; e inducen tolerancia local, modulando las células inmunitarias a través de la liberación de citocinas o mediante señalización por contacto directo. Imagen modificada de Amersfoort J, et al., Nat Rev Immunol. Sep;22(9):576-588 (2022).

Estrechamente relacionado con las dos funciones anteriores, las LSECs participan activamente del proceso de presentación antigénica como hemos comentado [9]. Además de los contactos estrechos que se dan entre los linfocitos y el endotelio en el proceso de migración hacia el parénquima y la regulación cruzada a través de

citocinas, la expresión de complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) I y II de forma constitutiva en LSECs permite añadir una capa de complejidad a la regulación del endotelio sobre la inmunidad adaptativa hepática (**Fig. 4**) [48]. En el caso de los linfocitos T CD8, el endotelio tiene la capacidad de presentarles antígenos endocitados a través del MHC I, lo que se conoce como presentación cruzada [49]. Como consecuencia de este proceso, las CD8 quedan retenidas en los sinusoides de una manera antígeno-dependiente, mientras son estimuladas por la presencia de PDL1 en LSECs, induciendo una regulación negativa, y por tanto tolerancia, en estas células (**Fig. 4**) [50], [51], [52]. Si nos encontramos en una situación de amenaza, por otro lado, se produce un cambio en el equilibrio de la señalización entre PD1, ligando de PDL1 en linfocitos, y el TCR, receptor de linfocitos T necesario para su activación. Este interacciona con el MHC I o II que proporcionan las LSECs y que aumenta en condiciones de amenaza [53]. Esto, junto con el ambiente inflamatorio propio de una infección, permitiría la adquisición de capacidades efectoras por parte de las CD8, contribuyendo a la defensa antiviral, por ejemplo [54], [55].

En el caso de los linfocitos T CD4 vemos que existen fenómenos similares de inducción de tolerancia. Aunque las LSECs presenten antígenos vía MHC II, los escasos niveles de la coestimulación canónica a la que dan lugar (expresión de CD80/86 o liberación IL-12) [55], son incapaces de promover la generación de células efectoras por sí solas [56]. En su lugar, se produce la inducción de poblaciones reguladoras que a su vez contribuyen a la inducción de tolerancia [46], [57], [58]. Por otro lado, si en lugar de encontrarse con células CD4 inmaduras, las LSECs interaccionan con células efectoras inflamatorias como las Th1 o las Th17, también son capaces de modular su actividad, impidiendo la liberación de citocinas [59]. Dentro de los mecanismos propuestos destacan la expresión de PDL1 en las LSECs, así como la liberación de moléculas antiinflamatorias como IL-10 o TGF β 1 [46], [59]. Si bien estos parecen no ser los únicos modos de operar de las LSECs, sí demuestra la profunda implicación del endotelio en la regulación del sistema inmunitario hepático [9].

F. LECTINAS TIPO C

Dentro de los mecanismos implicados en la inhibición de linfocitos T efectoras por las LSECs, la expresión de PDL1 siempre ha recibido protagonismo [46], [50]. Sin

embargo, en los últimos años ha aumentado el interés en el papel que juegan otras proteínas de membrana, típicamente considerados parte de la inmunidad innata, en este proceso. En ese sentido, los receptores de la familia de las lectinas tipo C (CLR) han sido considerados históricamente como moléculas implicadas únicamente en el reconocimiento y aclaramiento de PAMPs [60], [61] o el reclutamiento leucocitario [62]. Si bien estas son funciones fundamentales, también se ha demostrado la capacidad de estos receptores para modular distintos aspectos de la inmunidad, especialmente de la adaptativa [63].

Los CLRs forman una gran superfamilia de más de 1000 integrantes. Se trata de un grupo muy heterogéneo de proteínas no-inmunoglobulínicas con gran afinidad y especificidad por carbohidratos libres o complejos en forma de glucolípidos/glucoproteínas gracias a sus dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) [64]. Estas cualidades las convierten en PRRs ideales, iniciando respuestas inmunitarias en solitario o en combinación con otros receptores como los TLRs [65], [66]. Notablemente, estas mismas interacciones son capaces de inducir la expresión de diversas moléculas que promueven y regulan la diferenciación de los linfocitos T, involucrando de esta manera los CLRs en la inmunidad adaptativa [67]. Por ejemplo, Dectin1, CLR crucial en la defensa frente a hongos [68], desencadena una respuesta través de componentes de la vía del NFκB que culminan con la liberación de citocinas como IL-6 o IL-23, que son fundamentales para la diferenciación de los linfocitos Th17 [69], [70]. De una manera similar, DC-SIGN, otro conocido miembro de la familia de los CLRs, interviene en la regulación de la diferenciación linfocitaria. A pesar de que su estimulación con carbohidratos no induce *per se* la liberación de mediadores de la inflamación, DC-SIGN modula las señales de otros PRRs de una manera dependiente de ligando [71]. Cuando se expone a manosa, propia de algunas bacterias y virus, promueve la señalización de los TLRs 2 y 4 a través de la vía del NFκB [72], incrementando la liberación de IL-6 o IL-12, lo que dirige a las células T hacia un fenotipo Th1 [73]. Por el contrario, si DC-SIGN reconoce fucosa en lugar de manosa, diferencias en el sitio de unión provocan cambios conformacionales diferentes dando lugar a una señalización contraria a la de la manosa [74], [75]. La inhibición de la señalización de componentes de la vía del NFκB promueve fenotipos Th2, menos proinflamatorios, al reducirse la IL-12 necesaria para las Th1 [76]. Esta

señalización dual tiene otro ejemplo paradigmático en el caso de Dectin2 (**Fig. 5**). Incapaz de señalizar por sí sólo, colabora con el FcR γ para responder a manosas fúngicas promoviendo poblaciones Th17 al señalizar mediante la vía del NF κ B [77]. Si, por el contrario, la interacción ocurre con glucanos fúngicos o parasitarios, las diferencias conformacionales desembocan en la producción de leucotrienos en lugar de la activación de la vía del NF κ B [78]. Esta activación alternativa implica la inhibición de la señalización de otros PRRs, como los TLRs, resultando en la inducción de poblaciones con un perfil inflamatorio totalmente distinto como las Th2 [78], [79]. En resumen, estos ejemplos ilustran la contribución de los CLR a la inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa y al refinamiento de su regulación.

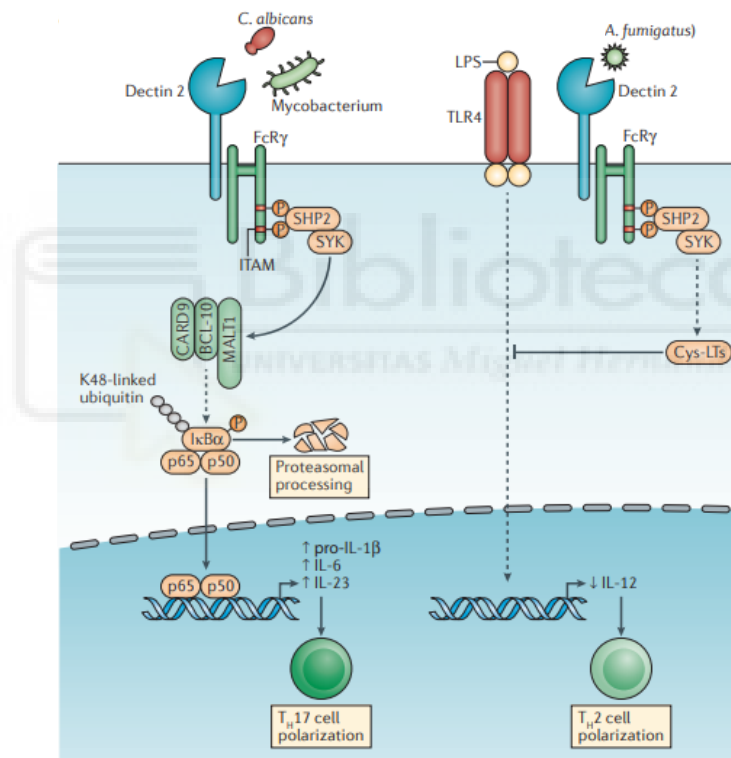


Figura 5 CLR y la modulación de la respuesta inmune adaptativa. Ejemplo esquemático de la modulación indirecta que tiene la estimulación de un CLR sobre los perfiles linfocitarios. Concretamente observamos como Dectin2, en coordinación con otros PRR como TLR4, promueve poblaciones antagónicas de linfocitos T en función del ligando que esté reconociendo. Imagen modificada de Geijtenbeek et al., Nat Rev Immunol. Jul;16(7):433-48 (2016).

G. LSECTIN

Si bien la gran mayoría de los CLR que están involucrados en la modulación de la inmunidad adaptativa se han relacionado con la inducción de al menos una de las

poblaciones de linfocitos T helper (Th), existen casos como el de CLEC4G que rompen con este paradigma. Su interacción con poblaciones inmunitarias, principalmente linfocitos T, genera inhibición en lugar de activación [80] lo que la convierte en una molécula con un potencial modulador en el campo de la inmunobiología.

También conocida como LSEctin (acrónimo de *Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin*), esta proteína está fundamentalmente expresada en LSECs, como su nombre sugiere, y desde el momento en el que se describió por primera vez, se involucrado en distintos procesos de reconocimientos de estructuras glucosiladas en patógenos como otras lectinas [81], [82]. Podemos encontrar el gen de LSEctin en el cromosoma 19p13.3 situado en un *cluster* de CLR's junto con CD23, DC-SIGN y DC-SIGNR, siendo muy similares en su estructura genómica [81]. Este gen de nueve exones (**Fig. 6**), codifica una proteína transmembrana de tipo II de 293 aminoácidos organizados en diferentes dominios. En su extremo C-terminal encontramos un dominio lectina con la composición y secuencias conservadas propias de un CRD, junto con diversos dominios adicionales de unión a calcio que son fundamentales para el reconocimiento de glúcidos. Estos le otorgan a LSEctin la capacidad de unir manosa o N-Acetilglucosamina entre otros [81], [83]. Adicionalmente, podemos encontrar una región de cuello, algo menos conservada con sus homólogos, una única región transmembrana y, por último, una región N-terminal citoplasmática carente de dominios ITAM o ITIM de transducción, pero en la que se hallan dominios de internalización potencialmente importantes durante la fagocitosis [84], [85], [86].

Además de su expresión en el endotelio hepático, LSEctin también se expresa en células mieloides bajo ciertas condiciones. Se ha demostrado su expresión *in vitro* en células dendríticas y macrófagos tras la adición de IL-4 al medio [83]. Esta inducción se ha relacionado además con la promoción de la fagocitosis necesaria para la presentación antigénica [86], [87]. Notablemente, en estas poblaciones se puede detectar la presencia de varias isoformas de LSEctin de una manera similar a lo que ocurre en el caso de DC-SING [88]. Estas isoformas podrían modular la función de LSEctin, especialmente la isoforma $\Delta 2$ que carece de región transmembrana [83].

LSECTin $\Delta 2$ podría liberarse de forma soluble ejerciendo de agente opsonizante por sus capacidades como PRR.

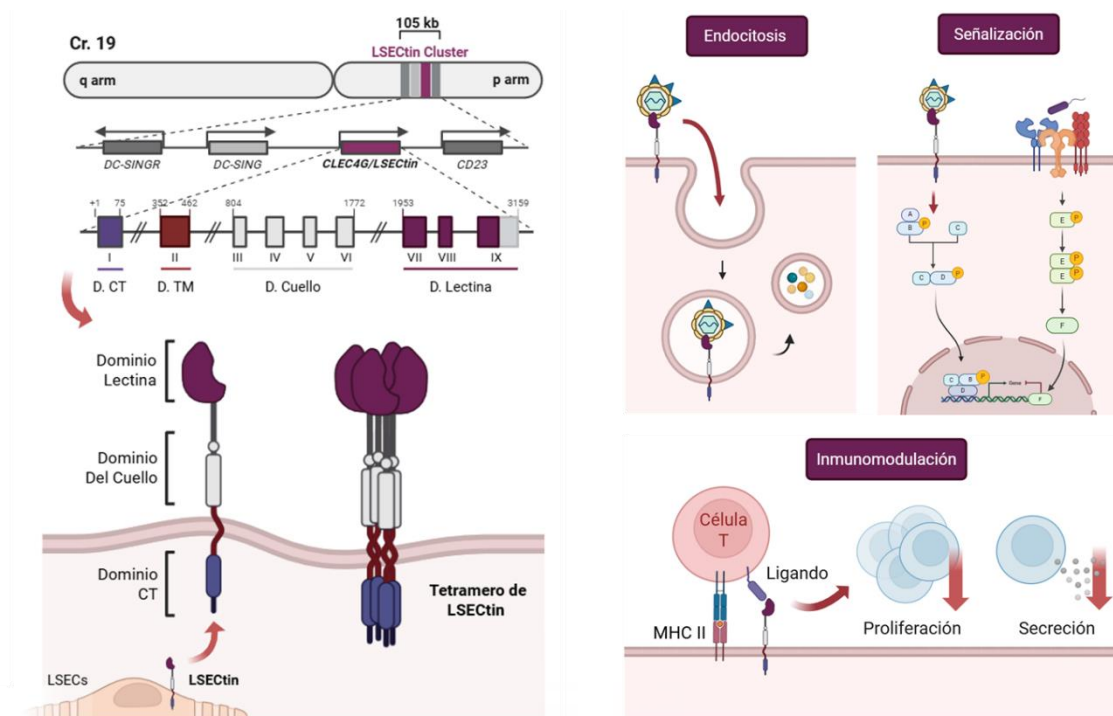


Figura 6 LSECTin, estructura y funciones. LSECTin se encuentra acompañada en el genoma con otros CLRs homólogos como DC-SING. Estructuralmente posee un dominio de lectina, un cuello, un dominio transmembrana (TM) y un dominio citosólico (CT). Esta lectina se ha implicado en procesos de reconocimiento de patógenos, interviniendo en la fagocitosis de los mismos y generando respuestas adecuadas en combinación con otros PRRs. Notablemente, se ha implicado en la modulación de linfocitos T indicando que podría formar parte de mecanismos de tolerancia hepáticos. Imagen generada en BioRender.com.

En el sistema digestivo, una población de origen mieloide que podría expresar LSECTin, al menos *in vitro*, serían las KCs hepáticas. Éstas, en respuesta a la IL-4, inducirían la expresión de LSECTin a través del factor de transcripción PU.1 [85]. En los macrófagos intestinales, por otro lado, LSECTin parece ser crucial para la reparación del tejido en respuesta a daños generados por inflamación. Concretamente, LSECTin estaría implicada en el reconocimiento y fagocitosis de los cuerpos apoptóticos producidos durante el daño intestinal, induciendo en los macrófagos que eliminan estos restos capacidades antiinflamatorias a través de mTOR [89], [90].

En el caso de las LSECs, la expresión de LSECTin parece cumplir dos funciones principales. La primera consistiría en el aclaramiento de partículas virales y la generación de una respuesta apropiada en consecuencia. Entre otros virus, LSECTin

puede reconocer el virus del ébola [91], virus de la familia *coronaviridae* [92], así como el virus de la hepatitis C [93], participando potencialmente en su aclaramiento (**Fig. 6**). A su vez, gracias a proteínas adaptadoras como DAP12 que sí contiene dominios ITAM, LSECtin induciría cascadas de señalización a través distintas proteínas, incluidas las MAPKs, que activarían la expresión de citocinas proinflamatorias y, por tanto, promoverían una respuesta inmunitaria frente a los virus [94].

En cuanto a la segunda función, más interesante si cabe, se ha demostrado que LSECtin es capaz de inhibir la actividad de linfocitos T activados en el hígado [80], [95]. Esta lectina es capaz de interactuar tanto con linfocitos CD4 como CD8 induciendo una reducción de su proliferación, así como de la liberación de sus citocinas características (**Fig. 6**). Uno de los mecanismos propuestos implica la interferencia de LSECtin en la señalización temprana del TCR mediante la activación de la ligasa de ubiquitina Cbl-b [96] que, a su vez, sería responsable de inhibir moléculas clave para la señalización de este receptor como ZAP70 [80], [95]. Como consecuencia, obtendríamos una inducción de tolerancia que parece fundamental durante patologías hepáticas inflamatorias. Concretamente, al someter animales *Knock out* (KO) para LSECtin a modelos de hepatitis aguda, estos sufrían un daño exacerbado en el hígado caracterizado por una expansión de las células T proinflamatorias y una destrucción acelerada del parénquima. Notablemente, tanto la administración de LSECtin recombinante como la administración de un plásmido que contenía el gen para esta lectina fueron suficientes para rescatar el fenotipo de los animales KO [80] destacando el papel de LSECtin en la homeostasis hepática.

Desde entonces, LSECtin ha despertado bastante interés en distintos campos por su capacidad de modular las respuestas inmunitarias T dependientes. Por ejemplo, tanto su capacidad de interactuar con proteínas de membrana, relacionándola en el reclutamiento, como su capacidad de inhibir la respuesta de las células T, han demostrado estar implicadas en la formación de metástasis, así como en la progresión tumoral [97], [98], [99], [100]. De hecho, la expresión de LSECtin en el endotelio hepático, podría ser responsable de la agresividad y tropismo del carcinoma colorrectal hacia el hígado [101], [102], razón por la cual esta lectina podría funcionar

como biomarcador de pronóstico en este proceso [101] o incluso como diana terapéutica en situaciones similares [103].

En referencia a los ligandos de LSECtin a través de los cuales es capaz de conseguir su efecto inhibitorio en los linfocitos T se ha especulado sobre varias posibilidades. En primer lugar, se identificó a CD44 como el primer ligando endógeno de LSECtin [104]. Se trata de un receptor de HA que está presente en una gran diversidad de células, especialmente leucocitos activados [105]. Su papel concreto en linfocitos T se ha vinculado casi exclusivamente con el reclutamiento y la migración hacia regiones inflamadas [106], fomentando su activación y supervivencia [107]. En cuanto a su interacción con LSECtin, de la gran variedad de isoformas que presenta CD44, las que interactúan con esta lectina de forma selectiva son CD44s, CD44v4 y CD44v8-10 [104]. Sin embargo, dado su papel conocido en la biología del linfocito como activador, es improbable que se produzca la inhibición característica de LSECtin a través de este receptor y que, en su lugar, la interacción CD44-LSECtin esté más relacionada con procesos de reclutamiento como ocurre con otros CLRs [96], [108], [109], [110].

Otro potencial ligando de LSECtin recientemente descubierto es BTN3A3 [97] que pertenece a la familia de proteínas B7, como PDL1 y PDL2, reguladoras conocidas de la respuesta inmunitaria. Esta proteína ha sido relativamente poco estudiada encontrándose vinculada con el reclutamiento y función de los linfocitos T $\gamma\delta$ principalmente [111]. Si bien homólogos cercanos como BTN2A2 si parecen estar involucrados en la regulación negativa de linfocitos y la inducción de poblaciones FOXP3+ [112], [113], las únicas evidencias que se han hallado hasta el momento para la interacción BTN3A3-LSECtin sólo la relacionan con la progresión tumoral de una manera independiente de linfocitos T [97].

Finalmente, el tercer candidato descrito hasta el momento, y el que tiene mayor potencial de ser el responsable de la inhibición de los linfocitos por parte de LSECtin, es LAG3 [99]. Aunque es en el contexto de la progresión del melanoma, se observaba cómo la expresión de LSECtin en estas células tumorales promovía la presencia de Tregs en el tumor mientras reducía la presencia y actividad de células T efectoras de una manera LAG3 dependiente [99]. LAG3, a diferencia de los otros candidatos a ligandos de LSECtin, actúa como inhibidor linfocitario [114]. Se expresa

preferentemente en linfocitos T activados en los que provoca una reducción en la expansión e infiltración, además de contribuir a generar estados de agotamiento (*exhaustion*) en estos [115], [116]. Mecanísticamente, LAG3 podría inhibir al linfocito T de varias maneras. Por un lado, a través de su interacción de MHC II como análogo de CD4 podría competir con esta molécula impidiendo la activación linfocitaria [117]. Por el otro, y gracias a sus dominios citoplasmáticos [118], LAG3 podría inhibir a los linfocitos sin necesidad de unir un MHC II. Concretamente, podría asociarse a complejos CD3-TCR en *cis* (dentro de la misma célula), previniendo la señalización temprana del propio TCR y sus coreceptores [119]. En definitiva, LAG3 ha demostrado ser una molécula clave en procesos de inmunomodulación, constituyendo una diana terapéutica clave en enfermedades autoinmunes y en cáncer [120], [121]. No obstante, su papel en el hígado, dónde encontramos LSECtin en endotelio no está definido.

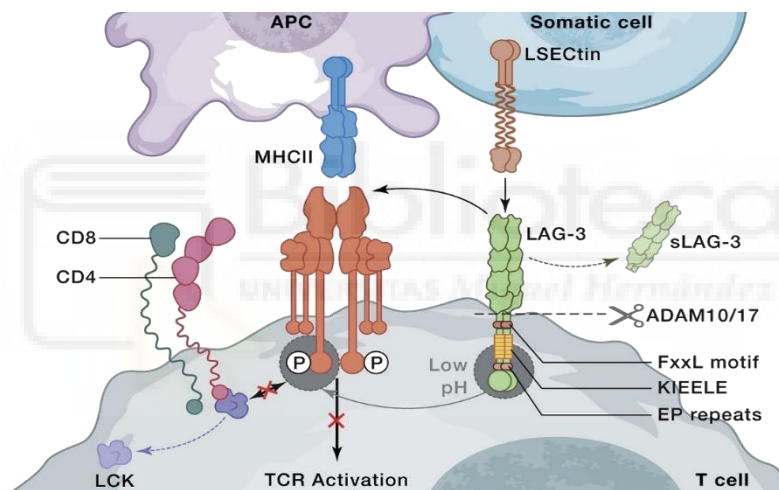


Figura 7 LAG3, ligando de LSECtin. De todos los candidatos a ligando de LSECtin en el proceso de inhibición linfocitaria, el más compatible con los efectos descritos para esta lectina es sin duda LAG3. Esta proteína es conocida por inhibir la señalización del TCR promoviendo la inhibición del linfocito T Imagen modificada de Joller N, et al., *Immunity*. Feb 13;57(2):206-222. (2024).

H. CIRROSIS HEPATICA

El hígado tiene una función inmunológica importante para el organismo, especialmente por su capacidad de inducción de tolerancia y los múltiples mecanismos, entre los que encontramos a LSECtin, que tiene para conseguirlo [14]. No obstante, daños al hígado, en especial los crónicos, sobrepasan estas capacidades tolerogénicas induciendo una inflamación sostenida que está en la base de muchas patologías hepáticas [122], [123].

Entre estas, quizás una de las más relevantes por su coste económico y humano sea la cirrosis hepática [124], [125].

La cirrosis hepática es la 11ª causa de muerte a nivel mundial y la 4ª a nivel europeo, suponiendo más de 1 millón de muertes anuales 2023 [126]. Debido a que sintomatológicamente la cirrosis es fundamentalmente silenciosa hasta que ha habido una progresión alta de la enfermedad, suele diagnosticarse de manera accidental o en fases avanzadas [126]. En estas, hay una mayor presencia de complicaciones derivadas de la pérdida de la función hepática, lo que contribuye a la mortalidad y a la dificultad de tratamiento de cirrosis. Aunque ya no se considera una enfermedad terminal, muchas veces el tratamiento se ve encaminado al control de los síntomas mediante cambios al estilo de vida y terapia farmacológica para mejorar el bienestar de los pacientes [127]. A pesar de ello, el trasplante hepático sigue siendo la única opción en el caso de los más graves implicando cerca de 35000 trasplantes anuales [128]. La búsqueda de terapias alternativas, por tanto, es un campo de estudio fundamental ya que se estima que cerca de 120 millones de personas padecen cirrosis actualmente en el mundo [129].

En cuanto a su etiología, las causas más frecuentes de esta patología son el progreso crónico de enfermedades hepáticas derivadas del consumo de alcohol, enfermedades metabólicas asociadas a hígado graso, infecciones por los virus de la hepatitis B y C y, en menor medida, enfermedades autoinmunes o colestásicas (**Fig. 8**) [124], [130]. En lo referente a su fisiopatología, es considerada el estadio final en el curso de distintas las enfermedades hepáticas crónicas que hemos mencionado. Independientemente del factor etiológico, la exposición prolongada a los daños provocados por los diversos desencadenantes promueve la aparición de los dos signos característicos de la cirrosis: inflamación necrótica y fibrosis (**Fig. 8**) [130]. La muerte de las células hepáticas por los daños iniciales, así como un aumento de la traslocación bacteriana por la pérdida del equilibrio en la comunicación enterohepática [131], resultan en un aumento de la carga antigénica que recibe el hígado. Los PRR de las distintas células con capacidad de respuesta que hemos mencionado, producen en consecuencia la liberación citoquinas proinflamatorias (TNF α , IFN γ , IL-6, etc.) y quimioatrayentes (CCL2, CCL5, CXCL8, etc.), además de proteínas de fase aguda, que contribuyen al

reclutamiento leucocitario y a distintos efectos sistémicos [132]. Si la fuente del daño persiste, se genera un ciclo de retroalimentación positiva entre la respuesta inmunitaria y la muerte del tejido hepático que contribuye a la pérdida de parénquima [123]. Adicionalmente, este fenómeno, en un primer momento local, acaba perjudicando el resto del organismo. Tanto los niveles altos de mediadores inmunitarios, como de los productos bacterianos debido a la traslocación bacteriana desregulada, se han señalado como contribuyentes a los defectos cardiacos, renales o neurológicos propios de esta patología [132], [133], [134]. De hecho, este ambiente altamente proinflamatorio se ha propuesto como una de las causas detrás de la aparición del hepatocarcinoma en cirrosis (**Fig. 8**) [135].

Uno de los principales promotores de este proceso inflamatorio son los linfocitos T. Cuando la actividad inflamatoria supera a la tolerogénica proliferan poblaciones linfocitarias de memoria con capacidad efectora [136]. Concretamente, en la cirrosis hepática encontramos un desequilibrio entre las respuestas adaptativas inflamatorias (Th1/Th17) y las regenerativas (Th2/Treg) [122], [137]. La presencia en el medio de IL-6 y de IL-1 β , propio de la cirrosis, genera un aumento de Th17 que las necesitan para su diferenciación [138]. El crecimiento de esta población correlaciona con elevados niveles de IL-17 en el hígado que activan a las HSCs y KCs promoviendo fibrosis e inflamación en la cirrosis [139], [140]. De hecho, el bloqueo de la IL-17 mediante el uso de anticuerpos protegen frente al daño hepático [141], resaltando el papel de los linfocitos, y en especial de los Th17, en la progresión de enfermedades hepáticas como la cirrosis.

Durante el proceso de destrucción del parénquima hepático, la presencia de células dañadas y de mediadores inflamatorios en el ambiente, promueven la activación de las HSCs. Éstas adquieren marcadores profibrogénicos como el α SMA, así como la capacidad de producir componentes de la matriz extracelular entre los que destaca el colágeno tipo 1 (**Fig. 9**) [142]. Como consecuencia, los hepatocitos y colangiocitos dañados son reemplazados por tejido cicatrizal, perdiéndose la microarquitectura del hígado y con ello su función (**Fig. 8**) [130]. Además, este proceso también compromete la circulación hepática. La pérdida directa de vasos, así como la reducción de la luz de muchos otros por la fibrosis, contribuye a una resistencia hepática generalizada a la

circulación que llega a favorecer la pérdida de parénquima por falta de irrigación [143]. A su vez, esta resistencia al flujo hepático desencadena un aumento en la presión portal y otras alteraciones de la circulación sistémica, como un aumento de la presión arterial pulmonar y renal, que también contribuyen a deteriorar el estado de los pacientes [124], [126].

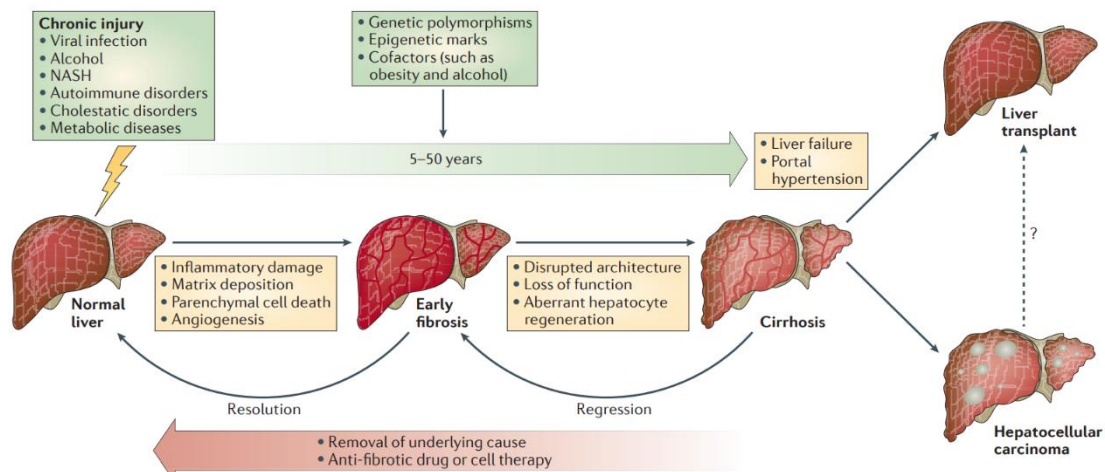


Figura 8 Progresión de la cirrosis. La cirrosis hepática consiste en el deterioro progresivo de la función hepática a consecuencia de una inflamación y fibrogénesis excesiva debido a la exposición crónica a diversos factores. Interesantemente, estos procesos se pueden revertir si se atajan a tiempo los factores desencadenantes. Imagen modificada de Pellicoro A, et al., Nat Rev Immunol. Mar;14(3):181-94 (2014).

Uno de los aspectos importantes de la resistencia vascular hepática en cirrosis, primero como consecuencia de esta, y después como su promotor principal, es la disfunción endotelial [144]. En respuesta a los distintos estímulos dañinos mencionados, entre los que se encuentra las propias fuerzas del flujo sanguíneo en el hígado cirrótico [145], las LSECs dejan de liberar vasodilatadores como el óxido nítrico mientras que aumentan la liberación de agentes vasoconstrictores contribuyendo a esta resistencia vascular [146]. Además, inician procesos de capilarización caracterizados por la pérdida de las fenestraciones propias de estas células y la aparición de una membrana basal que dificultan el acceso al oxígeno por parte de los hepatocitos [147]. Por otro lado, van perdiendo sus capacidades metabólicas mientras promueven respuestas proinflamatorias en lugar de tolerogénicas. Liberan citocinas y quimiocinas a través de la vía del NFκB y aumentando los niveles de moléculas de adhesión que favorecen el reclutamiento leucocitario y la activación de las HSC [148],

[149], [150] lo que señala a las LSECs como una de las entidades que promueven la progresión de la cirrosis una vez han sufrido algún daño (**Fig. 9**) [147].

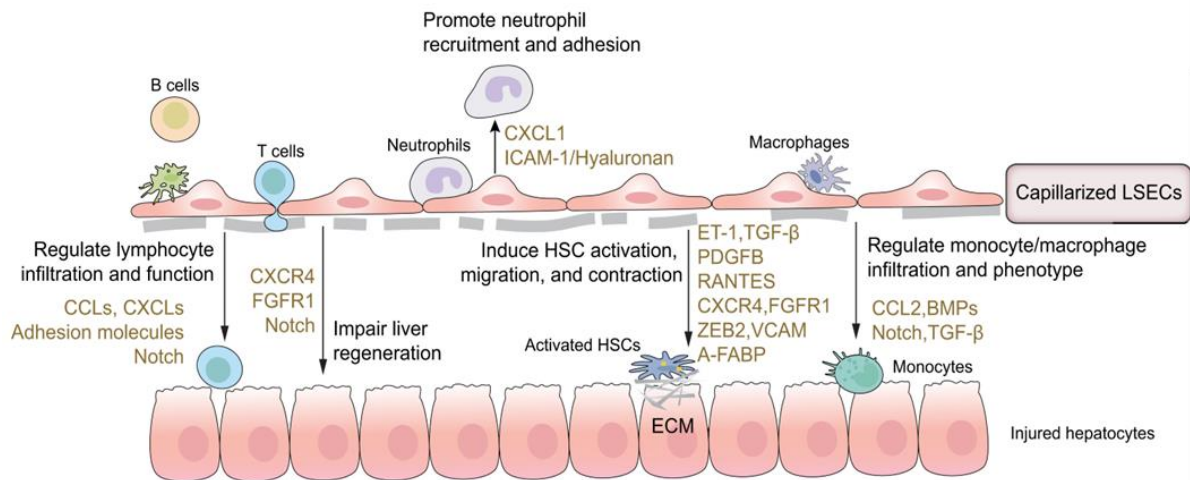


Figura 9 Cambios funcionales de las LSECs dañadas. Tras perder sus fenestraciones y desarrollar una membrana basal en respuesta al daño (capillarización), las LSECs favorecen distintos aspectos de la progresión de la cirrosis. Por un lado, los mediadores que liberan contribuyen a la activación de las HSC y por tanto a la fibrogénesis. Por otro, estos mediadores tan bien participan del reclutamiento y activación de otros leucocitos promoviendo el daño inflamatorio. Imagen modificada de Gao J, et al., J Hepatol. Sep;81(3):543-561 (2024).

Otro de los mecanismos de tolerancia que pierden las LSECs en cirrosis es la capacidad promover poblaciones reguladoras e inhibir poblaciones inflamatorias en linfocitos T [46], [59], [80]. Notablemente, la expresión de PDL1, TGFβ1 o IL-10, que son reconocidos entre los responsables de este proceso, se encuentran aumentados en LSECs y otras poblaciones del hígado durante la cirrosis hepática [132], [151], [152], [153], indicado una capacidad comprometida para la inmunomodulación por parte de estas moléculas. En contraste, trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado como las LSECs cirróticas aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras, como CD40, CD80 o CD86 [154], probablemente en respuesta al medio proinflamatorio de las CLD que promueve la expresión del MHC II también [48]. Su capacidad como APCs aumenta consecuentemente en estas condiciones, lo que les permite estimular la diferenciación de linfocitos Th17 mientras que se restringe la de poblaciones reguladoras [154]. Respecto a las causas que generan este cambio inmunológico en las LSECs, los niveles elevados de PDL1 hepático en cirrosis indicaban que debía de existir, por consiguiente, otros mecanismos de tolerancia en paralelo que sí se alterasen en esta patología y que contribuyesen a la desregulación

proinflamatoria del endotelio. Por tanto, en este mismo trabajo de nuestro laboratorio, se estudiaron los cambios de expresión de distintos receptores innatos que, como hemos visto, influyen en la inmunidad adaptativa [63]. Los TLRs, por ejemplo, se encontraban aumentados para hacer frente al exceso de carga antigénica propio de la cirrosis. Otros, como LSEctin, se encontraban reprimidos, señalando a esta lectina como potencial mecanismo de pérdida de tolerancia en el hígado cirrótico [154].

Considerando el rol de LSEctin en la inhibición de linfocitos T, resulta de interés conocer el papel de esta lectina inmunomoduladora en patologías inflamatorias crónicas del hígado, como la cirrosis, así como explorar su potencial como diana terapéutica en la recuperación de la tolerancia hepática.





JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La desregulación del sistema inmunitario local es uno de los pilares de la fisiopatología de la enfermedad hepática crónica avanzada. El hígado, promotor de tolerancia inmunológica en homeostasis, transiciona a un estado inflamatorio en cirrosis que contribuye al deterioro del órgano. Durante este proceso, la disfunción del eje hígado-intestino favorece la saturación del tejido hepático con antígenos de una microbiota disbiótica. Por otro lado, leucocitos locales y reclutados, especialmente los linfocitos, ponen en marcha respuestas proinflamatorias potentes a consecuencia de este aumento de la carga antigénica, a la presencia de restos de células propias dañadas y a la pérdida de los mecanismos inductores de tolerancia hepáticos.

Uno de los tipos celulares responsables de esta tolerancia son las LSECs. El endotelio hepático interviene en el reclutamiento y en la modulación de la actividad de los linfocitos del hígado mediante diversos mecanismos. Entre las estrategias de inactivación linfocitaria en las LSECs se encuentran una presentación antigénica sin coestimulación o la expresión de ligandos como PDL1 o TGF β 1. Sin embargo, la expresión aumentada de estas moléculas en cirrosis sugiere la presencia de mecanismos adicionales de tolerancia que contribuyan a explicar los cambios que se observan en la patología. LSECTin es una CLR de expresión casi exclusiva en LSECs que, además de funcionar como PRR, posee la capacidad de regular negativamente linfocitos T. LSECTin inhibe su proliferación y la liberación de citocinas, siendo fundamental en el control de la inflamación en fenómenos patológicos agudos. No obstante, su papel en enfermedades crónicas como la cirrosis es desconocido. Resultados de nuestro laboratorio sugieren que las LSECs pierden la expresión de LSECTin durante esta patología, lo que podría explicar la progresión hacia una inflamación progresiva a pesar de los altos niveles de PDL1 o TGF β 1. Por tanto, un estudio detallado del papel de esta lectina en cirrosis, así como de los mecanismos moleculares con los que opera podría ofrecer nuevas oportunidades terapéuticas en esta patología tan grave.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5. HIPÓTESIS

La pérdida de LSEctin modula la actividad de los linfocitos proinflamatorios mediante ligandos concretos (LAG3). Restablecer su expresión durante la cirrosis hepática contribuye a restaurar la capacidad tolerogénica del hígado, reduciendo el daño en el tejido.

6. OBJETIVOS

1. Caracterizar la señalización de LSEctin en LSECs frente a sus ligandos presentes en linfocitos T y su papel en la modulación de las respuestas inducidas por TLRs.
2. Determinar los niveles de expresión de LSEctin durante la enfermedad hepática crónica, y caracterizar la modulación que ejercen distintas citocinas propias de la enfermedad sobre la expresión de esta lectina.
3. Caracterizar el daño hepático y el perfil inmunológico que provoca la modulación de los niveles de LSEctin (sobreexpresión) durante la enfermedad hepática crónica avanzada.
4. Profundizar en el mecanismo molecular subyacente a la modulación de la actividad de linfocitos proinflamatorios producido por LSEctin.



MATERIALES Y MÉTODOS

7. RESUMEN GLOBAL DE MATERIALES Y MÉTODOS

A. PACIENTES Y MUESTRAS HUMANAS

En colaboración con el grupo de Biología Vascular Hepática (IDIBAPS/Hospital Clinic de Barcelona), se utilizaron muestras de hígado humano remanentes de resecciones quirúrgicas en ambos estudios. En el caso de controles sanos se seleccionó tejido hepático no tumoral y sin lesiones (n=12). Se compararon con explantes de tejido hepático cirrótico con etiología de esteatohepatitis alcohólica o no alcohólica de pacientes sometidos a trasplante de hígado. Los pacientes cirróticos se agruparon en enfermedad compensada (n=12) o descompensada (n=14) en función de sus características clínicas (**Tabla 1**). En esta tabla se recogen el total de los pacientes, aunque se emplearon subgrupos en función del estudio.

Tabla 1. Características de los pacientes.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	SANOS	COMPENSADOS	DESCOMPENSADOS
EDAD (AÑOS)	64.8 ± 14	60.2 ± 5.2	60.5 ± 6.8
VARÓN, N (%)	9 (64.3)	10 (83.3)	10 (71.4)
ETIOLOGÍA ALCOHOLICA, N (%)	-	9 (75)	11 (78.5)
ETIOLOGÍA NASH, N (%)	-	3 (25)	3 (21.5)
CHILD PUGH A/B/C	-	11/1/0	0/6/8
MELD	-	9.5 ± 2.3	20.8 ± 8.4
N	12	12	14

Este estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y con las leyes locales y nacionales. El Comité de Ética Humana del Hospital Clinic de Barcelona aprobó los procedimientos del estudio (HCB/2015/0624), y todos los participantes firmaron voluntariamente un consentimiento informado por escrito antes de su inclusión en el estudio.

B. RATONES TRANSGÉNICOS Y GENOTIPADO

El ratón de sobreexpresión de LSECtin (OE de LSECtin) o modelo *Knock-in* (Ki) se generó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud de la

Universidad de Copenhague. En resumen, el ADNc *Clec4g* (ENSMUST00000062037) se clonó en el plásmido pcDNA3.1 bajo el control del promotor ubicuo del citomegalovirus (CMV). Después de liberar el segmento CMV-*Clec4G* del vector (**Fig. 10**), se inyectó en los pronúcleos de los cigotos C57BL/6NRj, lo que promovió su inserción en una ubicación aleatoria en el genoma del ratón. Se seleccionaron las crías sanas positivas para la inserción y se cruzaron para establecer una colonia. La descendencia de estos ratones fue sometida a un análisis de genotipado para determinar la inclusión del transgén intacto antes de incluirlo en los experimentos. No se encontraron diferencias fenotípicas entre los ratones Ki no tratados y los ratones silvestres no tratados.

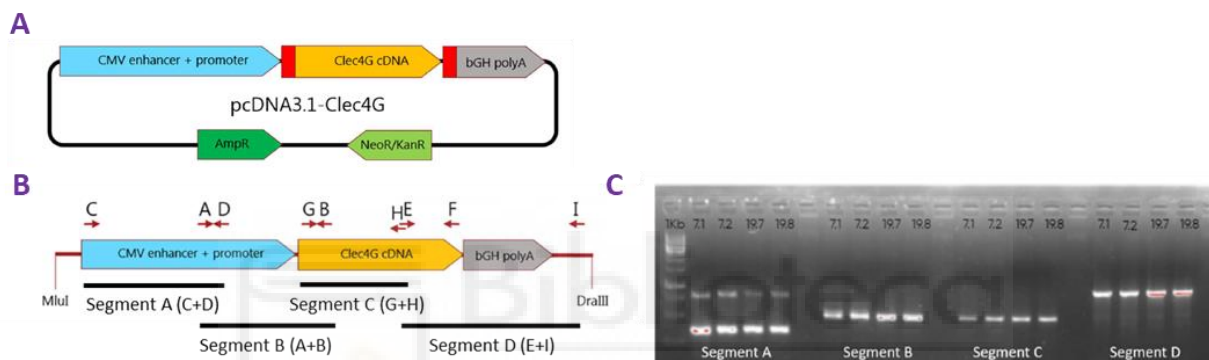


Figura 10 Transgén y genotipado. (A) Esquema del vector clonación que incluye la fusión traduccional del cDNA de *Clec4g* (LSEctin) y el promotor del CMV. (B) Estrategia de genotipado que permiten amplificar todo el transgén una vez insertado en el genoma del ratón. (C) Ejemplo de genotipado de individuos positivos. Imagen modificada de Martínez-López, et al., JHEP Rep. In press (2025).

El genotipado se realizó tras el destete. Se extrajo ADN de muestras de oreja y se analizó mediante PCR. La digestión del oído se realizó utilizando una solución con 25 mM de NaOH y 0,2 mM de EDTA. Después de 30 minutos a 98 °C, la digestión se neutralizó con TRIS HCl 40 mM pH = 7,4. A continuación, el ADN se aisló mediante un vórtex seguido de una centrifugación a 13 000 rpm durante 5 minutos a 22 °C. El ADN se añadió a la mezcla con el kit Taq PCR Master Mix (201445, Qiagen) y los cebadores. El resultado se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % preparado con tampón Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X y como agente de tinción se usó GelRed® (SCT123, Merck) (**Fig. 10**).

C. INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE CIRROSIS

Se incluyeron ratones macho *Wild type* (Wt) (C57Bl/6J) (Harlan, Barcelona, España) y LSECTin OE en un protocolo de estudio de 12 semanas. Los ratones fueron mantenidos a una temperatura ambiente constante de 21 °C y expuestos a un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas. Se alimentó a ratones adultos de aproximadamente 20-22 g con comida estándar para roedores y se les administró fenobarbital a 0,25 mmol/L en agua del grifo a lo largo del protocolo del estudio. Después de 4 semanas, se indujo experimentalmente la cirrosis en los animales con dos dosis semanales de CCl₄ (Sigma Aldrich, Madrid, España) controladas por peso por vía intragástrica, administradas como se ha descrito anteriormente[155]. Los animales de control recibieron aceite mineral durante ese periodo. Los animales fueron sacrificados por precaución en caso de encontrarse gravemente enfermos y se sospechaba que la muerte era inminente. Las laparotomías se realizaron bajo anestesia con isofluorano en la semana 12, como se ha descrito. Durante este proceso, se recogieron muestras de sangre mediante punción cardíaca antes de la perfusión. Después de la perfusión hepática, los hígados se reservaron para experimentos de biología molecular e histología o para experimentos de citometría de flujo. Los animales recibieron cuidados de acuerdo con los criterios descritos en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación Animal de la Universidad Miguel Hernández (Alicante, España) con el número de aprobación 2024/VSC/PEA/0180.

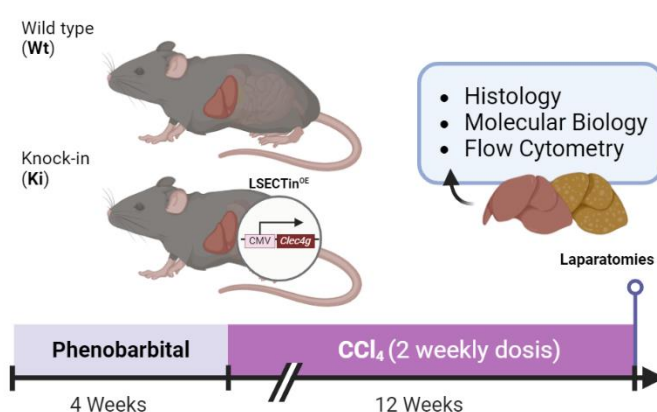


Figura 11 Modelo murino de cirrosis experimental. Esquema simplificado del protocolo de inducción de cirrosis. Animales Wt sólo (primer estudio) o en paralelo con animales Ki de sobre expresión de LSECTin (segundo estudio), recibieron 4 semanas de fenobarbital (inductor de actividad hepática), seguido de 12 semanas de CCl₄ (inductor de daño hepático) ajustado por peso. Tras este periodo, se sacrificaron los animales para estudiar distintos aspectos de la patología hepática. Imagen modificada de Martínez-López, *at al.*, JHEP Rep. In press (2025).

D. CITOMETRÍA DE FLUJO

Los hígados perfundidos se digirieron *in vivo* con colagenasa A (Merck-Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) como se ha descrito anteriormente [156]. Los hígados digeridos resultantes se extirparon y se realizó una digestión *in vitro* con el mismo tampón que contenía colagenasa A 37 °C durante 30 minutos. A continuación, la solución de células hepáticas se filtró utilizando coladores de nailon de 100 µM y se recogió en solución fría de Krebs que contenía HEPES 25 mM. La suspensión celular se centrifugó a 50 x g durante 5 minutos, y las células no parenquimatosas se separaron recogiendo los sobrenadantes y centrifugándolos a 800 x g durante 10 minutos. Los pellets resultantes se resuspendieron en 10 ml de Percoll al 40 % y las células no parenquimatosas se enriquecieron y aislaron mediante centrifugación diferencial a 800 x g durante 25 minutos. Se recogieron las células del pellet, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (PBS) y se resuspendieron en PBS suplementado con suero fetal (FBS) al 2 % y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM para la tinción citométrica. A continuación, las células aisladas se incubaron con los anticuerpos correspondientes de cada panel de citometría (**Tabla 2**). Para evaluar el perfil de diferenciación Th CD4, las células se estimularon con acetato de forbol miristato/ionomicina (50 ng/mL y 1 µg/mL, respectivamente) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante 5 h, y se bloqueó el tráfico de Golgi con monensina (BD Golgi STOP, BD Biosciences). A continuación, las células se fijaron, permeabilizaron y se tiñeron intracelularmente. Las muestras se analizaron en el laboratorio de ómicas del Instituto de Neurociencias de Alicante en un citómetro de flujo FACSAria II operado por el software FACSDiva (BD Biosciences, San Diego, CA, EE. UU.).

Tabla 2. Anticuerpos de citometría de flujo.

PROTEÍNA	DIANA	DILUCIÓN	DISTRIBUIDORA	CONJUGACIÓN
CD3	Mouse	1:200	Biologend	PE
CD4	Mouse	1:200	Biologend	FITC
CD8	Mouse	1:100	Biologend	BV510
CD69	Mouse	1:100	Biologend	APC
PD-1	Mouse	1:100	Biologend	PE
CD25	Mouse	1:200	Biologend	PE-Cy7
LY6C	Mouse	1:200	Biologend	FITC

LY6G	Mouse	1:200	Biolegend	BV421
LAG3	Mouse	1:100	Biolegend	APC
IL-17	Mouse	1:50	Biolegend	APC
IL10	Mouse	1:50	Biolegend	PE-Cy7
INFF	Mouse	1:100	Biolegend	APC
LAG3	Mouse	1:100	Biolegend	BV421
FOXP3	Mouse	1:50	ThermoFisher	APC
CD45	Mouse	1:100	BD Biosciences	APC
CD31	Mouse	1:100	BD Biosciences	FITC
CD146	Mouse	1:100	BD Biosciences	PE
LSECTIN (RB)	Mouse	1:50	Abcam	-
ANTI-RABBIT	Rabbit	1:50	Santa Cruz	PE-Cy7

E. CELL SORTING

En el caso del primer estudio se realizaron, adicionalmente, aislamientos de poblaciones puras de LSECs mediante *Cell sorting* por citometría de flujo. En ese sentido, tras un protocolo de procesamiento del tejido hepático similar al anterior, las LSECs se enriquecieron con una centrifugación en gradiente de densidad a 800 x g durante 25 minutos utilizando Percoll al 25 % y al 50 %. En este caso, se recogieron células de la interfase, se lavaron PBS y se procedió a realizar un pool de 5 ratones para obtener suficientes LSEC para experimentos posteriores de cultivo células. Respecto a la tinción de citometría, las muestras se incubaron con anti-CD45-APC, anti-CD31-FITC y anti-CD146-PE (BD Biosciences, San Diego, CA, EE. UU.). Al mismo tiempo, se utilizó un anticuerpo anti-LSECTin (Abcam, Cambridge, Reino Unido) para evaluar los niveles de LSECTin con un anticuerpo secundario α -Rabbit-PEcy7 (Santa Cruz, EE. UU.). Las LSEC se clasificaron y se aislaron como CD45-, CD31+ y CD146+ [157] en la instalación de ómicas del Instituto de Neurociencias de Alicante en un citómetro de flujo FACSAria II operado por el software FACSDiva (BD Biosciences, San Diego, CA, EE. UU.).

F. AISLAMIENTO DE CD4, DIFERENCIACIÓN Th17 o Treg Y SEÑALIZACIÓN DOWNSTREAM DE TCR E IL-6

Para obtener las células CD4+ necesarias para los experimentos *in vitro*, se extrajeron bazos de los ratones de control y *Wild type* de los protocolos anteriores. Las CD4+ se obtuvieron mediante separación magnética con el kit de aislamiento de células T CD4+

(Miltenyi Biotec). A continuación, las células CD4⁺ purificadas se cultivaron en placas recubiertas de α -CD3 (5 μ g/ml, BD Biosciences) y se expusieron a condiciones pro-Th17 [α -CD28 (2,5 μ g/ml, BD Biosciences), 5 ng/ml de TGF- β (NovusBio) y 30 ng/ml de IL-6 (Peprotech)] o condiciones pro-Treg [α -CD28 (2,5 μ g/ml, BD Biosciences), 5 ng/ml TGF- β (NovusBio) y 10 ng/ml IL-2 (Peprotech)] únicamente o en combinación con 25 μ g/ml de LSEctin-fc (NovusBio) y 25 μ g/ml de α -LAG3 (eBioC9B7W) durante 5 días. Tras este periodo, las células se tiñeron para la citometría de flujo como se ha descrito anteriormente. Como condición de control, las células se estimularon con α -CD3 y α -CD28 solas. Tanto las condiciones de control como las pro-Th17 o pro-Treg incluían una IgG control del isotipo de la fracción constante (fc) de LSEctin-fc.

Paralelamente, para estudiar las vías moleculares implicadas en el proceso de diferenciación de las Th17, se expuso una fracción de las células CD4⁺ aisladas a la combinación de estímulos α -CD3 y α -CD28 durante 48 horas para inducir la expresión de LAG3 como se ha descrito anteriormente [119]. Después se retiraron todos los estímulos durante otras 24 horas. Tras este *starving* de suero y de estímulos para el TCR, las CD4⁺ se estimularon de nuevo con α -CD3 (5 μ g/ml) o IL-6 (25 ng/ml, Peprotech) en presencia o ausencia de LSEctin-fc (25 μ g/ml) y α -LAG3 (25 μ g/ml) durante 30 minutos. A continuación, se recogieron las células para la extracción de proteínas y se evaluó la señalización del TCR o de la IL-6 mediante Western Blot (WB).

G. CULTIVO CELULAR

Las LSECs de ratón inmortalizadas (imLSEC) de Abm (Nueva York, EE. UU.) o LSEC primarias obtenidas por *cell sorting* se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂, en DMEM con un 5 % de FCS, un 1 % de Amfotericina B, un 1 % de suplemento para el crecimiento de células endoteliales (ECGS) y un 1 % de heparina en placas pretratadas con colágeno. La modulación de la expresión de LSEctin por el cultivo con citocinas se realizó con IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α y TGF- β 1 de ratón (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EE. UU.) individualmente o en combinación a 10 ng/ml durante 48 h. Tras esto, se recogieron las células para la extracción de ARN. En el caso de la señalización intracelular, las imLSEC se expusieron a sCD44 o sLAG3 (solubles) recombinantes de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN) a 1 μ g/mL, individualmente o en combinación con ligandos de TLRs

LPS, Pam3Cys o CpG a 100 ng/mL (InvivoGen, San Diego, CA) durante 5 minutos a 37 °C. Se utilizó TNF α de ratón como control positivo a 50 ng/mL. A continuación, se recogieron las células para la extracción de proteínas y el posterior estudio de la vía de señalización de LSEctin mediante WB. Para la evaluación del secretoma, las imLSEC se expusieron a los mismos estímulos durante 72 horas. Los sobrenadantes se centrifugaron y almacenaron a -80 °C para su posterior análisis mediante kits específicos

H. INHIBICIÓN DE LSECTIN MEDIANTE CRISPR-CAS

Para el primer estudio, la expresión de LSEctin se modificó en imLSECs utilizando un kit comercial (KN503452, Origene). En resumen, se sembraron imLSECs en placas de 6 pocillos en Opti-MEM (31985062, Gibco) y al 70 % de confluencia se transfectaron con los vectores de ARNg (guía) específicos de Clec4g y el ADN donante lineal correspondiente que contenía resistencia a la puromicina. Se utilizó Turbofectin (TF81001, Origene) como reactivo de transfección. Después de 48 horas de transfección, las células se cultivaron en los medios descritos anteriormente y se dividieron 1:10 cada 2 días. La selección con puromicina comenzó tras de un período de 3 semanas para reducir las células que contenían ADN donante en forma episomal. Posteriormente, se evaluó la reducción de la proteína de LSEctin mediante WB.

I. ANÁLISIS DEL SECRETOMA

Los niveles de citocinas en los sobrenadantes de cultivos celulares de imLSECs se cuantificaron mediante kits de AimPlex, Mouse Inflammation 16-Plex (CCL4, TNF α , IL-1 β , IL-12, IL-9, CXCL10, IL-1 α , CCL3, IL-10, CXCL1, IL-13, CCL5, IL-6, IFN- γ , IL-15, CCL2) (CliniSciences, Nanterre, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos específicos del kit se habían recubierto por el fabricante con microesferas modificadas con fluoróforos en proporciones establecidas para cada analito para poder diferenciarlos entre sí. En cuanto al procedimiento, de manera similar a un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), existían unos anticuerpos de captura conjugados a microesferas que se incubaron con las muestras o los estándares, que posteriormente se incubarían con anticuerpos de detección biotinilados y finalmente con estreptavidina-ficoeritina (PE). Las placas se analizaron

en la instalación de ómicas del Instituto de Neurociencias de Alicante en un citómetro de flujo FACSAria II operado por el software FACSDiva (BD Biosciences, San Diego, CA, EE. UU.). Cada muestra se analizó por duplicado y cada experimento se repitió 3 veces.

J. ELISA

Los niveles séricos de LSECTin se determinaron mediante ensayos de ELISA utilizando los kits de LSECTin/CLEC4G humana de RayBiotech (Norcross, Georgia, EE. UU.). Todas las muestras se analizaron por triplicado y se leyeron en un lector de microplacas Epoch2 (BioTek, Vermont, EE. UU.). El límite de detección para el ensayo de LSECTin estaba entre 0,078 ng/ml y 20 ng/ml.

K. MARCADORES BIOQUÍMICOS

En el segundo ensayo se determinaron los niveles séricos de fosfatasa alcalina (ALP), alanina transferasa (ALT), aspartato transferasa (AST), urea, albúmina (ALB), proteína total (TP), colesterol (CHOL) y ácidos biliares totales (BA) en 200 µL de sangre total utilizando un analizador automático de bioquímica líquida (Skyla Vb1, CVM practice, Navarra, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

L. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

La tinción con rojo Sirius se realizó utilizando el kit de tinción con rojo Picro Sirius (ab150681) de acuerdo con las instrucciones del fabricante Abcam en secciones de 5 µm de hígado de ratón embebido en parafina. Resumidamente, después de la desparafinación, las secciones se incubaron en solución de rojo Picro Sirius durante 60 minutos y se lavaron rápidamente dos veces en solución de ácido acético y alcohol absoluto.

La tinción TUNEL se realizó utilizando el kit de ensayo TUNEL - HRP-DAB (ab206386) de Abcam en secciones de 5 µm de hígado de ratón embebido en parafina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, después de la desparasitación, las secciones se permeabilizaron con proteinasa K y se bloquearon con peróxido de hidrógeno al 3 %. Después, se añadió la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal

(TdT) durante 90 minutos. Para determinar el ADN biotinilado (células muertas), las secciones se incubaron con una estreptavidina-HRP y se revelaron con 3,3'-diaminobencidina (DAB). A continuación, los portaobjetos fueron contrateñidos con hematoxilina de Harris (HH) (Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond, IL).

Se llevaron a cabo ensayos inmunohistoquímicos (IHC) e inmunofluorescentes (IF) en secciones de 5 µm de tejido hepático humano o de ratón embebido en parafina. Las secciones se manipularon siguiendo los procedimientos estándar. Los portaobjetos se incubaron con anticuerpos primarios para proteínas clave implicadas en la homeostasis y la enfermedad hepáticas. Como anticuerpos secundarios, las secciones se incubaron con los correspondientes anticuerpos biotinilados (Palex Medical SA, Sant Cugat del Vallés, España) para IHC o con anticuerpos modificados Alexa-488, Alexa-594 y Alexa-647 para IF. Las diluciones y referencias de anticuerpos se pueden seguir en la **Tabla 3**. Los portaobjetos de IHC se incubaron con el kit ABC de complejo avidina-biotina-HRP (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) y se revelaron con DAB (Vector Laboratories Inc.). Los núcleos se tiñeron incubando las secciones en HH o DAPI (Thermo Fisher Scientific) respectivamente. Como control negativo, la tinción se llevó a cabo en ausencia de un anticuerpo primario.

Las imágenes se obtuvieron en un microscopio óptico Leica DMR asistido por cámara (Leica Biosystems, Richmond Inc.). Las imágenes confocales se obtuvieron en el servicio de microscopía del Instituto de Neurociencias de Alicante. Concretamente, se usó un microscopio confocal Zeiss LSM 880 con Airyscan, un módulo para superresolución basado en un detector de matriz con microscopía confocal de escaneo láser. Posteriormente sobre las imágenes se realizó un análisis semicuantitativo de la expresión de proteínas o una cuantificación de las células positivas utilizando el software ImageJ (<https://rsbweb.nih.gov>).

Tabla 3. Anticuerpos de histología.

PROTEINA	DIANA	FUENTE	DILUCIÓN	REFERENCIA	TÉCNICA
LSECTIN	Mouse/Human	Rabbit	1:100/1:100	NBP1-82815	IHC/IF
LSECTIN	Mouse	Rabbit	1:50/1:50	ab181196	IHC/IF
ASMA	Mouse	Rabbit	1:200/1:200	D4K9N	IHC/IF
TIM4	Human	Goat	1:100/1:100	af2929	IF
VIM	Mouse	Rabbit	1:100	D21H3	IHC

COL1A1	Mouse	Rabbit	1:300	AB765P	IHC
CD31	Human	Mouse	1:200	89C2	IF
CD36	Human	Mouse	1:200	185-1G2	IF
FOXP3	Human	Mouse	1:100	236A-E7	IHC
TBET1	Human	Mouse	1:100	4B10	IHC
ROR γ T	Mouse/Human	Rat	1:100/1:50	AF114	IHC/IF
FOXP3	Mouse	Rat	1:100	14-5773-82	IHC
CD45	Mouse	Goat	1:200	14-6988-82	IF
LAG3	Human	Rabbit	1:75	PA5-82490	IF
CD4	Human	Mouse	1:100	14-0049-82	IF

M. ANÁLISIS DE PCR CUANTITATIVA

Se extrajo el ARN total utilizando el kit RNeasy Mini (QIAGEN) de los pellets celulares o de las muestras de hígado. Se realizaron PCR cuantitativas para evaluar la expresión de LSECtin/Clec4g, así como de los genes clave implicados en la enfermedad hepática. Las reacciones se realizaron en una mezcla de PCR de 12,5 μ l utilizando qScript One-Step SYBR Green RT-qPCR (Quanta BioScience, Gaithersburg, Maryland) en un CFX Connect (Bio-Rad, Hercules, CA). La β 2-microglobulina se utilizó como gen de mantenimiento en todos los análisis de expresión génica. La expresión relativa se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los pares de cebadores utilizados en el estudio se pueden seguir en la **Tabla 4**.

Los datos de secuenciación masiva de ARN de humano del primer estudio fueron obtenidos de la base de datos GEO (GSE164799). El análisis fue realizado en colaboración con el grupo de Biología Vasculár Hepática.

Tabla 4. Cebadores de qPCR.

GEN	DIANA	CEBADOR FORWARD	CEBADOR REVERSE
CLEC4G	Human	gaggacgtccgcactgag	ggagccctcgaaggacag
GAPDH	Human	caaggatcatccatgacaactttg	gtccaccaccctgttgctgtag
COL1A1	Mouse	actcgaacgggaatccat	gtgttcctactcagccg
TIMP1	Mouse	ccagaaccgcagtgagagtg	gaaacactgtgcacacccca
ACTA2	Mouse	gtcccagacatcagggagtaa	tccgatacttcagcgtcagga
MMP2	Mouse	cttggtgcccaggaaagtga	ccgaggactatgaccgggata
CLEC4G	Mouse	gaattgctgctccgtgacaa	cccttctgattcaccctgag
TGFB1	Mouse	acgtggaaatcaacgggatca	agaagttggcatggttagccc
LAG3	Mouse	ccaggcctcgatgattgcta	cagcagcgtacactgtcaga
CD274	Mouse	tgctgcataatcagctacgg	gctggtcacattgagaagca
PDCD1	Mouse	caaggacgacactctgaaggag	tcttctctcgtccctggaagt

RIPK1	Mouse	gactgtgtacccttacctccga	cactgcgatcattctcgtcctg
RIPK3	Mouse	gaagacacggcactccttggtgta	cttgaggcagtagttcttggtgg
MLKL	Mouse	ctgagggaaactgctggatagag	cgaggaaactggagctgctgat
CASP3	Mouse	ggagtctgactggaaagccgaa	cttctggcaagccatctcctca
CASP8	Mouse	atggctacgggtgaagaactgc	tagttcacgccagtcagg
CCL2	Mouse	ttaaaaacctggatcggaaccaa	gcattagcttcagatttacgggt
CCL3	Mouse	actgctgctgcttctctctaca	atgacacctggctgggagcaaa
CCL5	Mouse	gctgctttgacctctctcc	tcgagtgacaaacacgactgc
CCL20	Mouse	gtgggtttcacaagacagatggc	ccagttctgctttggatcagcg
CXCL9	Mouse	gcatgaagtccgctgttct	tagggttcctcgaactccaca
CXCL10	Mouse	atcatccctgcgagcctatcct	gaccttttttggttaaaccgctttc
CXCL11	Mouse	ccgagtaacggctgcgacaaag	cctgcattatgaggcgagcttg
B2M	Mouse	atggctcgctcggtgaccct	ttctccgggtgggtggcgtga

N. WESTERN BLOT

Los homogeneizados de células o hígado de ratones y muestras humanas se lisaron con tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación que contenía cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Merck, Darmstadt, Alemania) y los inhibidores de fosfatasas fluoruro de sodio y ortovanadato de sodio. La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de proteínas de Bradford (EMD Millipore Corp., Billerica, MA). Treinta microgramos de extractos de proteínas se resolvieron en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio al 6 %-15 dependiendo del tamaño de la proteína de interés. A continuación, los geles se transfirieron a membranas Immobilon-P (Merck, Darmstadt, Alemania). Después del bloqueo, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios durante toda la noche. Se utilizó β -actina (Sigma-Aldrich) como control. Por último, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) adecuado (Cell Signaling Technology, Leiden, Países Bajos). Se utilizó el sustrato Immobilon Western Chemillum HRP (EMD Millipore Corp.) para detectar la actividad de la peroxidasa unida a la membrana, y se obtuvieron imágenes en ChemiDOC XRS+ operado por el software Image Lab (Bio-Rad). Las bandas de proteínas se cuantificaron por densitometría utilizando ImageJ (<https://rsbweb.nih.gov>). Las densidades de las bandas se expresaron en relación con la proteína β -actina total. Las diluciones y las referencias de anticuerpos se pueden seguir en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Anticuerpos de Western Blot.

PROTEIN	DIANA	FUENTE	DILUCIÓN	REFERENCIA
LSECTIN	Human/Mouse	Rabbit	1:500	NBP1-82815
P-MLKL	Mouse	Rabbit	1:750	D6E3G
CASP3-CLEAVED	Mouse	Rabbit	1:1000	9661
P-AKT	Mouse	Rabbit	1:750	4060
P-ZAP70	Mouse	Rabbit	1:750	65E4
P-ERK	Mouse	Rabbit	1:1000	4370
P-STAT3	Mouse	Rabbit	1:1000	D3A7
B-ACTIN	Mouse	Mouse	1:10000	A5441
FOXP3	Human	Mouse	1:1000	236A-E7
RORGT	Human	Rat	1:1000	AFKJS-9
TBET1	Human	Mouse	1:500	4B10
A-TUBULIN	Human	Rabbit	1:2000	A11126
GAPDH	Human	Mouse	1:3000	MCA4740

O. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables categóricas fueron expresadas como frecuencias o porcentajes, mientras que las variables continuas se expresaron como media \pm desviación estándar si se ajustaban a una distribución normal, o bien, como medianas y cuartiles si no se distribuían normalmente. Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para asegurar la normalidad de la distribución de variables continuas ($p < 0.05$). Las diferencias estadísticas entre grupos fueron analizadas usando el test de la T de Student o el análisis de la varianza (ANOVA) con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples para datos cuantitativos que muestran una distribución normal. Para datos cuantitativos que no muestran una distribución normal las comparaciones fueron realizadas con el test de la U de Mann-Whitney para comparaciones simples o el test de Krustal-Wallis seguido de comparaciones por pares usando el test de la U de Mann-Whitney con la corrección post-hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples. Todos los P- valores fueron de doble cola y se consideraron significativos los inferiores a 0.05. Todos los valores p indicados eran bilaterales, y los valores p inferiores a 0,05 se consideraron indicativos de significación. Para el análisis estadístico y el diseño de gráficos se utilizó GraphPad Prism versión 8.0 (San Diego, California).



Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

RESULTADOS

8. ARTÍCULO 1

Martínez-López S, et al., “Cirrhosis-downregulated LSECtin can be retrieved by cytokines, shifts the TLR-induced LSECs secretome and correlates with the hepatic Th response”. *Liver Int.* **2024** Apr;44(4):996-1010. doi: 10.1111/liv.15836.

A. OBJETIVO

LSECtin se ha involucrado en la progresión del daño hepático agudo. Nuestro objetivo para este trabajo fue identificar el papel de LSECtin en la enfermedad hepática crónica y como se modulaba su expresión por citocinas.






B. RESUMEN

La expresión de LSECtin se reduce en el tejido hepático de pacientes cirróticos y animales modelo. Adicionalmente, la pérdida de LSECtin *in vitro* promueve en las LSECs comportamientos proinflamatorios, modulando la señalización de vías fundamentales como las MAPK o NFκB. En consecuencia, la integración de señales de ligandos de LSECtin como LAG3 y señales provenientes de distintos TLRs se encuentra alterada en LSECs dañadas (LSECtin reprimida) promoviendo la liberación de moléculas proinflamatorias como TNFα o CCL2. En paralelo, la bajada en la expresión hepática de LSECtin se encuentra estrechamente relacionada con el aumento de linfocitos proinflamatorios como los Th17 (RORC+) pero no los Th1 (TBX21+) en el hígado cirrótico. En ese sentido la reinducción de LSECtin en el endotelio dañado mediante el uso de citocinas antiinflamatorias como la IL-4 o la IL-13 demuestra que LSECtin podría ser una diana molecular para la reprogramación de las capacidades homeostáticas de las LSECs durante la progresión de la cirrosis.

C. CONCLUSIÓN

El aumento de citocinas proinflamatorias podría estar detrás de la pérdida de LSECtin durante la cirrosis lo que convertiría a las LSECs en promotoras de inflamación. Por el contrario, la inducción de LSECtin mediante citocinas antiinflamatorias supone un sistema interesante de devolver las capacidades tolerogénicas al endotelio, promoviendo la regulación de linfocitos proinflamatorios por parte de este.

Cirrhosis-downregulated LSEctin can be retrieved by cytokines, shifts the TLR-induced LSECs secretome and correlates with the hepatic Th response

Sebastián Martínez-López^{1,2}  | Enrique Ángel-Gomis^{1,2}  | Isabel Gómez-Hurtado^{1,2,3} | Anabel Fernández-Iglesias^{3,4} | Javier Morante⁵  | Jordi Gracia-Sancho^{3,4} | Paula Boix^{1,2} | Francisco J. Cubero^{3,6}  | Pedro Zapater^{1,2,3,7} | Esther Caparrós^{1,2} | Rubén Francés^{1,2,3,7} 

¹Hepatic and Intestinal Immunobiology Group, Departamento de Medicina Clínica, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante, Spain

²IIS ISABIAL, Hospital General Universitario Dr. Balmis, Alicante, Spain

³CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁴Liver Vascular Biology Research Group, IDIBAPS, Barcelona, Spain

⁵Instituto de Neurociencias, CSIC-UMH, San Juan de Alicante, Spain

⁶Department of Immunology, Ophthalmology and ENT, School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

⁷Instituto IDIBE, Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain

Correspondence

Esther Caparrós and Rubén Francés, Hepatic and Intestinal Immunobiology Group, Department of Clinical Medicine, Miguel Hernández University, Ctra Alicante-Valencia Km 8.7, San Juan de Alicante 03550, Spain.
Email: ecaparrros@umh.es and rfrances@umh.es

Funding information

Instituto de Salud Carlos III; Ministerio de Ciencia e Innovación; HORIZON EUROPE

Abstract

Background and Aims: We evaluated tolerogenic C-type lectin LSEctin loss in cirrhosis and its potential regulation by cytokines.

Methods: Liver tissue from patients with cirrhosis and healthy controls, immortalised and generated LSEctin-CRISPR immortalised LSECs, and murine primary LSECs from the CCl₄ model were handled.

Results: LSEctin expression was reduced in liver tissue from cirrhotic patients, and it decreased from compensated to decompensated disease. Increased phosphorylation of MAPK, Akt and NFκB was observed upon LSEctin stimulation in LSEC murine cell line, showing a pattern of inflammatory and chemotactic cytokines either restrained (IL-10, CCL4) or unrestrained (TNF-α, IL-1β, IL-6, CCL2). CD44 attenuated whereas LAG-3 increased all substrates phosphorylation in combination with TLR4 and TLR2 ligands except for NFκB. TNF-α, IL-1 β, IL-6 and CCL2 were restrained by LSEctin crosslinking on TLRs studied. Conversely, IL-10 and CCL4 were upregulated, suggesting a LSEctin-TLRs synergistic effect. Also, LSEctin was significantly induced after IL-13 stimulation or combined with anti-inflammatory cytokines in cirrhotic and immortalised LSECs. Th17 and regulatory T cells were progressively increased in the hepatic tissue from compensated to decompensated patients. A significant inverse correlation was present between gene expression levels of CLEC4G/LSEctin and RORγT and FOXP3 in liver tissues.

Conclusion: LSEctin restrains TLR proinflammatory secretome induced on LSECs by interfering immune response control, survival and MAPKs signalling pathways. The

Abbreviations: CCL, C-C motif chemokine ligand; CCl₄, carbon tetrachloride; CCR, CC chemokine receptors; CLEC4G, C-type lectin domain family 4 member G; CpG, cytosine-phosphate-guanine; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; CXCL, C-X-C chemokine ligand; FOXP3, forkhead box P3; IFN-γ, interferon γ; IL, interleukin; imLSEC, immortalised mouse liver sinusoidal endothelial cells; LAG-3, lymphocyte-activation gene 3; LSECs, liver sinusoidal endothelial cells; LSEctin, liver and lymph node sinusoidal endothelial cell (LSEC) C-type lectin; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NFκB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; Pam3Cys, Pam3Cys-Ser-(Lys)4; RORγT, retinoid-related orphan receptor gamma T; Th17, T helper 17; TLR, toll-like receptor; TNF-α, tumour necrosis factor-α.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Authors. *Liver International* published by John Wiley & Sons Ltd.

Framework Programme; Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital, Generalitat Valenciana; Comunidad de Madrid; Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca

Handling Editor: Dr. Luca Valenti

cytokine-dependent induction of LSECtin and the association between LSECtin loss and Th17 cell subset expansion in the liver, provides a solid background for exploring LSECtin retrieval as a mechanism to reprogram LSEC homeostatic function hampered during cirrhosis.

KEYWORDS

cirrhosis, cytokines, hepatic T helper, LSEC, LSECtin, Toll-like receptor

1 | INTRODUCTION

Liver cirrhosis is the common end-stage of chronic liver diseases of different aetiology.¹ Cirrhosis is associated with an immunological dysfunction that enhances the role of innate receptors as crucial landmarks in the control of inflammatory progression of disease. C-type lectins are receptors with an important function in binding and processing of pathogen-derived antigens, intercellular adhesion and regulation of T-cell responses.² The liver and lymph node sinusoidal endothelial cell (LSEC) C-type lectin, LSECtin/CLEC4G is a member of this family. LSECtin *in vitro* binds mannose, N-acetylglucosamine (GlcNAc) and fucose, and different viral variants, such as Ebola or SARS coronavirus, and it is mainly expressed in LSECs, a resident cell population involved in important metabolic functions,³⁻⁵ and with antigen-presenting skills in the tolerogenic liver.^{6,7}

LSECtin has been proposed to participate in hepatic immune regulation. LSECtin has been described to inhibit signalling through its specific ligands CD44 and LAG-3, and to be inhibited by downregulation of PU.1, a critical regulator of cellular communication in the immune system.⁸ Its role on negative modulation of hepatic adaptive immune response has been demonstrated by increased T cell expansion after acute liver injury in LSECtin deficient mice, while the exogenous administration of recombinant LSECtin in these mice is able to ameliorate liver damage at stages in which proinflammatory rather than tolerogenic responses are differentiated.⁹ The cytokine milieu described in cirrhosis includes strongly proinflammatory products such as TNF- α , IL-6 or IFN- γ . It is plausible that such an immunogenic background will restrain LSECtin expression during chronic liver damage. In fact, the transcriptional profile of LSECtin shows a significant downregulation in the CCl₄ model of chronic liver damage compared to control rats.¹⁰ Given LSECtin role in shaping innate to adaptive immune response, mechanisms controlling LSECtin regulation may be of interest to modulate the inflammatory response in advanced chronic liver disease. Despite the well-known regulation of C-type lectins expression by cytokines such as IL-4 (i.e. LSECtin regulation by IL-4 has been reported in human healthy liver⁸), the modulation of LSECtin by the intrinsic cytokine microenvironment displayed in cirrhosis remains to be deciphered.

Importantly, the gut microbiota shift developed during cirrhosis surely accounts for an increased susceptibility to bacterial products translocation, infections and other bacteria-related disease complications. In this context, other receptors of gut-derived products continuously participate in the clearance of this antigenic load¹¹ and

Key Points

- LSECs show an unrestrained pattern of inflammatory and chemotactic cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 and CCL2 in an *in vitro* model of LSECtin downregulation.
- LSECtin and TLRs interplay differently depending on LSECtin-interacting ligand and influence TLR-driven secretome.
- LSECtin is significantly induced after IL-13 stimulation or the combination of anti-inflammatory cytokines in LSECs from cirrhotic animals. The cytokine-dependent induction of LSECtin supports LSECtin retrieval as a mechanism to reprogram LSEC homeostatic function during cirrhosis.

may interact with receptors such as C-type lectins. Intracellular signalling initiated upon ligand engagement of C-type lectins such as dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) or Dectin-1 modulate toll-like receptor (TLR) signalling.^{12,13} The TLR family is particularly relevant due to the tight implication of these receptor members in chronic liver disease.¹⁴⁻¹⁶

In the present study, we confirm LSECtin downregulation in human liver cirrhosis. LSECtin-induced downstream signalling, its contribution into the inflammatory secretome and the possible interaction between LSECtin and TLR ligands in shaping a soluble inflammatory response is functionally studied using LSECtin-CRISPR immortalised LSECs. Finally, we also evaluate LSECtin modulation by cytokines in experimental advanced chronic liver damage (ACLD).

2 | METHODS

2.1 | Patients and human samples

Consecutive series of patients with cirrhosis with alcohol or non-alcoholic steatohepatitis (NASH) aetiology and of healthy donors were included in the study. Cirrhotic patients were grouped into compensated ($n=12$) or decompensated ($n=14$) disease based on their clinical characteristics. Available human liver samples remnants from non-lesioned non-tumorous liver tissue resections were used from healthy controls ($n=9$) and compared with cirrhotic liver tissue

explants from compensated ($n=11$) and decompensated ($n=9$) patients who underwent liver transplantation. Clinical characteristics of patients and donors are provided as supplemental material for the complete series (Supplementary Table S1A) and the subgroup with data from all experimental approaches (Supplementary Table S1B).

This study was performed in agreement with the Declaration of Helsinki and with local and national laws. The Human Ethics Committee of the hospital approved the study procedures (HCB/2015/0624) and all participants voluntarily signed an informed written consent before inclusion in the study.

2.2 | Animals

Male/female C57Bl/6J (Harlan, Barcelona, Spain) were included in a 12-week study protocol. Mice were caged at a constant room temperature of 21°C and exposed to a 12:12 light/dark cycle. Adult mice weighting 18–20g were fed with standard rodent chow and treated with .25mmol/L phenobarbital in tap water along study protocol. After 4 weeks, animals were subjected to experimental ACLD induction with two weekly weight-controlled doses of CCl₄ (Sigma Aldrich, Madrid, Spain) intragastrically, administered as described previously.¹⁷ Control animals received mineral oil for that period. Animals were sacrificed when severely ill, and death was suspected to be imminent. Laparotomies were performed under anaesthesia with isoflurane at week 12 as described.¹⁷ After perfusion, livers were set aside either for molecular biology and histology experiments or cell isolation by cell sorting. Animals received care according to the criteria outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The study was approved by the Animal Research Committee of Universidad Miguel Hernandez (Alicante, Spain) with approval number HA-RFG-001-20.

2.3 | Cell sorting

Perfused livers were digested *in vivo* with collagenase A (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) as previously described.¹⁸ LSECs were enriched with a density gradient centrifugation at 800×g for 25 min by using Percoll 25% and 50%. Cells from the interphase were collected, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺ supplemented with .5% bovine serum albumin (BSA) and 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for cytometric staining. A pool from 5 mice was made to obtain sufficient LSECs for subsequent experiments. Samples were incubated with anti-CD45-APC, anti-CD31-FITC and anti-CD146-PE (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). An anti-LSEctin antibody (Abcam, Cambridge, UK) was used at the same time to assess LSEctin levels with an αRabbit-PEcy7 secondary antibody (Santa Cruz, USA). LSECs were sorted as CD45⁻, CD31⁺ and CD146⁺¹⁹ in the Omics facility of the Instituto de Neurociencias de Alicante in a FACSAria II flow cytometer operated by FACSDiva software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

2.4 | Cell culture

Immortalised mouse liver sinusoidal endothelial cells (imLSECs) from Applied Biological Materials (NY, USA) originated from Vijay Shah's lab at the Mayo Clinic²⁰ or sorted primary LSECs were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in DMEM with 5% FCS, 1% fungizone, 1% endothelial cell growth supplement (ECGS) and 1% heparin in collagen-pretreated plates. Cytokine LSEctin modulation was performed with mouse IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TNF-α and TGF-β1 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) individually or in combination at 10 ng/mL during 48 h. imLSECs were exposed to mouse recombinant CD44-Fc or LAG3-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN) at 1 μg/mL, individually or in combination with TLR ligands LPS, Pam3Cys or CpG at 100 ng/mL (InvivoGen, San Diego, CA) during 5 min at 37°C. Mouse TNF-α was used as positive control at 50 ng/mL. After that, cultures were put on ice and subsequently lysed for the evaluation of LSEctin signalling pathway. For secretome evaluation, imLSECs were exposed to the same stimuli for 72 h. Supernatants were centrifuged and stored at -80°C for further analysis.

2.5 | LSEctin knockdown by CRISPR-CAS

The expression of LSEctin was modified on imLSECs using a commercial kit (KN503452, Origene). In brief, imLSECs were seeded in 6-well plates in Opti-MEM (31985062, Gibco) and at 70% of confluency were transfected with the Clec4g specific gRNA vectors and the correspondent linear donor DNA containing resistance to puromycin. Turbofectin (TF81001, Origene) was used as a transfection reagent. After 48 h of transfection, cells were cultured in the media previously described and split 1:10 every 2 days. Puromycin selection started after a 3-week period to reduce the cells containing episomal donor DNA. Subsequently, protein knockdown of LSEctin was assessed by Western blot.

2.6 | Secretome analysis

The cytokine levels in cell-culture supernatants were quantified by AimPlex Mouse Inflammation 16-Plex assay kits (CCL4, TNF-α, IL-1β, IL-12, IL-9, CXCL10, IL-1α, CCL3, IL-10, CXCL1, IL-13, CCL5, IL-6, IFN-γ, IL-15, CCL2) (CliniSciences, Nanterre, France) according to the manufacturer's instructions. Specific antibodies in the kit had been pre-coated on microparticles embedded with fluorophores at set ratios for each analyte. Briefly, capture antibody-conjugated beads were first incubated with samples or standard controls, then with biotinylated detection antibodies and finally, with streptavidin-phycoerythrin (PE). Next, final washes with kit buffer were performed to remove unbound streptavidin-PE. The plates were then analysed using a flow cytometer (FACS Aria II, Becton Dickinson). Each sample was analysed in duplicates and each experiment was repeated 3 times.

2.7 | ELISA

Serum levels of LSECTin were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) using Human LSECTin/CLEC4G ELISA from RayBiotech (Norcross, Georgia, USA). All samples were tested in triplicate and read in a Epoch2 Microplate Reader (BioTek, Vermont, USA). The detection limit for LSECTin assay was between .078 and 20 ng/mL. Standard curves were generated for every plate, and the average 0 standard optical densities were subtracted from the rest of the standards and samples to obtain a corrected concentration for LSECTin.

2.8 | Histological analysis

Immunohistochemical (IHC) and immunofluorescence (IF) assays were carried out in 5- μ m sections of paraffin-embedded human or mouse liver tissue and processed following standard procedures. The slides were incubated with primary antibodies anti-LSECTin (Abcam, Cambridge, UK), anti-CD31 (Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands), anti-Endomucin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), anti-CLEC4F (Biolegend), anti-TIM4 (R&D Systems, Minneapolis, MN), as well as the key proteins involved in hepatic disease. As secondary antibodies, sections were incubated with the correspondent biotinylated antibodies (Palex Medical SA, Sant Cugat del Vallés, Spain) for IHC or with Alexa-488, Alexa-594 and Alexa-647 modified antibodies for IF. Dilutions and antibody references can be followed in Supplementary Table S2. Slides were incubated with avidin-biotin complex (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) and revealed with peroxidase substrate 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories Inc.) for IHC. Nuclei were stained by incubating the sections in Harris haematoxylin (Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond, IL) or with DAPI (Thermo Fisher Scientific), respectively. As a negative control, staining was carried out in the absence of a primary antibody. Images were obtained in a camera-assisted optic Leica DMR microscope (Leica Biosystems, Richmond Inc.). Confocal images were obtained on a Zeiss LSM 880 confocal microscope with Airyscan, a module for super-resolution based on an array detector with laser

scanning confocal microscopy. A semi-quantitative analysis of protein expression was performed using the ImageJ software (<https://rsbweb.nih.gov>).

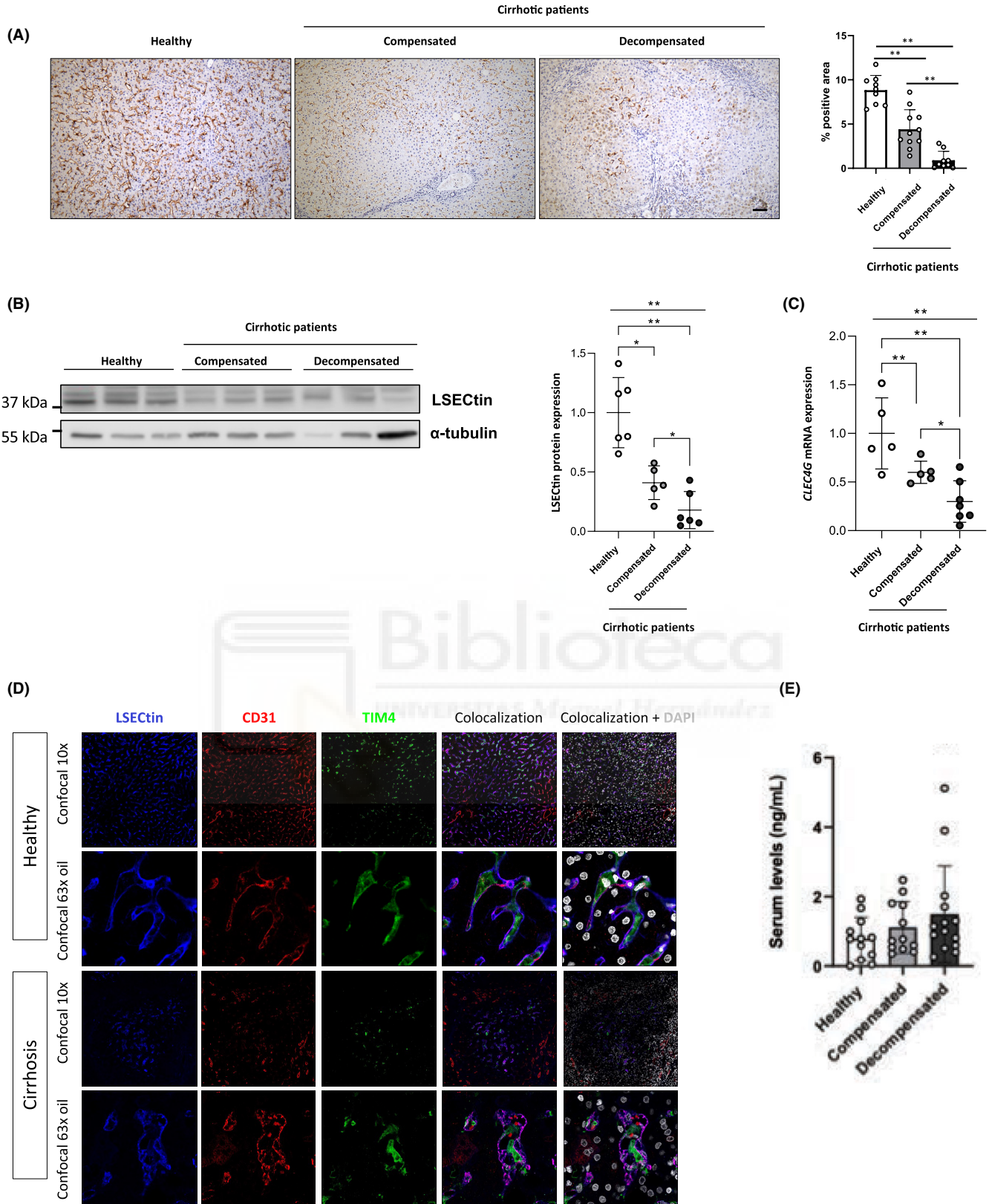
2.9 | Quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (QIAGEN) from cell pellets or liver samples. Quantitative PCRs were performed to evaluate the expression of *LSECTin/Clec4g*, as well as the key genes involved in hepatic disease. The reactions were performed in a 12.5 μ L PCR mixture using qScript One-Step SYBR Green RT-qPCR (Quanta BioScience, Gaithersburg, Maryland) in a CFX Connect (Bio-Rad, Hercules, CA). β 2-Microglobulin was used as a housekeeping gene in all gene expression analyses. Relative expression was calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Primer pairs used in the study can be followed in Supplementary Table S3.

2.10 | Western blot

Cell or liver homogenates from mice and human samples were lysed with radioimmunoprecipitation assay buffer and protein concentration was determined by Bradford protein assay (EMD Millipore Corp., Billerica, MA). Thirty micrograms of protein extracts were resolved under reducing conditions on 6% to 15% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels and transferred to Immobilon-P membranes (Merck, Darmstadt, Germany). Finally, membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands). Immobilon Western Chemilum HRP Substrate (EMD Millipore Corp.) was used to detect the activity of the membrane-attached peroxidase, and images were obtained in ChemIDOC XRS+ operated by Image Lab software (Bio-Rad). Protein bands were quantified by densitometry using ImageJ (Public domain). Band densities were expressed relative to total indicated housekeeping protein. Dilutions and antibody references can be followed in Supplementary Table S4.

FIGURE 1 LSECTin expression in liver and serum of cirrhotic patients. (A) Representative Immunohistochemistry of LSECTin expression in sections of paraffin-embedded human liver tissue of a healthy donor, a compensated and a decompensated cirrhotic patient. LSECTin expression was blindly measured by densitometry in user-specified regions of interest (ROIs) as brown area percentage in haematoxylin-stained sections using the ImageJ software. This quantification is shown in a bar graph where dots represent each individual control ($n=9$), compensated ($n=11$) and decompensated ($n=9$) patients. (B) Western blot of LSECTin in human liver tissue from three different healthy donors, compensated and decompensated patients. A representative Western blot of six independent experiments is shown. Relative quantitation of LSECTin/ α -tubulin protein expression in human liver tissue. Each dot represents individual healthy donors ($n=6$), compensated ($n=5$) and decompensated ($n=7$) cirrhotic patients. (C) Relative mRNA expression of *CLEC4G* in human liver tissue. Each dot represents individual healthy donors ($n=6$), compensated ($n=5$) and decompensated ($n=7$) cirrhotic patients. β 2-microglobulin or α -tubulin was used as a housekeeping gene in all gene expression analyses. (D) Immunofluorescence colocalisation analysis of human liver healthy donor and cirrhotic patient of LSECTin (blue), TIM4 (for hepatic macrophages detection, green), CD31 (for LSECs detection, red) expression and DAPI staining (white) for nuclei localisation. Confocal 10X and 63X images are shown. (E) LSECTin protein levels measured in serum. Each dot represents individual healthy donors ($n=12$), compensated ($n=12$) and decompensated ($n=14$) cirrhotic patients. * $p < .05$, ** $p < .001$.



2.11 | RNA sequencing

Human RNA sequencing (RNAseq) data was obtained from GEO database GSE164799. Data are available at <http://www.shiny.lvbrg.barcelona/lsec>.²¹

2.12 | Statistical analysis

Categorical variables as frequency or percentages and continuous variables following a normal distribution as mean ± standard deviation. To verify the normality of continuous variables the

Kolmogorov-Smirnov test ($p < .05$) was used. Differences between groups were analysed using the Mann-Whitney U test for continuous variables. Multiple comparisons were analysed according to Bonferroni correction. All reported p -values were two-sided, and p -values lower than .05 were considered to indicate significance. GraphPad Prism version 8.0 (San Diego, CA) was used for statistical analysis and graph design.

3 | RESULTS

3.1 | LSECTin is downregulated in the hepatic sinusoid during chronic liver damage

LSECTin expression was evaluated in human explants obtained from non-cirrhotic and cirrhotic patients. [Figure 1A](#) shows the significant reduction in LSECTin expression during progression of liver diseases, showing a marked reduction in hepatic tissue from decompensated patients. While LSECTin is homogeneously distributed through the sinusoids in healthy liver, LSECTin is progressively reduced as fibrotic damage increases. This is confirmed by WB ([Figure 1B](#) and Supplementary [Figure S1A](#)) and qPCR ([Figure 1C](#)). Within the human liver sinusoid, LSECTin is expressed by endothelial cells rather than Kupffer cells, as shown by colocalisation with CD31 versus TIM4 by confocal microscopy ([Figure 1D](#)), suggesting the potential immunological role of the sinusoidal bed location. LSECTin expression in human LSECs was also evaluated by LSEC-specific CD36 colocalisation (Supplementary [Figure S1B](#)). LSECTin in serum of cirrhotic patients did not show statistical differences with healthy donors ([Figure 1E](#)).

3.2 | LSECTin regulates MAPK, Akt and NFkB phosphorylation, and restrains TLR-ligands-induced secretome

To decipher the functional role of this C-type lectin in hepatic endothelial cells, we next focused on the intracellular transduction signalling pathways triggered upon LSECTin activation. By using LSECTin natural ligands CD44 and LAG-3, we *in vitro* tested phosphorylation of different MAPK substrates, Akt and NFkB. [Figure 2A](#) shows an increased phosphorylation in all analysed substrates after LSECTin priming with their natural ligands CD44 and LAG-3 for 5 min compared to IgG stimulation. To confirm LSECTin participation in substrates activation, we knocked down LSECTin expression by using CRISPR technology in our imLSEC culture model. LSECTin downregulation in LSECTin-CRISPR imLSECs was confirmed by Western blot (Supplementary [Figure S2](#)). MAPK substrates, Akt and NFkB signalling activation was significantly downregulated in LSECTin-CRISPR imLSECs with specific ligands CD44 and LAG3 ([Figure 2A](#)). Experimental replicates of LSECTin-mediated signalling are shown in Supplementary [Figure S3](#). These

results show that LSECTin is a regulator of immune response control, survival and MAPKs signalling pathways. Supplementary [Figure S4](#) shows a KEGG analysis of MAPK, PI3K-Akt and NFkB signalling pathways from RNAseq samples of cirrhotic patients and healthy controls.

Next, we evaluated the inflammatory secretome produced by imLSECs in culture. Both specific ligands showed a pattern of produced inflammatory and chemotactic cytokines that were either restrained, as for IL-10 and CCL4, or unrestrained, as for TNF- α , IL-1 β , IL-6 and CCL2, in the LSECTin-CRISPR imLSEC culture ([Figure 2B](#)). Absolute cytokine levels in all conditions are shown in Supplementary [Table S5](#).

Due to the previously described collaboration between C-type lectins and TLRs, we set out to determine LSECTin ability to co-signal through CD44 ([Figure 3A](#)) and LAG-3 ([Figure 3B](#)) with other pathogenic antigen cell receptors, we performed *in vitro* imLSEC costimulation with TLR ligands LPS, Pam3Cys and CpGs. LSECTin and TLRs interplayed differently depending on the LSECTin-interacting ligand. CD44 attenuated phosphorylation of all signalling substrates in combination with all TLR ligands except for NFkB, which showed a synergistic phosphorylation between LPS and CD44. These results were confirmed in LSECTin-CRISPR cells, showing an induction of all substrates for all TLR ligands but for NFkB in the presence of CD44. However, LAG-3 increased phosphorylation of all signalling substrates in combination with TLR4 and TLR2 ligands except for NFkB, which showed an attenuated phosphorylation in the combination of Pam3Cys and LAG-3. In LSECTin-CRISPR cells, the collaboration was attenuated in all cases except for Akt and Erk1/2 in the presence of CpG. Experimental replicates of LSECTin interaction with TLR signalling cascade are shown in Supplementary [Figure S5](#).

Due to the observed interaction between LSECTin and TLRs ligands in signalling transduction pathways, we evaluated the relative contribution of LSECTin on TLR-induced inflammatory secretome. Pro-inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL2 or CXCL-10 were downregulated after co-stimulation with TLR and LSECTin ligands compared to levels induced by TLR ligands alone ([Figure 4A-E](#)). On the contrary, secreted IL-10 and CCL4 levels by imLSECs cocultured with TLR and LSECTin ligands were increased compared to levels induced by TLR ligand stimulation alone ([Figure 4F,G](#)). LSECTin knockdown in LSECTin-CRISPR imLSECs increased the pro-inflammatory set of cytokines and chemokines ([Figure 4A-E](#)) while decreased secreted immunomodulatory IL-10 and CCL4 cytokines ([Figure 4F,G](#)). Of interest, the interaction between LSECTin and TLR-2 and TLR-4, but not with TLR-9, additionally increased the secretion of IFN- γ whereas this interaction in LSECTin-CRISPR imLSECs restrained IFN- γ levels ([Figure 4H](#)). The rest of secretome induced by LSECTin and TLRs ligands can be followed in Supplementary [Figure S6](#). Additionally, Supplementary [Figure S7](#) shows protein absolute data of all secretome cytokines.

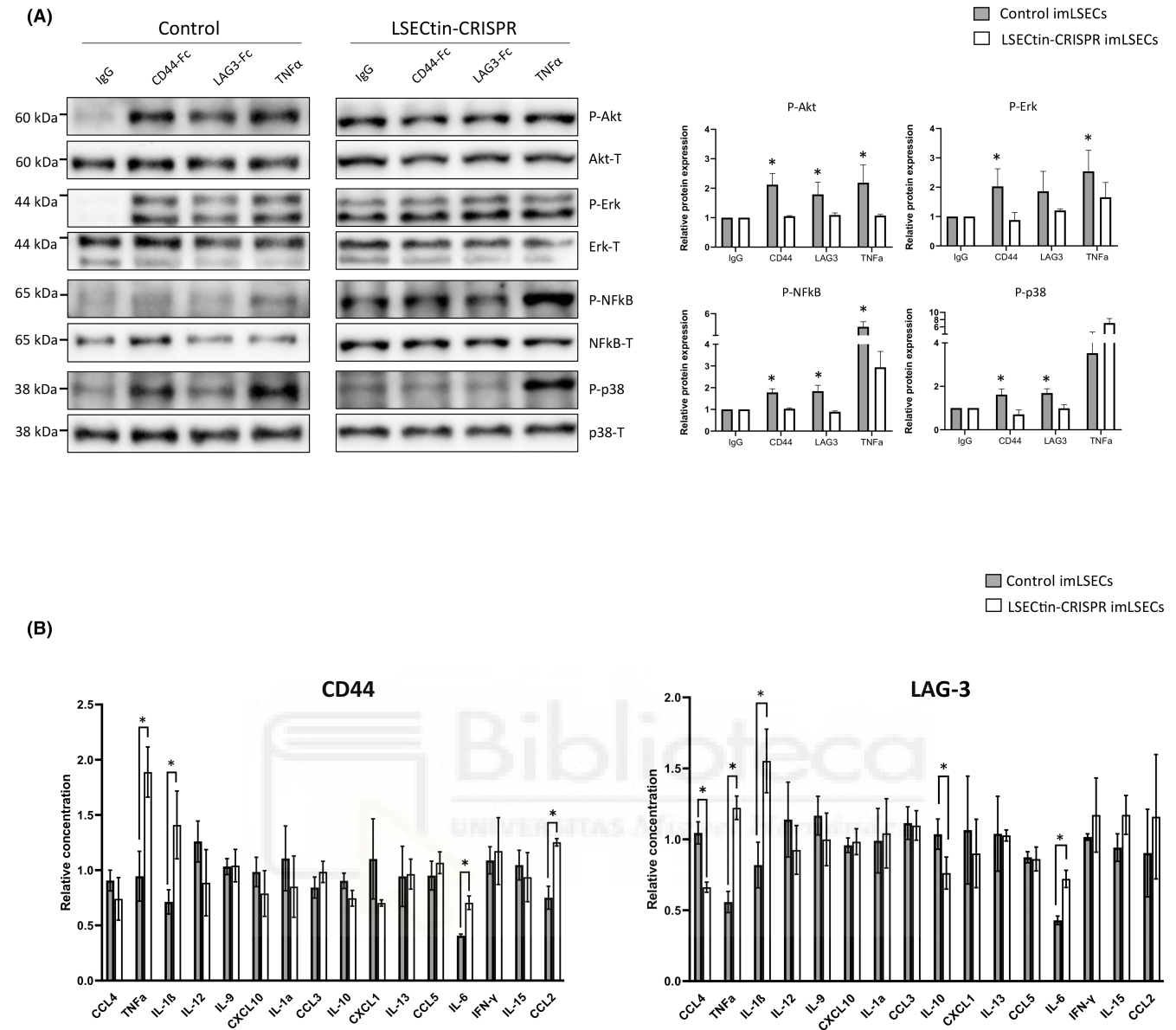


FIGURE 2 LSEctin intracellular signalling and induced secretome in imLSECs. (A) Western blot analysis of phosphorylated Erk, Akt, NFkB and p38 in control imLSECs and LSEctin-CRISPR generated imLSECs stimulated during 5 min with IgG, LSEctin ligands CD44-Fc and LAG-3-Fc, and TNF α as positive control. Relative protein expression shown as mean \pm standard deviation related to total amount of substrates and IgG from four independent experiments is shown. (B) Fold change of secreted cytokines and chemokines concentration relative to IgG induced by control imLSECs and LSEctin-CRISPR imLSECs cultured with LSEctin natural ligands CD44 and LAG-3 for 72 h. Conditions were tested in triplicate and mean \pm standard deviation relative concentration levels are represented. * $p < .05$ compared to the CRISPR condition. CCL, chemokine C-C motif ligand; CXCL, chemokine C-X-C motif ligand; IFN, interferon; IL, interleukin; TNF, tumour necrosis factor.

3.3 | LSEctin expression is modulated by the cytokine microenvironment

To further study LSEctin regulation in imLSECs, and due to the hepatic inflammatory shift induced by cytokines during cirrhosis, an immortalised mouse model cell line was cultured with a panel of cytokines involved in the inflammatory balance. In addition to the well-known LSEctin upregulation induced by IL-4,²² LSEctin was significantly induced after stimulation with anti-inflammatory cytokines IL-13 alone or combined with TGF- β and IL-10 (Figure 5A), whereas stimulation with proinflammatory molecules such as IL-1 β ,

TNF- α and their combination with IL-6 significantly reduced Clec4g gene expression in imLSECs (Figure 5B). These results indicate that LSEctin is susceptible to be modulated by the cytokine milieu in LSECs.

We evaluated this modulation in a murine experimental model of ACLD. Liver damage was validated by histology and mRNA expression of profibrogenic markers (Supplementary Figure S8). LSEctin significant downregulation in hepatic tissue was confirmed by IHC (Figure 5C), relative mRNA and protein expression (Figure 5D,E). We sorted LSECs identified as CD45⁻, CD31⁺, CD146⁺ (Figure 5F). The significant reduction of LSEctin in cirrhotic LSECs was proved

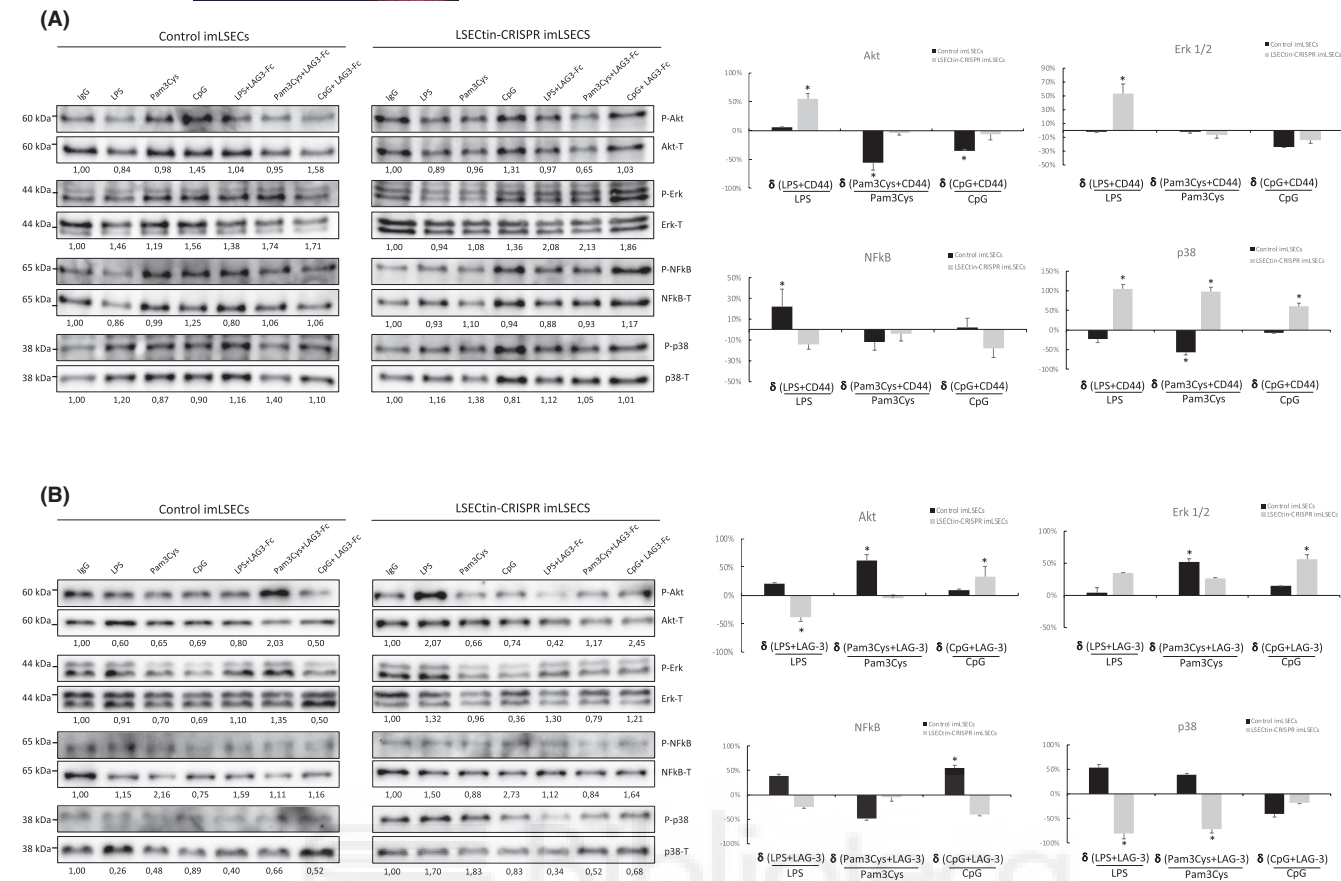


FIGURE 3 LSEctin interaction with TLR signalling cascade. (A) Western blot analysis of Erk, Akt, NFKB and p38 in control imLSECs and LSEctin-CRISPR imLSECs stimulated during 5 min with IgG, TLR ligands and their combination with LSEctin ligand CD44. The right panel shows the expression ratios of combined LSEctin-TLR ligands (δ) for each substrate as percentages related to TLR ligands-induced phosphorylation. (B) Western blot analysis of Erk, Akt, NFKB and p38 in control imLSECs and LSEctin-CRISPR imLSECs stimulated during 5 min with IgG, TLR ligands and their combination with LSEctin ligand LAG-3. The right panel shows the expression ratios of combined LSEctin-TLR ligands (δ) for each substrate as percentages related to TLR ligands-induced phosphorylation. A representative blot of five independent experiments is shown with densitometry related to total amount of substrates and IgG for all panels. * $p < .05$ compared to TLR ligands-induced phosphorylation.

compared to controls (Figure 5G). Sorted primary cells were cultured with anti-inflammatory cytokine combinations, and LSEctin mRNA was discretely upregulated after stimulation with IL-10 and TGF- β in primary LSECs from cirrhotic animals. Moreover, LSEctin upregulation was significantly achieved by stimulation with IL-13 or the combination of these three cytokines with IL-4 in primary LSECs from cirrhotic animals (Figure 5H).

3.4 | LSEctin contributes to shaping the hepatic T cell expansion in patients with cirrhosis

T helper proliferation was measured in liver tissue of cirrhotic patients and LSEctin expression was evaluated. The expression of transcription factors TBET, ROR γ T and FOXP3 observed by IHC showed that both Th17 and regulatory T cells are progressively increased in the hepatic tissue from compensated to decompensated patients compared with healthy livers (Figure 6A). These results were confirmed for protein expression by WB (Figure 6B) and validated by

RNAseq analysis and mRNA quantification (Figure 6C). A significant inverse correlation was present between gene expression levels of CLEC4G/LSEctin and ROR γ T and FOXP3 (Figure 6D). These results show a direct association between the loss of LSEctin and Th subset profile modification towards a proinflammatory-enriched microenvironment during cirrhosis progression.

4 | DISCUSSION

In this work, we show that LSEctin expression is reduced in LSECs during cirrhosis progression. The signalling pathways activated by this C-type lectin influence the LSEC-induced secretome and modulate TLR-induced response helping to shift the inflammatory microenvironment. Moreover, LSEctin can be retrieved by cytokine stimuli in LSECs during experimental ACLD, and its loss is associated to a Th proinflammatory enrichment in the liver of cirrhotic patients. These results highlight LSECs as targets of immune modulation during chronic liver damage.

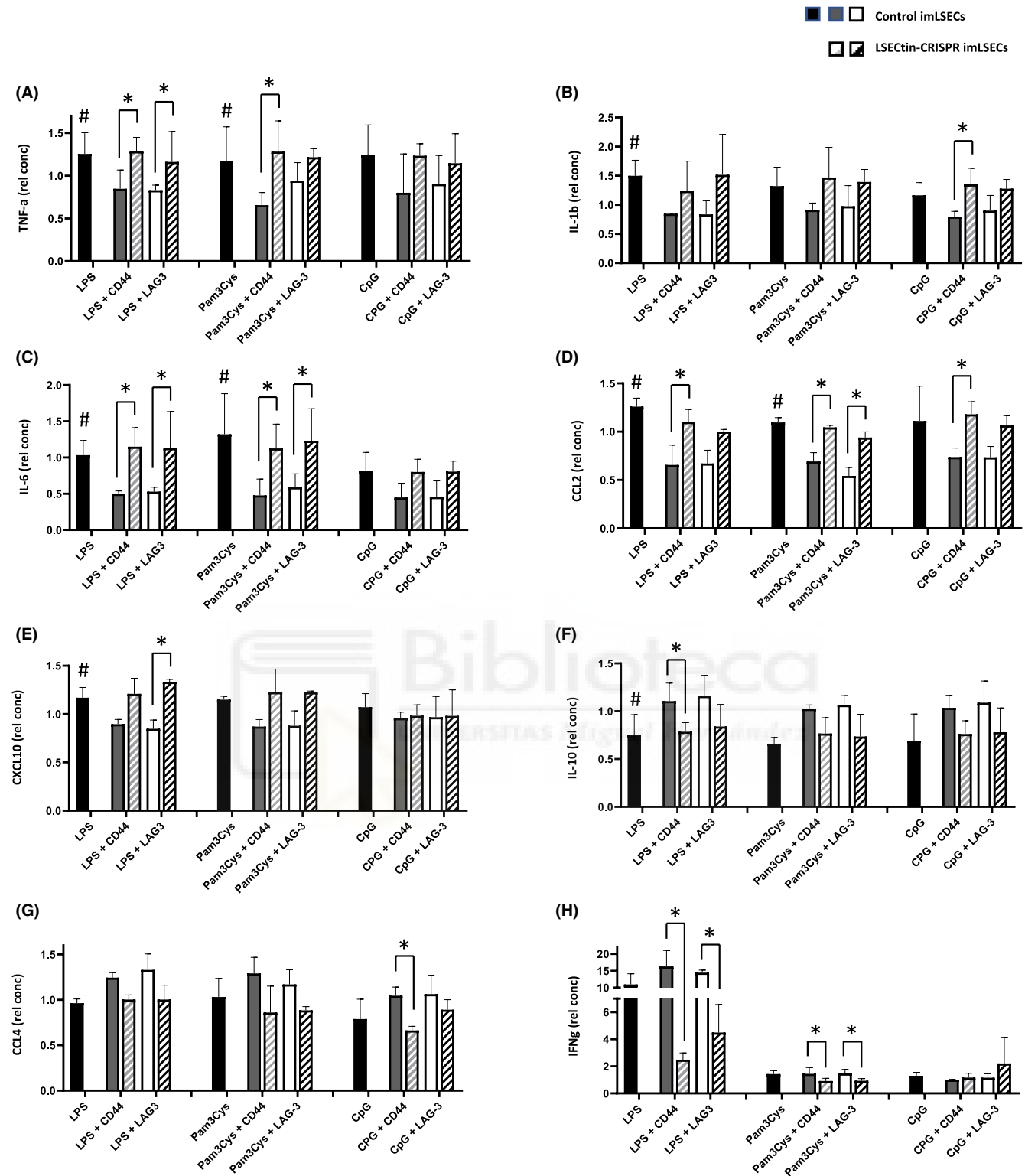


FIGURE 4 LSEctin interaction with TLR-induced secretome in imLSECs. (A) Fold change of secreted cytokines and chemokines concentration relative to IgG induced by control imLSECs (solid bars) and LSEctin-CRISPR (striped bars) imLSECs cultured with TLR and LSEctin ligands for 72h. Conditions were tested in triplicate and mean \pm standard deviation relative concentration levels are represented, * $p < .05$ compared to the CRISPR condition; # $p < .05$ compared to both CD44 and LAG-3 co-stimulated control imLSECs. CCL: chemokine C-C motif ligand; CXCL: chemokine C-X-C motif ligand; IFN: interferon; IL: interleukin; TNF: tumour necrosis factor.

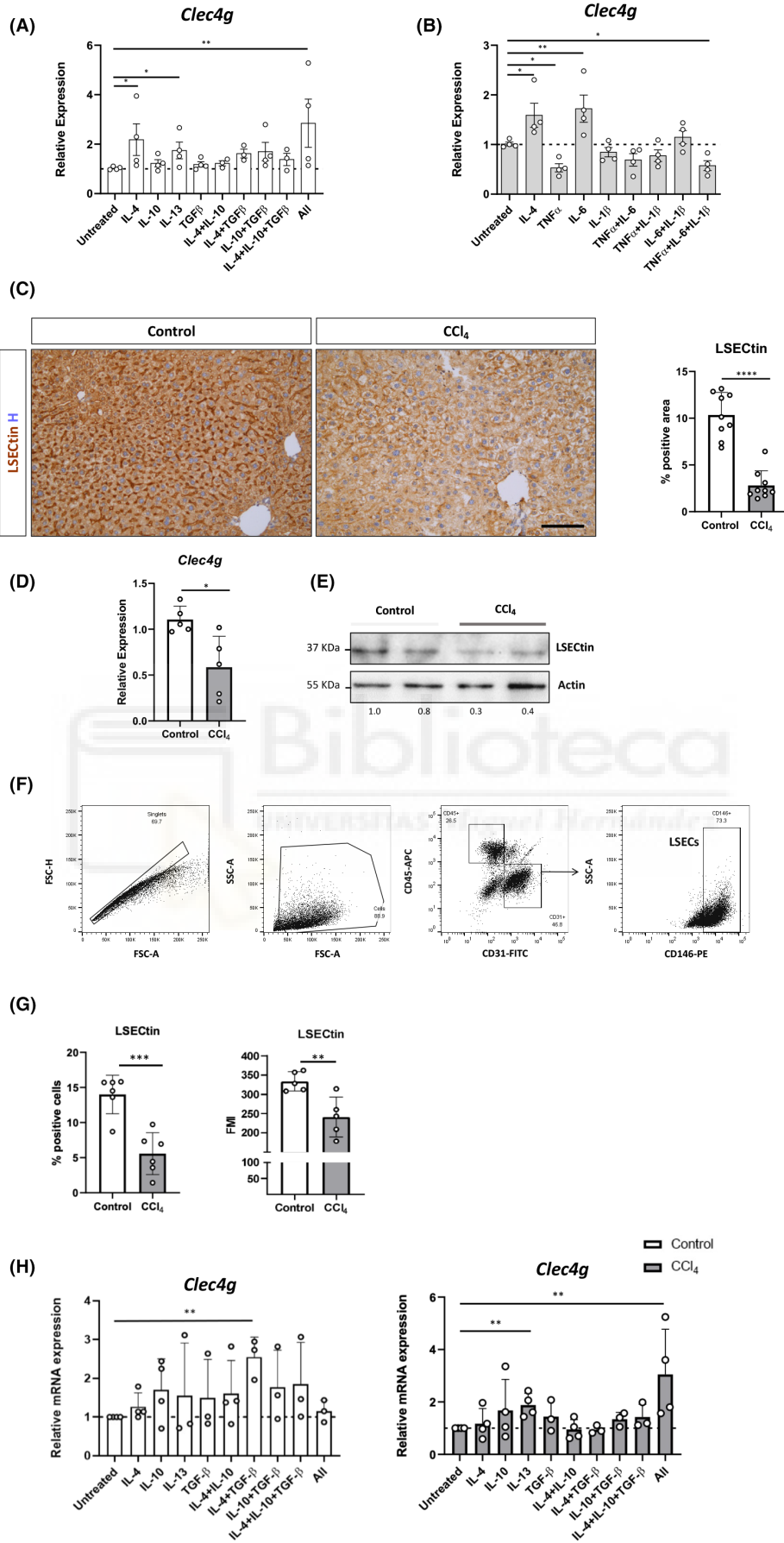


FIGURE 5 LSEctin cytokine regulation in the *in vitro* and *in vivo* models. (A) mRNA relative expression of *Clec4g* in imLSECs upon stimulation with anti-inflammatory cytokines alone or in combination for 48 h. (B) mRNA relative expression of LSEctin in imLSECs upon stimulation with proinflammatory cytokines alone or in combination. IL-4 was included as positive control. Mean \pm standard deviation from four independent experiments is represented. (C) Immunohistochemistry and densitometry of LSEctin expression in sections of paraffin-embedded mouse liver tissue from control ($n=9$) and cirrhotic ($n=9$) animals subjected to CCl_4 administration. LSEctin expression was blindly measured in user-specified regions of interest (ROIs) as brown area percentage in haematoxylin-stained sections using the ImageJ software. This quantification is represented in a bar graph. (D) mRNA relative expression of *Clec4g* in liver tissue homogenates from control ($n=5$) and cirrhotic ($n=5$) animals subjected to CCl_4 administration. (E) Western blot analysis of LSEctin in liver tissue homogenates ($n=3$ /lane). Band densitometry is shown below the images relatively to Actin and the first control densitometry. (F) Gating strategy for sorting primary LSECs. After removing doublets and cellular debris, LSECs were sorted as CD45^- , CD31^+ and CD146^+ . (G) Percentage of LSEctin⁺ LSECs, relative to the total cells analysed, and values of fluorescent mean intensity (FMI) of LSEctin⁺ LSECs in control ($n=5$) and cirrhotic ($n=5$) animals subjected to CCl_4 administration. (H) mRNA relative expression of *Clec4g* in primary sorted LSECs from control and cirrhotic mice, stimulated with anti-inflammatory cytokines alone or in combination for 48 h. Mean \pm standard deviation from four independent experiments is represented. APC, allophycocyanin; FITC, fluorescein 5-isothiocyanate; FSC-A, forward scatter area; FSC-H, forward scatter height; PE, phycoerythrin; SSC, side scatter. *p* values are indicated as follows (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$ and **** $p < .0001$).

LSECs ubication in the merge of vascular sinusoidal blood flow and hepatic parenchyma is a key in the immune tolerogenic function.²³ They express scavenger and pathogen receptors as well as intercellular communication ligands in charge of controlling the tolerogenic microenvironment in the liver. As chronic hepatic damage progresses, a compromised immune function is developed, as revealed by differential modulation of receptors in non-parenchymal cells that receive the gut-derived antigenic load.²⁴ We observe a progression in the downregulation of LSEctin expression in human hepatic tissue during progression of cirrhosis, first in compensated patients compared with healthy and with an exacerbated downregulation in patients with decompensated cirrhosis. In addition, its secreted isoform at plasma level increases during the hepatic disease evolution. In fact, the soluble LSEctin form of the receptor can be detected in the peripheral blood and potentially expand a distant function as opsonin for systemic pathogen recognition or leukocyte blockade.²² Also, it might be worth to explore its value as a potential biomarker to distinguish between compensated and decompensated stages of cirrhosis.

We stimulated imLSECs and LSEctin-CRISPR imLSECs to *in vitro* analyse the implications of LSEctin downregulation in the immune response control, survival and MAPKs signalling pathways, and its contribution to LSECs secretome profile. Activation of MAPK and Akt has been implicated in promoting endothelial cells survival and motility,^{25,26} and ERK1/2-Akt axis has been shown to regulate LSEC proregenerative/profibrotic phenotypes in the CCl_4 and bile duct-ligated models of ACLD.²⁷ Although the lack of a non-targeting gRNA for controlling the LSEctin-CRISPR knockdown may be a limitation, we have identified that LSEctin interaction with specific ligands CD44 and LAG3 in imLSECs induces phosphorylation of these substrates, and that this activation can be abrogated when LSEctin is downregulated (LSEctin-CRISPR imLSECs). Accordingly, LSEctin has been shown to interact with mTOR in a myeloid cell model *in vitro*,²⁸ and Akt upregulation pathway has been related to induction of LSEctin expression in colon cancer cells.²⁹ Moreover, p38 phosphorylation has been associated to inhibition of apoptosis in endothelial cells,³⁰ and NF κ B activation implicated in anti-apoptotic, cell survival activity and induction of cell adhesion molecules and

inflammatory markers.³¹ In fact, LSEctin stimulation with its specific ligands directly induces the secretion of pro-inflammatory cytokines and the attenuation of IL-10 and CCL4, which receptor CCR5 is expressed in regulatory T cells.³² The promotion of anti-apoptotic pro-survival pathways and of a regulatory cytokine microenvironment endows LSEctin as a potential player in the promotion of LSECs functional maintenance in the hepatic sinusoid.

Innate activity usually involves the synergistic signalling of multiple receptors in antigen presenting cells. The collaboration between C-type lectins and TLRs has been described in the past.^{12,33-35} This interaction can be especially relevant in the liver, as the hepatic endothelial tissue constantly faces a significant antigenic burden from commensal bacteria reaching the liver through portal circulation. The elicited signalling induced by LSECs stimulation with specific TLR ligands was modulated by LSEctin crosslinking, with a differential transductional effect with each LSEctin ligand. While LAG-3 was able to rapidly induce phosphorylation on different substrates, CD44 only showed an early synergistic effect with LPS on NF κ B activation. These results, and the opposite interacting effect observed in LSEctin-CRISPR cells, support the crosstalk between LSEctin and TLR in the immune response control, survival and MAPKs signalling pathways in LSECs. Similarly, others have described the collaboration between DC-SIGN and Dectin-1, also C-type lectins, and TLR4.^{12,34} In addition, this interaction is translated into secreted cytokines in charge of the tissue microenvironment regulation. Despite early differences in LSEctin signalling through CD44 and LAG-3, the proinflammatory secretome profile induced by TLRs activation is homogeneously counteracted by LSEctin crosslinking with its both natural ligands in LSECs, while the anti-inflammatory cytokines are upregulated under LSEctin activation. Likely, a distinct time course, yet in the same direction, for signalling pathways induced by CD44 and LAG-3 interaction with TLRs may explain the common secretome profile induced by LSECs at 72 h after costimulation with TLRs ligands and CD44 or LAG-3. Also of interest, IFN- γ was downregulated in LSEctin-CRISPR LSECs cultured with TLR2 and TLR4 ligands and CD44 or LAG-3. However, immunomodulatory roles for IFN- γ have been described in the context of inflammatory and autoimmune experimental diseases such as colitis or arthritis,³⁶⁻³⁸ pointing

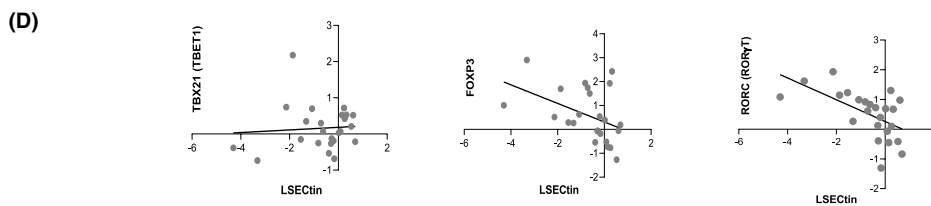
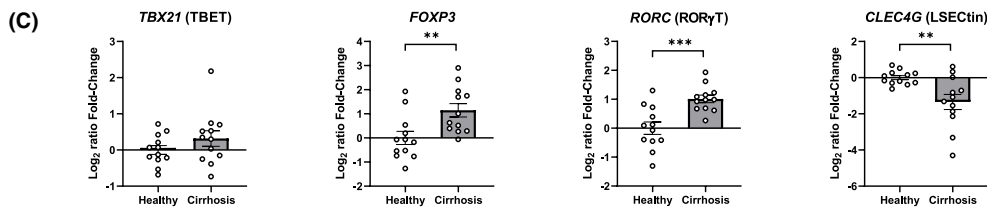
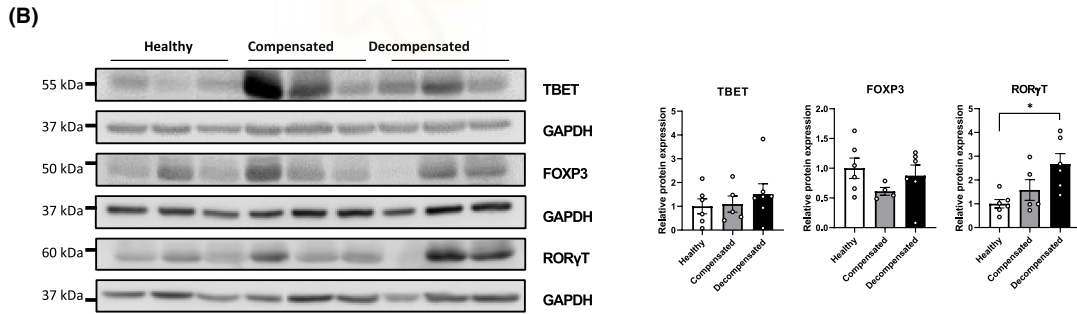
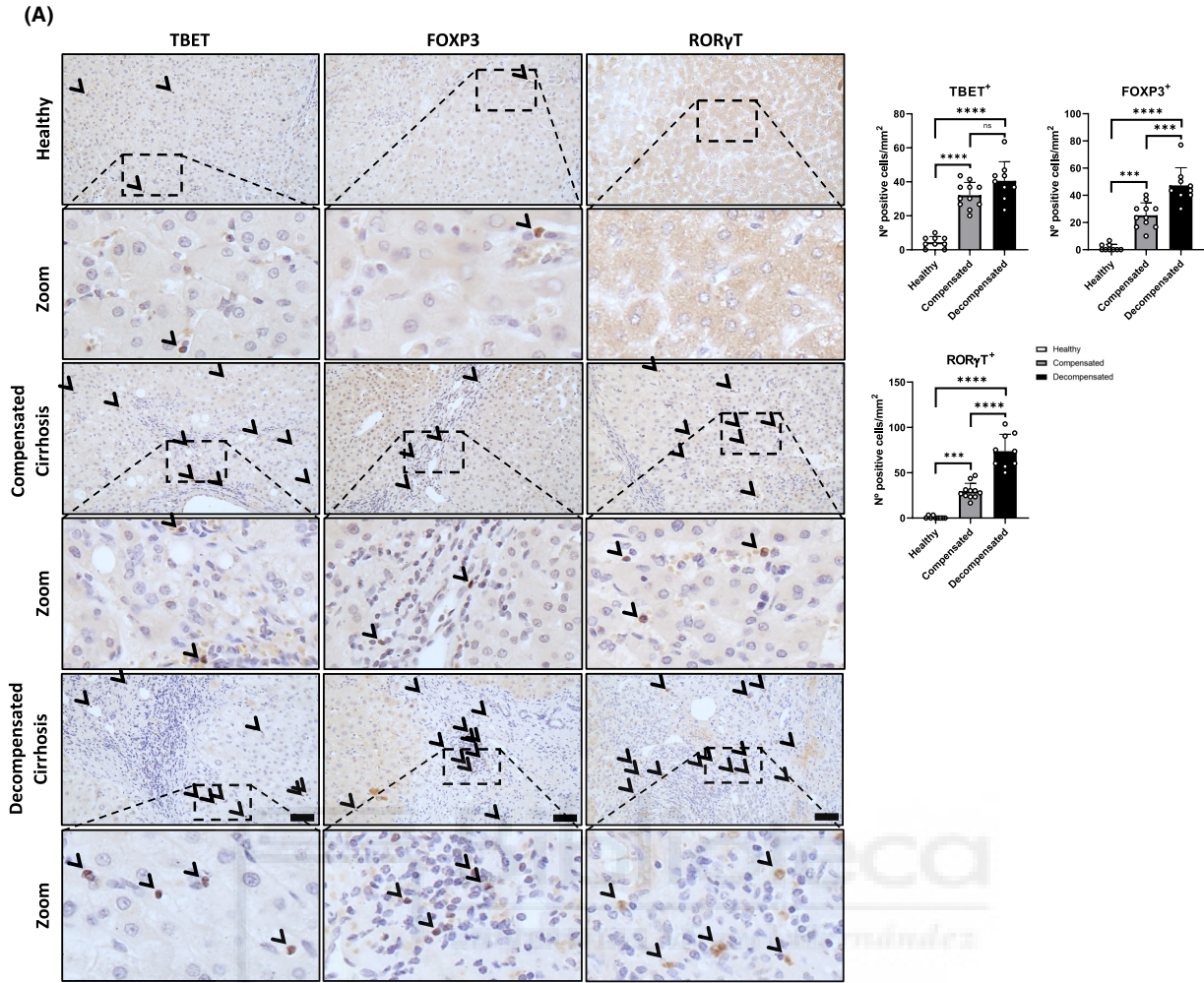


FIGURE 6 LSECtin expression in the liver inversely correlates with Th17 expansion in cirrhosis. (A) Representative Immunohistochemistry of the lymphocyte-specific transcription factors TBET1 (Th1), FOXP3 (Treg) and ROR γ T (Th17), in sections of paraffin-embedded human liver tissue of a healthy donor, a compensated and a decompensated cirrhotic patient. Protein expression was blindly measured by densitometry in user-specified regions of interest (ROIs) as the number of positive cells in haematoxylin-stained sections using the ImageJ software. This quantification is represented in a bar graph where dots represent each individual control ($n=9$), compensated ($n=11$) and decompensated ($n=9$) patient. (B) Western blot of TBET1, FOXP3 and ROR γ T in human liver tissue from three different healthy donors, compensated and decompensated patients. A representative Western blot of six independent experiments is shown. Relative quantitation of TBET1, FOXP3 and ROR γ T protein expression in human liver tissue. Each dot represents individual healthy donors ($n=6$), compensated ($n=5$) and decompensated ($n=7$) cirrhotic patients. (C) Relative mRNA expression of *TBX21*, *FOXP3*, *RORC* and *CLEG4G* expressed as the fold change calculated from human liver transcriptomic analysis comparing healthy ($n=12$) and cirrhotic ($n=12$) tissue. (D) Correlation between *CLEG4G* and *TBX21*, *FOXP3* and *RORC* expression from the transcriptomic data. Pearson r value is indicated in the graph. p values are indicated as follows (*) $p < .05$; (**) $p < .01$; (***) $p < .001$ and (****) $p < .0001$.

to the complex immunobiology of this mediator in the inflammatory context. Anyhow, these results indicate a role for LSECtin in the modulation of TLR engaging by the incoming bacterial antigens or their products in the hepatic sinusoid and highlight the potential interest in stimulating LSECtin for the amelioration of the hepatic immune homeostasis in cirrhosis.

The hepatic tissue milieu is defined by a complex interchange on cytokine signalling.³⁹ Cytokine-dependent regulation of C-type lectins has been investigated in the past. IL-4 has been shown to induce the expression of dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN), another C-type lectin subfamily member, in myeloid cellular subsets. In addition, it is negatively regulated by IFN- γ , TGF- β and anti-inflammatory agents, such as dexamethasone.⁴⁰ Similarly, IL-4 induces the *in vitro* expression of LSECtin in myeloid cells.²² Additionally, CXCL8 chemokine also activates LSECtin expression in colon cancer cells.²⁹ Our data point to the anti-inflammatory cytokine context as regulator of LSECtin levels in LSECs despite LSECtin increased expression also in response to IL-6, which depending on the tissue microenvironment, can act as immune suppressor by inducing myeloid cells-derived IL-10 production.⁴¹ In the pathologic context, we assessed the possibility of re-establishing LSECtin expression in damaged LSECs during cirrhosis. Isolated cells from our murine model recovered their levels of LSECtin expression when exposed to IL-13 and pooled anti-inflammatory cytokines. The shared receptor subunit IL-4R α between IL-4 and IL-13 and the common elicited downstream JAK/STAT signalling cascade may help explain the similar effect of these cytokines on LSECtin induction in LSECs.⁴² These results show that LSECtin can be actively modulated and reconstituted after cirrhosis development. In fact, LSEC functional activation by soluble mediators is well documented during chronic inflammation. LSEC is activated by TNF- α and IFN- γ facilitating T cell extravasation,⁴³ and the dynamic chemokine microenvironment interacts with adhesion molecule profiles on LSECs.⁴⁴

Finally, we have aimed at exploring the Th expansion in the human cirrhotic liver and its potential association with LSECtin, observing an inverse correlation between the expression of this C-type lectin and pro-inflammatory Th17 proliferation, which has been proven to contribute to liver disease progression.⁴⁵ Although this association needs to be confirmed by specifically

designed studies, results suggest that LSECtin may restrict the pro-inflammatory T cell response at the hepatic sinusoid therefore reinforcing the homeostatic function of LSECtin in preventing liver injury progression.

In summary, LSECtin can interact and restrain TLR proinflammatory secretome induced by microbial antigenic challenge on LSECs by interceding in immune response control, survival and MAPKs signalling pathways. The anti-inflammatory cytokine-dependent induction of LSECtin and the association between the loss of LSECtin and the expansion of a Th17 cell subset in the liver provides a solid background for exploring LSECtin retrieval as a mechanism to reprogram LSEC homeostatic function hampered during cirrhosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Samanta Ortuño, from IIS ISABIAL, for her assistance in bioinformatic analyses.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación PID2019-107036RB-I00 and PID2020-117941RB-I00, Instituto de Salud Carlos III PMP21/0082, PI20/00220 and DTS22/00010, EU Horizon-HLTH-2022-STAYHLTH-02 under agreement No. 101095679, Generalitat Valenciana Prometeo 2021/033, Comunidad de Madrid ExoHep2 S2022/BMD-7409 and AGAUR-Generalitat Catalunya (2021 SGR 01322 and 2021 PROD 00036). CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III using grants cofinanced by the European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" (EDRF).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors do not have any disclosures to report.

ORCID

Sebastián Martínez-López  <https://orcid.org/0000-0003-1720-845X>

Enrique Ángel-Gomis  <https://orcid.org/0000-0003-0736-7625>

Javier Morante  <https://orcid.org/0000-0002-5594-0644>

Francisco J. Cubero  <https://orcid.org/0000-0003-1499-650X>

Rubén Francés  <https://orcid.org/0000-0001-5105-1201>

REFERENCES

1. Gines P, Krag A, Abraldes JG, et al. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2021;398:1359-1376.
2. Brown GD, Willment JA, Whitehead L. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2018;18:374-389.
3. Zapotoczny B, Szafranska K, Kus E, et al. Tracking fenestrae dynamics in live murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*. 2019;69:876-888.
4. Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases. *J Hepatol*. 2017;66:212-227.
5. Gracia-Sancho J, Caparros E, Fernandez-Iglesias A, et al. Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18:411-431.
6. Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:753-766.
7. Shetty S, Lalor PF, Adams DH. Liver sinusoidal endothelial cells - gatekeepers of hepatic immunity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15:555-567.
8. Dominguez-Soto A, Aragonese-Fenoll L, Gomez-Aguado F, et al. The pathogen receptor liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin is expressed in human Kupffer cells and regulated by PU.1. *Hepatology*. 2009;49:287-296.
9. Tang L, Yang J, Liu W, et al. Liver sinusoidal endothelial cell lectin, LSECTin, negatively regulates hepatic T-cell immune response. *Gastroenterology*. 2009;137:1498-1508 e1-5.
10. Caparros E, Juanola O, Gomez-Hurtado I, et al. Liver sinusoidal endothelial cells contribute to hepatic antigen-presenting cell function and Th17 expansion in cirrhosis. *Cell*. 2020;9:1227.
11. Racanelli V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. 2006;43:S54-S62.
12. Caparros E, Munoz P, Sierra-Filardi E, et al. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood*. 2006;107:3950-3958.
13. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2. *J Exp Med*. 2003;197:1107-1117.
14. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406:782-787.
15. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004;430:257-263.
16. Mencin A, Kluge J, Schwabe RF. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut*. 2009;58:704-720.
17. Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Peiro G, et al. Gut microbiota dysbiosis is associated with inflammation and bacterial translocation in mice with CCl4-induced fibrosis. *PLoS ONE*. 2011;6:e23037.
18. Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, et al. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol*. 2007;47:220-227.
19. Meyer J, Gonelle-Gispert C, Morel P, Bühler L. Methods for isolation and purification of murine liver sinusoidal endothelial cells: a systematic review. *PLoS ONE*. 2016;11:e0151945.
20. Huebert RC, Jagavelu K, Liebl AF, et al. Immortalized liver endothelial cells: a cell culture model for studies of motility and angiogenesis. *Lab Invest*. 2010;90:1770-1781.
21. Manicardi N, Fernandez-Iglesias A, Abad-Jorda L, et al. Transcriptomic profiling of the liver sinusoidal endothelium during cirrhosis reveals stage-specific secretory signature. *Cancers (Basel)*. 2021;13:2688.
22. Dominguez-Soto A, Aragonese-Fenoll L, Martin-Gayo E, et al. The DC-SIGN-related lectin LSECTin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells. *Blood*. 2007;109:5337-5345.
23. Pandey E, Nour AS, Harris EN. Prominent receptors of liver sinusoidal endothelial cells in liver homeostasis and disease. *Front Physiol*. 2020;11:873.
24. Albillos A, Martin-Mateos R, Van der Merwe S, et al. Cirrhosis-associated immune dysfunction. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022;19:112-134.
25. Alavi A, Hood JD, Frausto R, Stupack DG, Cheresch DA. Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli. *Science*. 2003;301:94-96.
26. Srinivasan R, Zabuawala T, Huang H, et al. Erk1 and Erk2 regulate endothelial cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. *PLoS ONE*. 2009;4:e8283.
27. Lao Y, Li Y, Zhang P, et al. Targeting endothelial Erk1/2-Akt Axis as a regeneration strategy to bypass fibrosis during chronic liver injury in mice. *Mol Ther*. 2018;26:2779-2797.
28. Li Q, Cheng H, Liu Y, et al. Activation of mTORC1 by LSECTin in macrophages directs intestinal repair in inflammatory bowel disease. *Cell Death Dis*. 2020;11:918.
29. Fang S, Cheng X, Shen T, et al. CXCL8 up-regulated LSECTin through AKT signal and correlates with the immune microenvironment modulation in colon cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14:5300.
30. Wang X, Wang Y, Kim HP, Choi AMK, Ryter SW. FLIP inhibits endothelial cell apoptosis during hyperoxia by suppressing Bax. *Free Radic Biol Med*. 2007;42:1599-1609.
31. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023.
32. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 2005;22:329-341.
33. van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:697-709.
34. Seifert L, Deutsch M, Allothman S, et al. Dectin-1 regulates hepatic fibrosis and hepatocarcinogenesis by suppressing TLR4 signaling pathways. *Cell Rep*. 2015;13:1909-1921.
35. 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;20:5790-5812.
36. Sawitzki B, Kingsley CI, Oliveira V, Karim M, Herber M, Wood KJ. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function *in vivo*. *J Exp Med*. 2005;201:1925-1935.
37. Rozman P, Svajcar U. The tolerogenic role of IFN-gamma. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;41:40-53.
38. Thelemann C, Eren RO, Coutaz M, et al. Interferon-gamma induces expression of MHC class II on intestinal epithelial cells and protects mice from colitis. *PLoS ONE*. 2014;9:e86844.
39. Kubes P, Jenne C. Immune responses in the liver. *Annu Rev Immunol*. 2018;36:247-277.
40. Relloso M, Puig-Kroger A, Pello OM, et al. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J Immunol*. 2002;168:2634-2643.
41. Tang M, Diao J, Gu H, Khatri I, Zhao J, Catral MS. Toll-like receptor 2 activation promotes tumor dendritic cell dysfunction by regulating IL-6 and IL-10 receptor signaling. *Cell Rep*. 2015;13:2851-2864.
42. Dutta AK, Boggs K, Khimji AK, et al. Signaling through the interleukin-4 and interleukin-13 receptor complexes regulates cholangiocyte TMEM16A expression and biliary secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2020;318:G763-G771.
43. Curbishley SM, Eksteen B, Gladue RP, Lalor P, Adams DH. CXCR 3 activation promotes lymphocyte transendothelial migration across human hepatic endothelium under fluid flow. *Am J Pathol*. 2005;167:887-899.

44. Wilkinson AL, Qurashi M, Shetty S. The role of sinusoidal endothelial cells in the Axis of inflammation and cancer within the liver. *Front Physiol.* 2020;11:990.
45. Rau M, Schilling AK, Meertens J, et al. Progression from nonalcoholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis is marked by a higher frequency of Th17 cells in the liver and an increased Th17/resting regulatory T cell ratio in peripheral blood and in the liver. *J Immunol.* 2016;196:97-105.

How to cite this article: Martínez-López S, Ángel-Gomis E, Gómez-Hurtado I, et al. Cirrhosis-downregulated LSECtin can be retrieved by cytokines, shifts the TLR-induced LSECs secretome and correlates with the hepatic Th response. *Liver Int.* 2024;00:1-15. doi:[10.1111/liv.15836](https://doi.org/10.1111/liv.15836)

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.



9. ARTÍCULO 2

Martínez-López S, et al., “LSECTin attenuates hepatic Th17 expansion in a murine model of cirrhosis and signals through LAG-3 receptor”. **JHEP Rep.** 2025 Jun 10;7(9):101482. doi: 10.1016/j.jhepr.2025.101482.

A. OBJETIVO

Demostramos que la represión de LSECTin durante la cirrosis está relacionada con el aumento de las Th17. El objetivo de este trabajo fue el de estudiar los efectos de mantener niveles altos de LSECTin durante la cirrosis en estas poblaciones de linfocitos, a la vez que se exploraba el mecanismo molecular de dicha interacción.

B. RESUMEN

Los ratones de sobreexpresión de LSECTin (Ki), mantienen niveles elevados de esta proteína durante la cirrosis experimental en contraposición a los controles, donde se reprime. Esta sobreexpresión de LSECTin se traduce en una modulación del sistema inmunitario del hígado caracterizada por un aumento de Tregs y una marcada bajada de linfocitos Th17. Estos cambios promueven una resistencia parcial al desarrollo del daño histológico con menos expresión de marcadores profibrogénicos (α SMA) o de muerte celular por necroptosis (pMLKL). En lo referente al mecanismo, tras demostrar el aumento claro de la expresión de LAG3 durante la cirrosis en linfocitos en general, y en las Th17 en particular, observamos que la diferenciación *in vitro* a Th17 se vio interrumpida por la presencia de LSECTin, y que este bloqueo desaparecía en presencia de un anticuerpo anti-LAG3. De la misma manera, la interrupción de las vías de señalización necesarias para tal diferenciación que se veían interrumpidas por LSECTin, en el caso del TCR (pZAP70) y la IL-6 (pSTAT3), eran rescatadas de nuevo por el anticuerpo anti-LAG3 demostrando su relación. En el caso de tejidos humanos, observamos un aumento de Th17 positivas para LAG3 en hígados cirróticos.

C. CONCLUSIÓN

La sobreexpresión de LSECTin durante la cirrosis mitiga la progresión de la fibrosis y el daño inflamatorio modulando las proporciones de linfocitos. Concretamente, promueve poblaciones reguladoras en detrimento de las Th17 vía el receptor LAG3.

LSEctin attenuates hepatic Th17 expansion in a murine model of cirrhosis and signals through the LAG-3 receptor

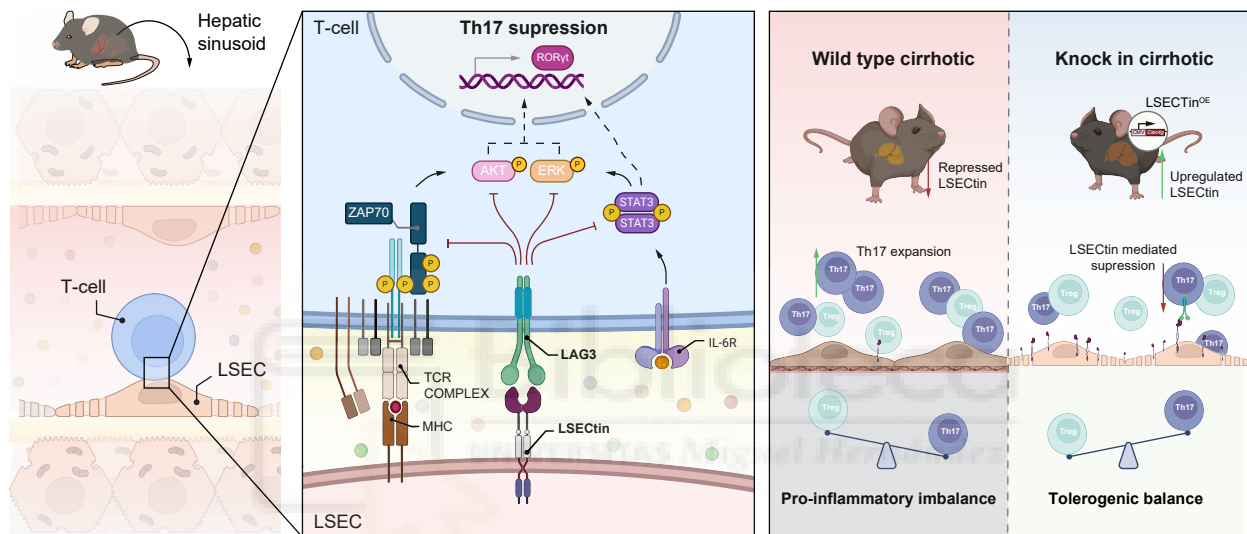
Authors

Sebastián Martínez-López, Oriol Juanola, Isabel Gómez-Hurtado, ..., Amaya Puig-Kröger, Esther Caparrós, Rubén Francés

Correspondence

rfrances@umh.es (R. Francés), ecaparros@umh.es (E. Caparrós).

Graphical abstract



Highlights:

- We have generated a murine model of LSEctin overexpression.
- LSEctin modulates the Th profile and reduces proinflammatory cell death in cirrhosis.
- LSEctin attenuates Th17 differentiation through LAG3 signaling.
- Restoring LSEctin positively impacts on fibrosis and serum markers of liver function.

Impact and implications:

LSEctin downregulation is associated with the expansion of Th17 cell subpopulation during cirrhosis. Findings highlight the crucial role of LSEctin in regulating immune responses and mitigating liver damage in cirrhosis. Restoring LSEctin expression through targeted liver-directed molecular interventions may be of therapeutic relevance in cirrhosis.

LSEctin attenuates hepatic Th17 expansion in a murine model of cirrhosis and signals through the LAG-3 receptor

Sebastián Martínez-López^{1,2}, Oriol Juanola^{1,2,3}, Isabel Gómez-Hurtado^{2,3}, Enrique Ángel-Gomis^{1,2}, Paula Boix^{1,2}, Anabel Fernández-Iglesias^{3,4}, Alex Gallardo-Cruz¹, Francisco Javier Cubero^{3,5}, Jordi Gracia-Sancho^{3,4}, Amaya Puig-Kröger⁶, Esther Caparrós^{1,2,3,*}, Rubén Francés^{1,2,3,*}

JHEP Reports 2025, vol. 7 | 1–12



Background & Aims: LSEctin downregulation during cirrhosis progression is associated with adaptive T-cell expansion. We analyzed the molecular mechanism for LSEctin modulation of Th17 proliferation in an experimental cirrhosis model.

Methods: A transgenic mouse model of Clec4g/LSEctin overexpression (Clec4g KI) was subjected to CCl₄-induced cirrhosis. Cell death, liver function, and inflammation markers (n = 6/group) were evaluated. LSEctin-LAG3 signaling in Th17-differentiated spleen cells (n = 5) and LAG3 expression in livers of human individuals with cirrhosis (n = 6) were also characterized.

Results: Densitometric LSEctin expression was significantly downregulated during cirrhosis in wild-type but not Clec4g-KI mice (0.6 ± 0.2 vs. 2.3 ± 0.6 AU, *p* = 0.001). LSEctin overexpression in cirrhotic mice resulted in less histological damage and improved liver enzyme levels (alanine aminotransferase: 152.7 ± 66.3 vs. 76.33 ± 13.33 U/L, *p* = 0.004). Cell-death pathway analysis revealed no differences in apoptosis markers *Casp3* and *Casp8* but reduced levels of necroptotic intermediates *Mlkl* and *Ripk3*. LSEctin overexpression reduced hepatic leukocyte infiltration and enriched the differentiation from inflammatory Rorγt⁺/IL-17⁺ (2.4 ± 0.8 vs. 7.7 ± 3.5% CD4⁺, *p* = 0.043) to regulatory Foxp3⁺/IL-10⁺ cells (3.6 ± 0.9 vs. 1.2 ± 0.7% CD4⁺, *p* = 0.047) in cirrhotic animals. LSEctin interacted with LAG-3 on polarized spleen-derived CD4⁺ T cells, inhibiting Th17 differentiation (10.5 ± 2.7 vs. 6.6 ± 2.1% CD4⁺, *p* = 0.037) by suppressing Stat3 and Zap70 pathways. LSEctin did not restrain the Th17 subset expansion during LAG3 blockade (6.6 ± 2.1 vs. 14.2 ± 4.0% CD4⁺, *p* = 0.005). Livers of human individuals with cirrhosis showed increased LAG-3-expressing Th17 cells compared with controls (3.2 ± 1.4 vs. 0.1 ± 0.1 cells/mm², *p* = 0.001).

Conclusions: We have established a valuable murine model of LSEctin overexpression to assess its impact on hepatic inflammation during cirrhosis. LAG-3 was identified as the molecular mechanism by which LSEctin attenuates Th17 differentiation. Given LSEctin capacity to modulate the Th profile and decrease proinflammatory cell death, liver-directed molecular approaches to restore its expression may be of therapeutic interest during cirrhosis.

© 2025 The Author(s). Published by Elsevier B.V. on behalf of European Association for the Study of the Liver (EASL). This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Hepatic inflammation is a hallmark of advanced chronic liver disease (aCLD).¹ Microbiota changes and gut barrier dysfunction during disease progression are important contributing factors to liver inflammation.^{2,3} Antigen derived from dysbiotic microbiota can reach the liver and are initially recognized by pattern recognition receptors such as Toll-like receptor (TLRs) or NOD-like receptors present in sinusoidal resident cells, namely Kupffer cells and liver sinusoidal endothelial cells (LSECs).⁴ Following this recognition, different signaling pathways involved in transcription upregulation and proinflammatory cytokine secretion are activated, enabling further cellular recruitment and define the inflammatory tissue microenvironment.⁵ This increased percentage of intrahepatic T helper (Th)17 cells has been associated with the progression from metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) to metabolic dysfunction-associated steatohepatitis

(MASH) in patients with MASLD,⁶ and with the progression of chronic liver disease and the activation of profibrotic pathways in patients with HBV infection.⁷ In the context of established cirrhosis, the progressive expansion of Th17 cells in the liver tissue of patients with compensated and decompensated cirrhosis has been recently described.⁸

LSEctin is an innate C-type lectin receptor expressed by LSECs that becomes crucial for modulating proinflammatory T-cell proliferation in the liver by interfering with CD44 and Lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3)-mediated signaling.⁹ The role of LSEctin in suppressing the hepatic adaptive immune response has been confirmed by the increased T-cell proliferation observed in LSEctin-deficient mice following acute liver injury. Conversely, administering recombinant LSEctin to these mice can mitigate liver damage during stages characterized by proinflammatory rather than tolerogenic responses.¹⁰ During experimental chronic liver disease, the hepatic upregulation of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha

* Corresponding authors. Address: Hepatic and Intestinal Immunobiology Group, Department of Clinical Immunology, School of Medicine, Miguel Hernández University, San Juan de Alicante, Spain. Tel.: +34-965-233-796.

E-mail addresses: rfrances@umh.es (R. Francés), ecaparrós@umh.es (E. Caparrós), <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2025.101482>



or IL-6 is associated with a significantly downregulated transcriptional profile of LSEctin.¹¹ In fact, LSEctin expression is reduced upon stimulation of cultured primary murine LSECs with proinflammatory cytokines.⁸ In this same study, we also confirmed that the signaling pathways activated by LSEctin influence the LSEC-induced secretome, modulating TLR-induced responses and contributing to a shift in the inflammatory microenvironment in the CCl₄-cirrhotic murine model. Moreover, LSEctin is progressively downregulated in the liver of decompensated patients compared with compensated patients with cirrhosis and its loss is associated with a hepatic Th17 proinflammatory enrichment.⁸ These results led us speculate that LSEctin directs Th17 downregulation and that this C-type lectin receptor retrieval may help restore LSEC immune function during cirrhosis. In fact, C-type lectin receptors have been involved in the control of Th differentiation.¹²

To evaluate the mechanism for LSEctin modulation of Th17 expansion, we have generated a transgenic LSEctin overexpression mouse model. After confirming that LSEctin overexpression counterbalances the proinflammatory T cell associated immune response and attenuates liver damage during experimental cirrhosis, we explored the mechanism for LSEctin regulation of Th-cell differentiation through LAG-3 receptor engagement *in vitro*.

Animals and methods

Transgenic mice and genotyping

The LSEctin overexpression (LSEctin^{OE}) mouse or knock-in (Ki) model was generated in the facilities of the Faculty of Health and Medical Sciences of Copenhagen University. In brief, *Clec4g* cDNA (ENSMUST00000062037) was cloned in the pcDNA3.1 plasmid under the control of the ubiquitous Cytomegalovirus (CMV) promoter. After releasing the CMV-Clec4G segment from the vector it was injected in the pronuclei of the C57BL/6NRj zygotes promoting its insertion in a random location in the mouse genome. The healthy pups positive for the insertion were selected and crossed to establish a colony. The offspring of these mice were rigorously genotyped for the inclusion of the intact transgene before being included it into the experiments (Fig. S1). No phenotypical differences were found between untreated Ki mice and untreated wild-type (Wt) mice.

Genotyping was performed at weaning. DNA was extracted from ear samples and analyzed by PCR. Ear samples were digested using 25 mM NaOH and 0.2 mM EDTA. After 30 min at 98 °C the digestion was neutralized with TRIS HCl 40 mM pH = 7.4. Then the DNA was isolated by vortexing and centrifugation at 13,000 rpm for 5 min at 22 °C. DNA was added to the mix with the Taq PCR Master Mix Kit (201445, Qiagen, Hilden, Germany) and the primers. The result was observed using electrophoresis in a 1% agarose gel prepared with 1 × Tris-Acetate-EDTA buffer and GelRed^R staining (SCT123, Merck, Rahway, New Jersey, USA). Primers used for the genotyping can be found in Table S1.

Experimental cirrhosis induction

Wt (C57Bl/6J) (Harlan, Barcelona, Spain) and LSEctin^{OE} male mice were included in a 12-week study protocol. Mice were caged at a constant room temperature of 21 °C and exposed to

a 12 h:12 h light/dark cycle. Adult mice weighing 20–22 g were fed with standard rodent chow and treated with 0.25 mmol/L phenobarbital in tap water during the study protocol. After 4 weeks, animals were subjected to experimental cirrhosis induction with two weight-controlled doses of CCl₄ per week (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) administered intragastrically as described previously.¹³ Control animals received mineral oil for that period. Animals were sacrificed when severely ill, and death was suspected to be imminent. Laparotomies were performed under anesthesia with isoflurane at week 12 as described. During this process blood samples were collected by cardiac puncture before perfusion. After hepatic perfusion, livers were set aside either for molecular biology and histology experiments or flow cytometry experiments. Animals received care according to the criteria outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The study was approved by the Animal Research Committee of Universidad Miguel Hernández (Alicante, Spain) with approval number 2024/VSC/PEA/0180.

Patients and human samples

Samples from patients with cirrhosis (n = 6) and from healthy donors (n = 4) were included in the study. Available human liver samples remnants from non-lesioned non-tumorous liver tissue resections were used from healthy controls and compared with cirrhotic liver tissue explants from patients who underwent liver transplantation. The study was performed in agreement with the Declaration of Helsinki and with local and national laws. The Human Ethics Committee of the hospital approved the study procedures (HCB/2015/0624), and all participants voluntarily signed an informed written consent before inclusion in the study.

CD4 isolation, Th17 differentiation, and TCR and IL-6 downstream signaling

To obtain CD4⁺ cells for *in vitro* experiments, spleens were extracted from the Wt control mice of the protocol. CD4⁺ were obtained by magnetic cell sorting with the CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Then, purified CD4⁺ cells were cultured in α -CD3 (5 μ g/ml, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) coated plates, and then exposed to pro-Th17 conditions (α -CD28 [2.5 μ g/ml, BD Biosciences], 5 ng/ml transforming growth factor beta [TGF- β , Peprotech, Cranbury, New Jersey, United States], and 30 ng/ml IL-6 [Peprotech] or pro-Treg conditions (α -CD28 [2.5 μ g/ml, BD Biosciences], 5 ng/ml TGF- β [Peprotech] and 10 ng/ml IL-2 [Peprotech] alone or in combination with 25 μ g/ml LSEctin-fc (NovusBio, Littleton, Colorado, United States) and 25 μ g/ml α -LAG-3 (eBioC9B7W, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) during 5 days. After that, cells were stained for flow cytometry. As controls, cells were stimulated with α -CD3 and α -CD28 alone. Both the controls and the pro-Th17 or pro-Treg conditions included a control IgG of the same isotype of the constant fraction (fc) of LSEctin-fc.

In parallel, to study the molecular pathways involved in this process, a fraction of CD4⁺ cells were exposed to α -CD3 and α -CD28 for 48 h to induce LAG-3 expression as described previously.¹⁴ After that, all the stimulants were removed for another 24 h. After serum starvation, CD4⁺ were stimulated again with α -CD3 (5 μ g/ml) or IL-6 (25 ng/ml, Peprotech) in the presence or absence of LSEctin-fc (25 μ g/ml) and α -LAG-3 (25 μ g/ml) for 30 min. Then, cells were collected for protein

extraction and T cell receptor (TCR) or IL-6 signaling was assessed by Western blot.

Flow cytometry

Perfused livers were digested *in vivo* with collagenase A (Merck) as previously described.¹⁵ Resultant digested livers were excised, and an *in vitro* digestion with the same buffer containing collagenase A was performed at 37 °C for 30 min. The liver cell solution was then filtered by using 100 µM nylon strainers and collected in cold Krebs's solution containing 25 mM HEPES. The cell suspension was centrifuged at 50 × *g* for 5 min, and non-parenchymal cells were separated by collecting the supernatants and then centrifuged at 800 × *g* for 10 min. Resultant pellets were resuspended in 10 ml of Percoll 40% and non-parenchymal cells were enriched and isolated by differential centrifugation at 800 × *g* for 25 min. Cells from the pellet were collected, washed with PBS without Ca²⁺ and Mg,² and resuspended in PBS supplemented with 2% FBS and 2 mM EDTA for cytometric staining. Lymphocytes from the differentiation protocols were also collected and resuspended in the latter buffer. Then, isolated cells or treated lymphocytes were divided equally and incubated with the correspondent antibodies of each cytometry panel (Table S2). To evaluate the Th CD4 differentiation profile, cells were stimulated with phorbol myristate acetate/ionomycin (50 ng/ml and 1 µg/ml, respectively) (Sigma-Aldrich) for 5 h, and Golgi traffic-blocked with monensin (BD Golgi STOP, BD Biosciences). Then, cells were then fixed, permeabilized, and stained intracellularly. Samples were analyzed in the Omics facility of the Instituto de Neurociencias de Alicante in a FACSAria II flow cytometer operated by FACSDiva software (BD Biosciences).

Biochemical markers

Serum levels of alkaline phosphatase (ALP), alanine transferase (ALT), aspartate transferase (AST), urea, albumin, total protein, cholesterol and total bile acids were determined in 200 µl of total blood using an automatic liquid biochemistry analyzer (Skyla Vb1, CVM practice, Navarra, Spain) following manufactures instructions.

Histological analysis

Sirius red staining was performed using the Picro Sirius Red Stain Kit (ab150681, Abcam, Cambridge, United Kingdom) from Abcam in 5-µm sections of paraffin-embedded mouse liver according to the manufacturer's instructions. In brief, after deparaffinization, sections were incubated in Picro Sirius red solution for 60 min followed by two quick washes in acetic acid solution and absolute alcohol.

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining was performed using the TUNEL Assay Kit - HRP-DAB (ab206386) from Abcam in 5-µm sections of paraffin-embedded mouse liver according to the manufacturer's instructions. In brief, after deparaffinization, sections were permeabilized with proteinase K and blocked with 3% hydrogen peroxide. Afterwards, the terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme was added for 90 min. To determine the biotinylated DNA (dead cells), the sections were incubated with a streptavidin-HRP and developed with 3,3'-

diaminobenzidine (DAB). The slides were then counterstained with Harris hematoxylin (HH) (Leica Biosystems, Richmond Inc., Richmond, IL, USA).

Immunohistochemical (IHC) and Immunofluorescence (IF) assays were carried out in 5-µm sections of paraffin-embedded mouse or human liver tissue. Sections were handled following standard procedures. The slides were incubated with primary antibodies for key proteins involved in hepatic homeostasis and disease. As secondary antibodies, sections were incubated with the correspondent biotinylated antibodies (Palex Medical SA, Sant Cugat del Vallés, Spain) for IHC or with Alexa-647 modified antibodies for IF. Dilutions and antibody references can be found in Table S3. IHC slides were incubated with avidin-biotin-HRP complex ABC kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) and developed with DAB (Vector Laboratories Inc.). Nuclei were stained by incubating the sections in HH or DAPI (Thermo Fisher Scientific), respectively. As a negative control, staining was carried out in the absence of a primary antibody.

Images were obtained in a camera-assisted optic Leica DMR microscope (Leica Biosystems). A semi-quantitative analysis of protein expression or a quantification of positive cells was performed using the ImageJ software (<https://rsbweb.nih.gov>).

Quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (QIAGEN) from liver samples. Quantitative PCRs were performed to evaluate the expression of *LSECtin/Clec4g*, as well as the key genes involved in hepatic disease. The reactions were performed in a 12.5 µl PCR mixture using qScript One-Step SYBR Green RT-qPCR (Quanta BioScience, Gaithersburg, MD, USA) in a CFX Connect (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). β 2-Microglobulin was used as a housekeeping gene in all gene expression analyses. Relative expression was calculated with the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. Primer pairs used in the study can be found in Table S4.

Western blot

Liver samples or cell pellets from lymphocytes were lysed with radioimmunoprecipitation assay buffer containing cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Merck) and the phosphatases inhibitors sodium fluoride and sodium orthovanadate. Protein concentration was determined using the Bradford protein assay (EMD Millipore Corp., Billerica, MA). Thirty micrograms of protein extracts were resolved under reducing conditions on 6% to 15%, SDS-polyacrylamide gels depending on the size of the protein of interest. Then, gels were transferred to Immobilon-P membranes (Merck). After blocking, membranes were incubated with primary antibodies overnight. β -Actin (Sigma-Aldrich) was used as control. Finally, membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands). Immobilon Western Chemilum HRP Substrate (EMD Millipore Corp.) was used to detect the activity of the membrane-attached peroxidase. Images were obtained in ChemiDOC XRS+ operated by Image Lab software (Bio-Rad). Protein bands were quantified by densitometry using ImageJ (<https://rsbweb.nih.gov>). Band densities were

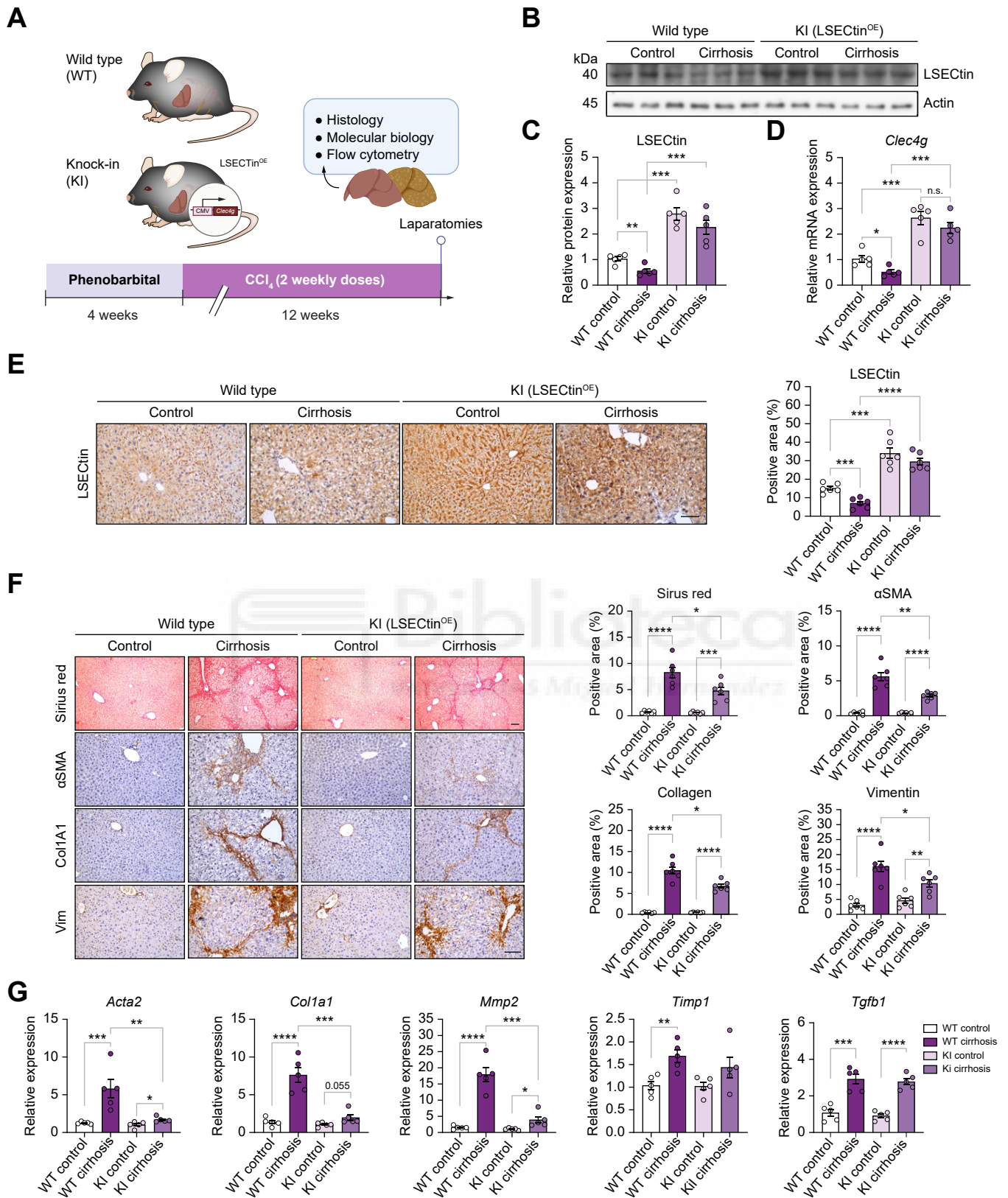


Fig. 1. LSEctin overexpression in Clec4g-KI mice attenuates liver damage in experimental cirrhosis. (A) After the induction of cirrhosis by CCl₄ for 12 weeks, livers from Wt and Clec4g-KI mice (overexpression of LSEctin under the CMV promoter) were collected for different analysis. (B–D) mRNA and protein relative expression of LSEctin in total liver homogenates. Mean ± standard deviation is represented (n = 5). (E) Representative LSEctin staining in the liver and their respective quantifications. (F) Fibrosis-related staining in the liver. Representative liver images stained with Sirius Red, α-SMA, Collagen I or Vimentin and their respective

expressed relative to total β -actin protein. Dilutions and antibody references can be found in Table S5.

Statistical analysis

Categorical variables were represented as frequency or percentages and continuous variables as mean \pm standard deviation or median and percentile values. To verify the normality of continuous variables the Kolmogorov–Smirnov test ($p < 0.05$) was used. Differences between groups were analyzed using the Mann–Whitney U test for continuous variables. Multiple comparisons were analyzed according to Bonferroni correction. All reported p -values were two-sided, and p -values < 0.05 were considered significant. GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis and graph design.

Results

LSEctin overexpression attenuates liver damage during cirrhosis

We induced cirrhosis in Wt and Clec4g-KI generated mice (Fig. 1A). LSEctin overexpression was confirmed at gene, protein, and tissue levels in Clec4g-KI mice both in control and in CCl₄-induced cirrhosis (Fig. 1B–E). LSEctin expression was significantly downregulated in cirrhosis, both in Wt and Clec4g-KI generated mice. Biochemical parameters of liver function are represented in Table 1. As observed, the increment in ALT levels and total bile acids were significantly lower in Clec4g-KI cirrhotic vs. control mice than in Wt cirrhotic vs. control mice. The histological damage observed in Wt cirrhotic mice was attenuated in our Clec4g-KI cirrhotic model as shown in Fig. 1F. Gene expression of profibrogenic markers *Acta2*, *Col1a1* and *Mmp2* were reduced in the Clec4g-KI vs. Wt cirrhotic animals, whereas *Timp1* and *Tgfb1* remained unchanged (Fig. 1G).

Cell-death related TUNEL analyses showed that apoptosis was increased during cirrhosis in Clec4g-KI and Wt cirrhotic mice compared with their controls, although it was significantly

reduced in Clec4g-KI vs. Wt cirrhotic mice (Fig. 2A). Necroptosis intermediaries receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 and 3 (*Ripk3*) and mixed lineage kinase domain like pseudokinase (*Mlkl*) expression were also down-regulated in Clec4g-KI cirrhotic mice, reaching similar levels to those observed in control mice. Apoptotic substrates *Casp3* (Caspase 3) and *Casp8* (Caspase 8) showed a significant increase during cirrhosis, without differences in gene expression between both models (Fig. 2B). End apoptotic- and necroptotic-route products *Casp3* and *Mlkl* were also evaluated at protein level. We observed a significant reduction of p-Mlkl as a validated intermediary of necroptosis pathway activation, whereas apoptosis levels, as measured by cleaved *Casp 3*, remained unaltered in Clec4g-KI vs. Wt mice during cirrhosis (Fig. 2C).

T cell immune response is counterbalanced by LSEctin overexpression during cirrhosis

Next, we set out to explore the profile of the cellular immune system infiltrating the liver during experimental cirrhosis. We observed a reduction in leukocyte infiltration in liver tissue as shown by CD45 staining (Fig. 3A) in the Clec4g-KI vs. Wt cirrhotic mice. In the T cell subpopulation characterization during cirrhosis, an increase in T CD8⁺ cell population was observed only in Wt mice. The CD4⁺ population in cirrhosis was significantly decreased in both Wt and Clec4g-KI mice. This reduction is supported by the significant reduction in gene expression levels of *Ccl5* and *Ccl20* in the Clec4g-KI cirrhotic mice (Fig. S2A). However, when comparing T CD4⁺ cells between cirrhotic models, Clec4g-KI mice showed a significant increase in this cell subset compared with Wt mice (Fig. 3B).

The functional characterization of the T cell subset revealed a significant shift of their phenotype from IL-17 to IL-10-expressing T cell subpopulations in the Clec4g-KI vs. Wt cirrhotic animals (Fig. 3C–E). We did not observe any changes in the CD4⁺IFN- γ ⁺ T cell subpopulation between groups (Fig. S3). Accompanying the change in the CD4⁺ T-cell polarization, an increase in the functionally active state marked by

Table 1. Median and percentile values of liver function parameters between study groups.

	Wild-type control (n = 6)	Wild-type cirrhosis (n = 6)	Knock-in control (n = 6)	Knock-in cirrhosis (n = 6)
	Median (P25–P75)	Median (P25–P75)	Median (P25–P75)	Median (P25–P75)
Albumin (g/dl)	3.60 (3.43–3.78)	3.90 (3.83–3.98)	3.30 (3.13–3.55)	3.85 (3.80–3.90) [†]
Total protein (g/dl)	5.05 (4.65–5.45)	5.90 (5.43–6.23) [*]	4.70 (4.63–4.70)	5.85 (5.65–6.05) [†]
ALP (U/L)	116 (102.25–122.25)	99.50 (96.25–103.50)	93 (91.25–94) [*]	92 (89.50–93.75)
ALT (U/L)	34 (29.75–42.75)	155 (119.75–216.50) [*]	40 (32.75–48.75)	82 (67.50–89) [‡]
AST (U/L)	106 (91–112)	152 (140.25–180) [*]	121 (80.25–128)	137 (125–146)
Cholesterol (mg/dl)	152 (139.50–156.25)	162 (142.50–212.25)	146 (142–159)	162 (146.50–173.75)
Total bile acids (mmol/L)	0.50 (0.00–1.00)	41.70 (38.45–87.10) [*]	0.50 (0.00–1.00)	13.05 (10.90–14.75) ^{†,‡}
Urea (mg/dl)	46.55 (42.48–47.85)	51.15 (49.43–52.35)	51.50 (47.63–55.35)	58.20 (56.20–62.68)

Mann–Whitney U test was performed.

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transferase.

^{*} $p < 0.05$ compared with wild-type control.

[†] $p < 0.05$ compared with knock-in control.

[‡] $p < 0.05$ compared with wild-type cirrhosis.

quantifications. (G) mRNA relative expression of *Acta2*, *Col1a1*, *Mmp2*, *Timp1* and *Tgfb1* in total liver homogenates. Mean \pm standard deviation is represented (n = 5). The signal from the histological experiments was blindly measured in user-specified regions of interest (ROIs) as brown or red area percentage in respect to the total area of the ROI using ImageJ software. Mean \pm standard deviation is represented (n = 6). Scale bar = 100 μ m. Mann–Whitney U test was performed. Values of p are indicated as follows: ^{*} $p < 0.05$; ^{**} $p < 0.01$; ^{***} $p < 0.001$; and ^{****} $p < 0.0001$. α -SMA and *Acta2*, Alpha smooth muscle actin; *Col1a1*, Collagen 1; *Ki*, Clec4g-KI; *Mmp2*, Matrix metalloproteinase-2; *Tgfb1*, Transforming growth factor beta 1; *Timp1*, tissue inhibitor of metalloproteinases 1; *Vim*, vimentin; Wt, wild-type.

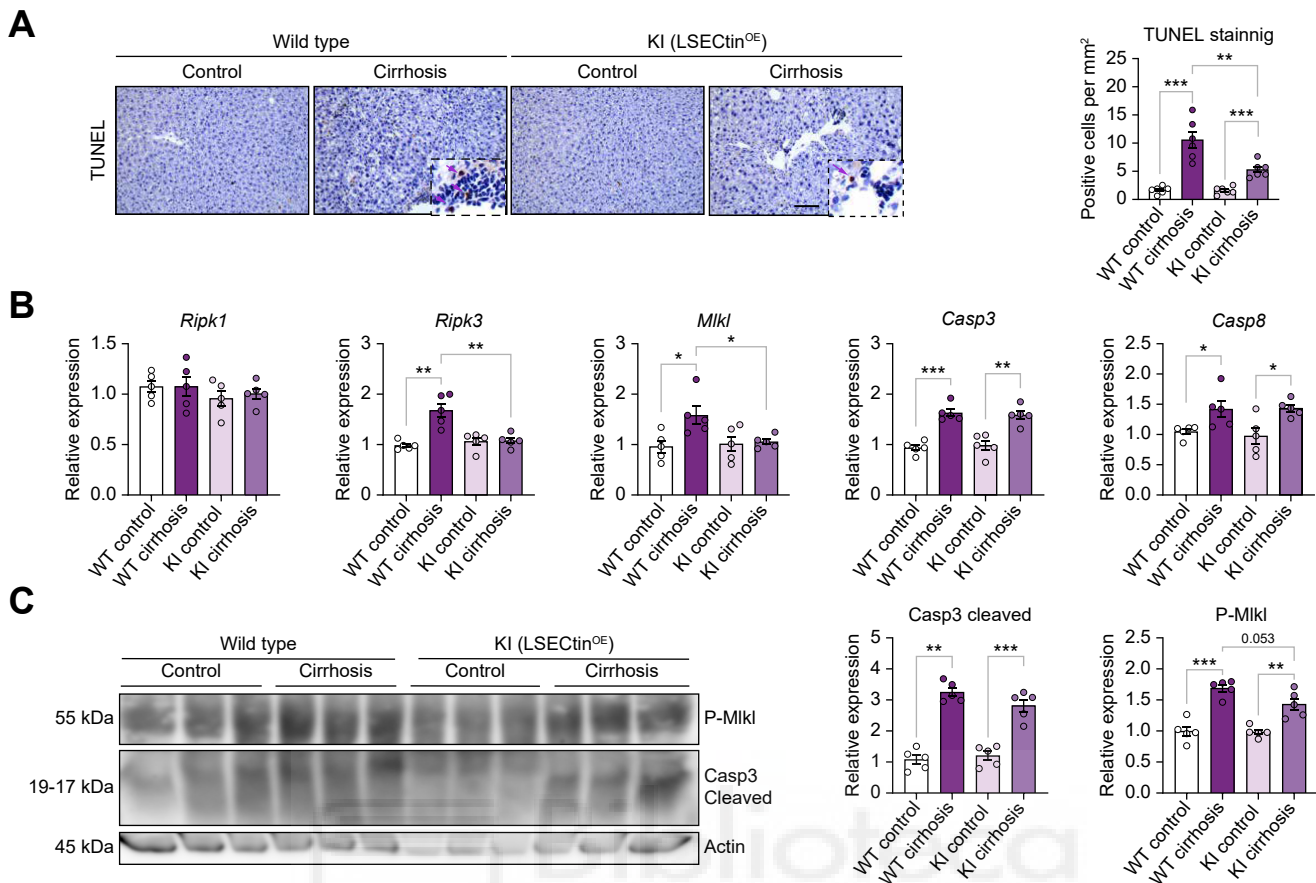


Fig. 2. LSEctin overexpression in Clec4g-KI mice attenuates cell death by necroptosis in the liver. (A) Representative TUNEL staining in the liver and their respective quantifications. The signal was blindly measured in user-specified ROIs as brown positive cells per area using ImageJ software. Mean \pm standard deviation is represented ($n = 6$). Scale bar = 100 μm . (B) mRNA relative expression of *Ripk1*, *Ripk3*, *Mlkl*, *Casp8*, and *Casp3* in total liver homogenates. Mean \pm standard deviation is represented ($n = 5$). (C) Representative relative protein expression of p-Mlkl and Casp3-cleaved by Western blot in liver tissue homogenates. Band densitometry is shown by the image as relative to actin levels. Mean \pm standard deviation is represented ($n = 5$). Mann-Whitney U test was performed. Values of p are indicated as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$. Casp3/8, Caspase 3 and 8; Ki, Clec4g-KI; Mlkl, Mixed lineage kinase domain like pseudokinase; Ripk1/3, Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 and 3, ROI, region of interest; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling; Wt, wild-type.

CD69 expression and a sustained regulatory phenotype defined by the expression of PD-1 are observed in Clec4g-KI vs. Wt cirrhotic animals (Fig. 3F and G). The functional active state of CD8⁺ T cells is represented in Fig. 3H and I, showing a reduced percentage of CD69⁺ CD8⁺ T cells in the Clec4g-KI vs. Wt cirrhotic animals, while the sustained regulatory phenotype observed for CD4⁺ T cells is also present in this CD8⁺ T cell subpopulation.

LSEctin restrains hepatic Th17 expansion in cirrhosis through LAG-3 signaling

To ascertain the mechanism for LSEctin to modulate Th17 expansion *in vitro*, we first isolated spleen-derived CD4⁺ T cells from control mice and stimulated them with a differentiation cocktail with or without LSEctin-Fc and anti-LAG-3, as described in the Animals and methods section. As observed in Fig. 4A, the proinflammatory differentiation cocktail induced a significant proliferation of CD4⁺ IL-17⁺ T cells *in vitro*. This expansion was significantly reduced in the presence of LSEctin-Fc, although it was restored in the presence of anti-

LAG-3. Accordingly, supernatant levels of secreted IL-17 were significantly decreased with LSEctin and significantly increased in the presence of anti-LAG-3 (Fig. 4B). To check that LAG-3 remained expressed in T cells under experimental conditions, we confirmed its expression by flow cytometry (Fig. 4C). *Ex vivo* flow cytometry analysis on murine cirrhotic liver T lymphocytes confirmed the increased LAG-3 expression in CD8⁺ and CD4⁺ cells (Fig. 4D). This increment is also specifically observed in the IL-17⁺ subpopulation among CD4⁺ T cells (Fig. 4E). While LAG3 expression on CD4⁺IL17⁺ T cells is very reduced in control mice, there is a significant increase in cirrhotic animals (Fig. 4E). However, CD4⁺IL10⁺ T cells show a relatively high expression of LAG-3, which further increases in cirrhosis (Fig. 4F). Fig. S4 shows that *in vitro* polarized Tregs are further differentiated in the presence of LSEctin-Fc, and they were restrained in the presence of anti-LAG-3. Fig. S5 shows an increase in the percentage of LAG-3⁺CD69⁺ and LAG-3⁺PD-1⁺ in CD4⁺ T cells.

We validated LAG-3 as a functional T cell ligand interacting with LSEctin, we evaluated relevant LAG-3 downstream signaling pathways activated in T cells. Early signaling

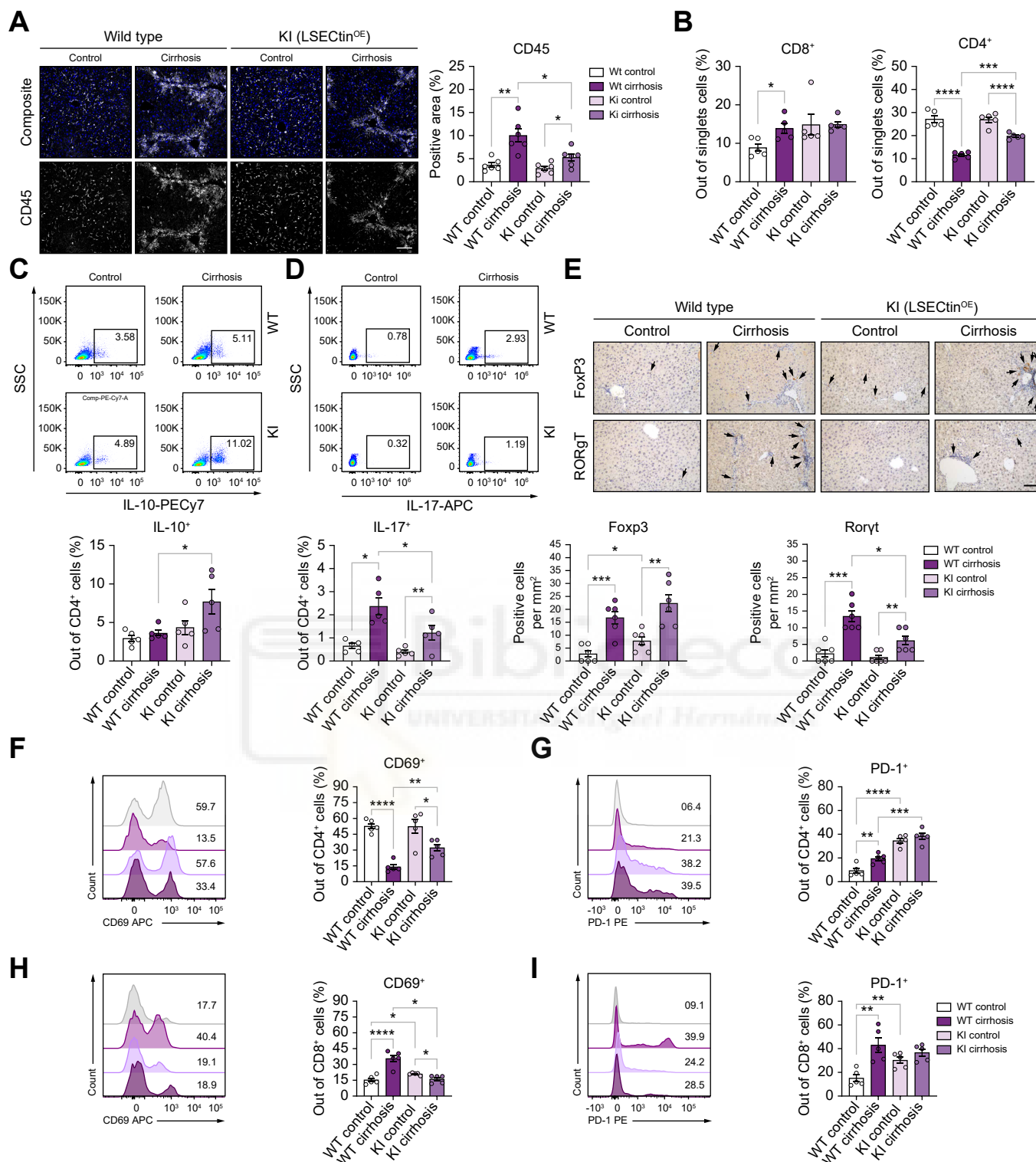


Fig. 3. LSECtin overexpression in Clec4g-KI mice attenuates T cell response in experimental cirrhosis. (A) Representative CD45 fluorescent staining in the liver and their respective quantifications. Mean ± standard deviation is represented (n = 6). (B) Flow cytometry analysis of T CD8⁺ and CD4⁺ cells from liver tissue. Mean ± standard deviation is represented (n = 5). (C, D) Representative dot plot images from flow cytometry analysis of T CD4⁺ cells expressing either IL-10⁺ or IL-17⁺, respectively. Mean ± standard deviation is represented (n = 5). (E) Representative RorγT and Foxp3 staining in the liver and their respective quantifications. Mean ± standard deviation is represented (n = 6). (F, G) Representative histogram images from flow cytometry analysis of T CD4⁺ expressing CD69⁺ or PD-1⁺, respectively. Mean ± standard deviation is represented (n = 5). (H, I) Representative histogram images from flow cytometry analysis of T CD8⁺ expressing CD69⁺ or PD-1⁺, respectively. Mean ± standard deviation is represented (n = 5). Signal in histological staining was blindly measured in user-specified ROIs as positive area percentage or positive cells in respect to the total area of the ROI using ImageJ software. Scale bar = 100 μm. For flow cytometry, data are expressed as percentage of positive cells of the previous gate. Mann-Whitney U test was performed. Values of p are indicated as follows: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; and ****p < 0.0001. CD, Cluster of differentiation; Foxp3, Forkhead box P3; KI, Clec4g-KI; Pd1, Programmed Death-1; Rorγt, RAR-related orphan receptor gamma; Wt, wild-type.

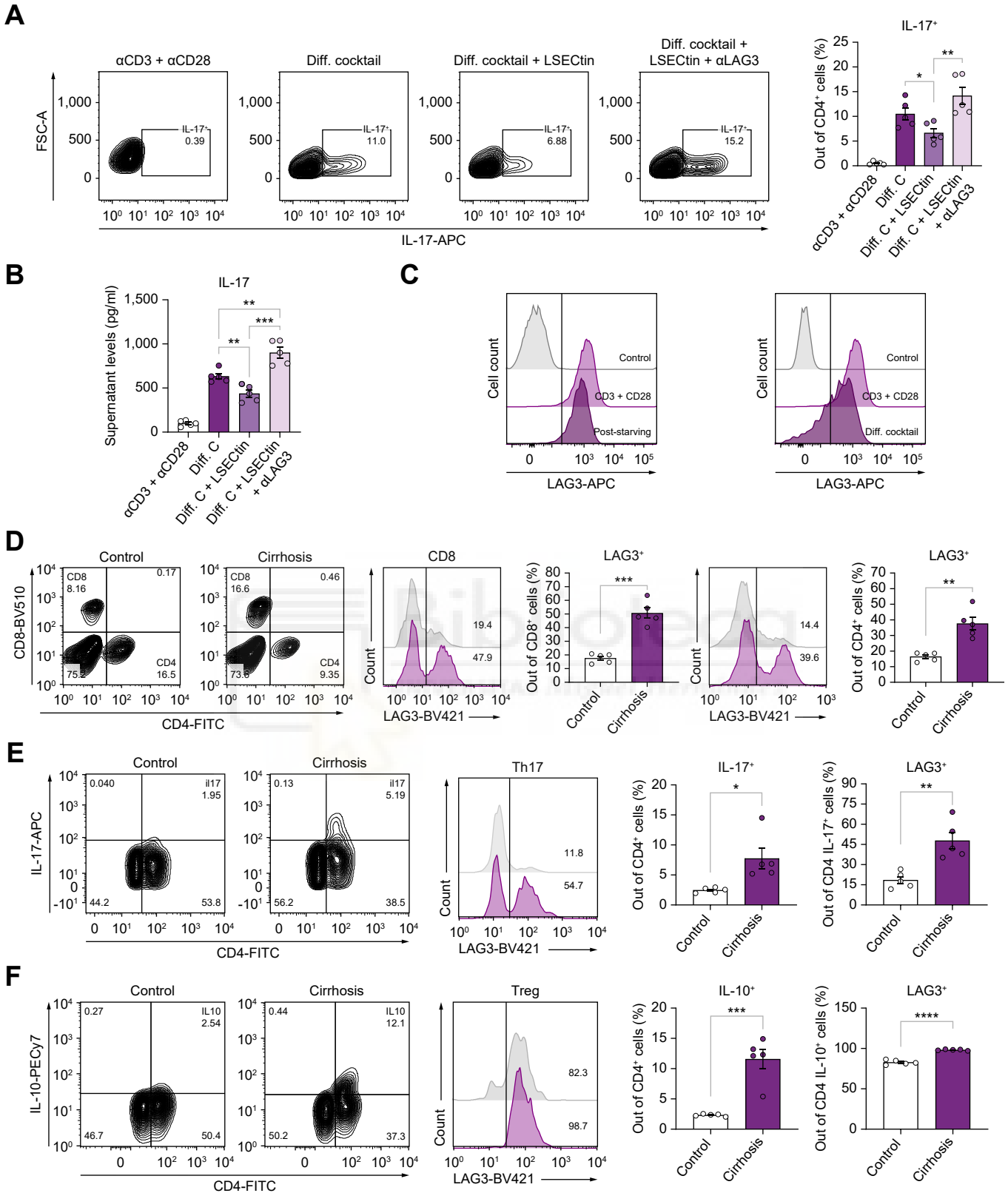


Fig. 4. LSEctin restrains hepatic Th17 expansion in cirrhosis through LAG-3. (A) Representative dot plot images from flow cytometry analysis of T CD4⁺ cells expressing IL-17 after different conditions in the differentiation protocol. Data are expressed as percentage of positive cells of the previous gate. Mean ± standard deviation is represented (n = 5). (B) IL-17 levels in lymphocyte culture supernatants. Mean ± standard deviation is represented (n = 5). (C) Representative histogram from flow cytometry analysis of T CD4⁺ expressing LAG-3⁺ indicating that cells maintain LAG3 expression throughout the experiment. (D) Percentage of LAG-3 expression out of hepatic CD8⁺ and CD4⁺ T cells from control (n = 5) and cirrhotic animals (n = 5). Mean ± standard deviation is represented. (E) Percentage of IL-17⁺ out of hepatic CD4⁺ T cells and percentage of LAG-3⁺ out of hepatic CD4⁺ IL-17⁺ T cells from control (n = 5) and cirrhotic animals (n = 5). Mean ± standard deviation

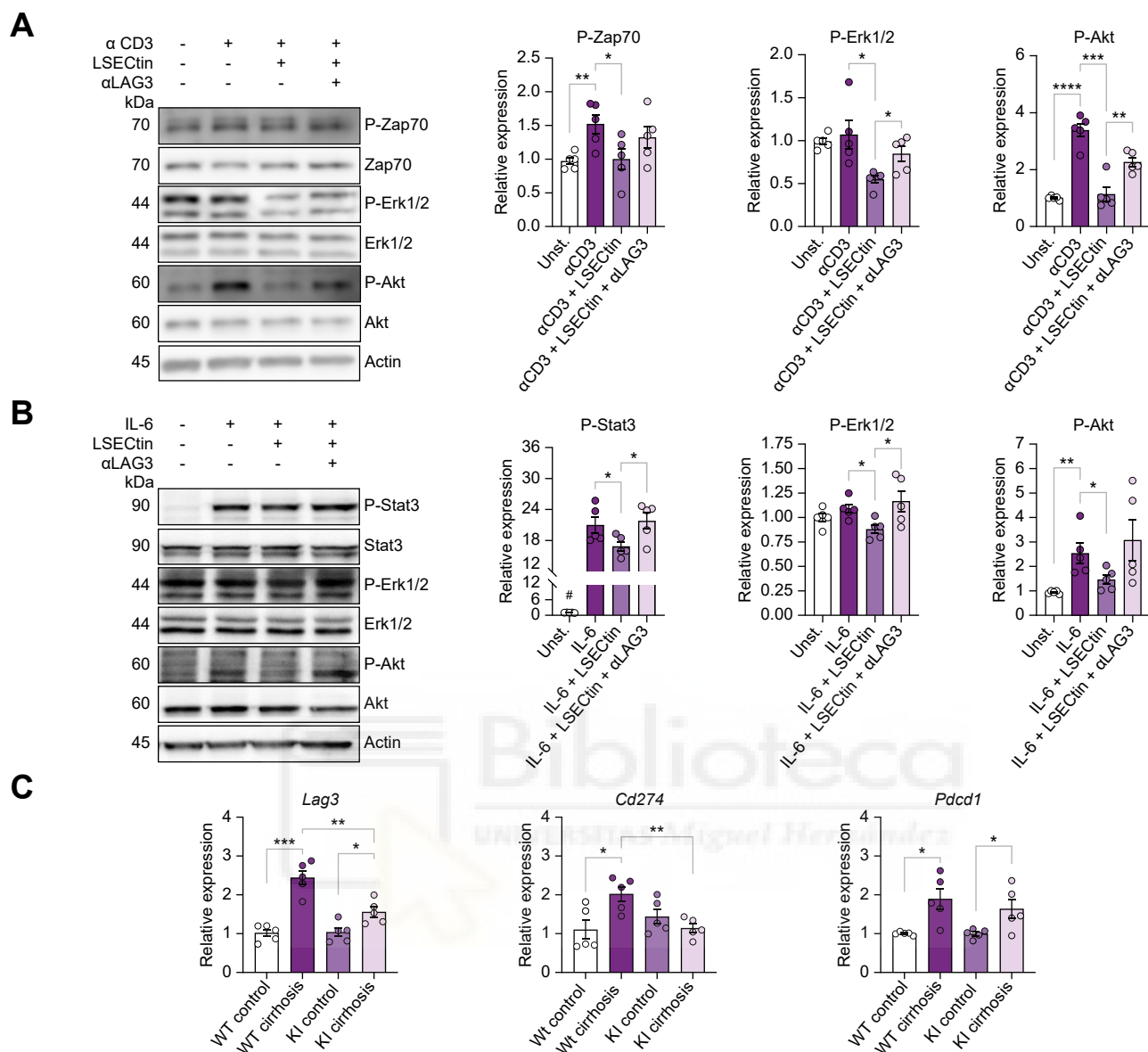


Fig. 5. Lag-3 downstream signaling pathways activated in T cells. (A, B) Representative relative protein expression of different molecules involved in TCR and IL-6 signaling respectively by Western blot in lymphocyte homogenates. Band densitometry of the phosphorylated protein is shown by the image as relative to its total protein level. Mean \pm standard deviation is represented (n = 5). (C) mRNA relative expression of *Lag3*, *Cd274*, and *Pdc1* in total liver homogenates. Mean \pm standard deviation is represented (n = 5). Mann-Whitney U test was performed. Values of *p* are indicated as follows: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; and *****p* < 0.0001. Akt, Protein kinase B; CD, Cluster of differentiation; Cd274, Programmed Death Ligand-1; Erk1/2, Extracellular signal-regulated kinase; Ki, Clec4g-Ki; Lag3, Lymphocyte-activation gene 3; Pdc1, Programmed Death-1; Stat3, Signal transducer and activator of transcription 3; TCR, T cell receptor; Wt, wild-type; Zap70, Zeta-chain-associated protein kinase 70.

substrates showed an activation under CD3 crosslinking, as shown by Zap70, Erk1/2, and Akt phosphorylation. These signals were significantly reduced in the presence of LSEctin-Fc. This inhibition was significantly reversed in the three analyzed pathways by blocking the LAG-3 receptor in the T cell population (Fig. 5A). LSEctin function in restricting Th17 differentiation through LAG-3 was confirmed by the significant downregulation

of Stat3, Erk1/2, and Akt phosphorylation in IL-6-stimulated T cells when they are exposed to LSEctin-Fc. The phosphorylation of all three substrates was significantly increased when blocking LAG-3 interaction with anti-LAG3 (Fig. 5B). The effect of LSEctin in T-cell deactivation was demonstrated in LSEctin-KI cirrhotic mice by the significantly downregulated gene expression levels of *Lag3* and *Cd274* (Fig. 5C).

is represented. (F) Percentage of IL-10+ out of hepatic CD4+ T cells and percentage of LAG3+ out of hepatic CD4+ IL-10+ T cells from control (n = 5) and cirrhotic animals (n = 5). Mean \pm standard deviation is represented. Mann-Whitney U test was performed. Values of *p* are indicated as follows: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; and *****p* < 0.001. CD, Cluster of differentiation; Lag3, Lymphocyte-activation gene 3.

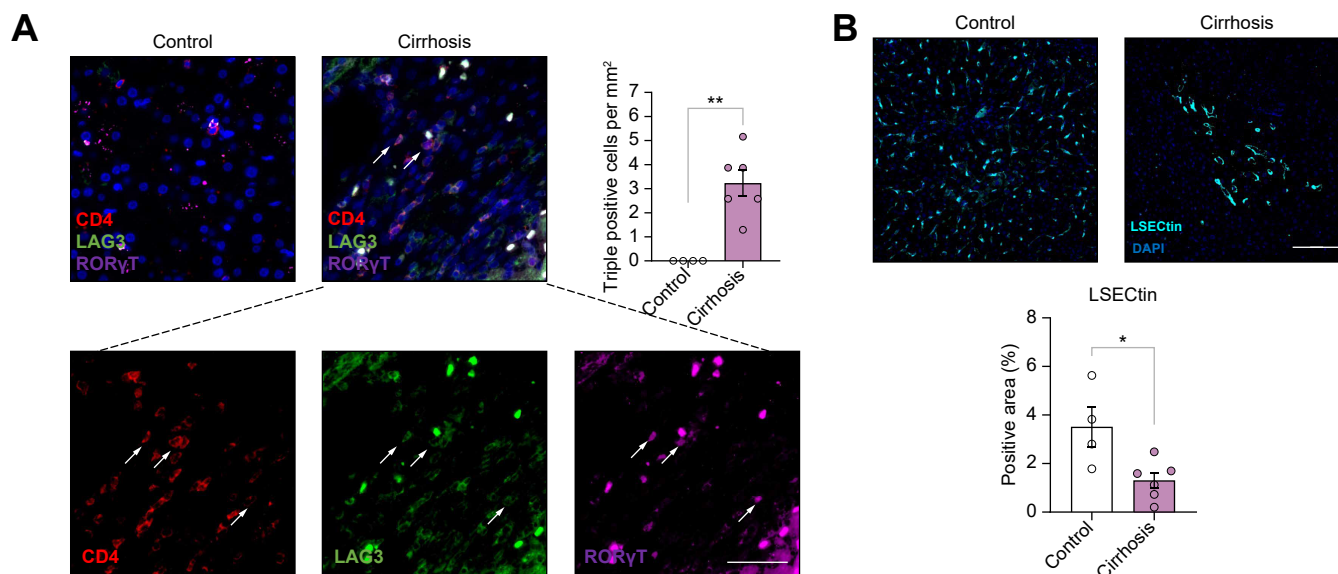


Fig. 6. LAG-3 is overexpressed in hepatic Th17 cells of patients with cirrhosis. (A) Representative fluorescent staining of CD4, LAG-3, and ROR γ T in the liver of a healthy control and a patient with cirrhosis indicated by arrowheads and the number of triple-positive cells per mm² in controls (n = 4) and patients with cirrhosis patients (n = 6). (B) Percentage of area stained by LSEctin in healthy controls (n = 4) and patients with cirrhosis (n = 6). Signal was blindly measured in user-specified ROIs as positive area percentage or positive cells using ImageJ software. Mean \pm standard deviation is represented. Scale bar = 100 μ m. Mann-Whitney *U* test was performed. Values of *p* are indicated as follows: **p* < 0.05; ***p* < 0.01. CD, Cluster of differentiation; Lag3, Lymphocyte-activation gene 3; ROI, region of interest; Ror γ t, RAR-related orphan receptor gamma.

The expression of LAG-3 and ROR γ T in CD4⁺ T cells was evaluated in human cirrhotic livers to support the translational value of results obtained in the experimental model. Clinical characteristics of patients and donors are provided as supplemental material (Table S6). Fig. 6A shows that CD4, LAG-3, and ROR γ T become expressed and colocalize in the liver of patients with cirrhosis. As expected, a downregulation in the expression of LSEctin is also observed in livers with cirrhosis (Fig. 6B).

Discussion

In the present study, we demonstrate that LSEctin modulation of the proinflammatory response is mechanistically mediated through the interaction with its T cell ligand LAG-3. In cirrhosis, LSEctin loss of expression compromises T-cell deactivation favoring a differentiated Th17 response. The overexpression of LSEctin in a transgenic experimental model of cirrhosis shifts the hepatic T cell compartment towards a regulatory profile, reduces hepatic necroptotic damage, and is associated with improved liver function.

Liver inflammation during advanced chronic liver disease is characterized by the progressive expansion of Th17 cells, as observed in patients with cirrhosis. The differentiation of this T cell profile increases as LSEC-derived LSEctin is reduced during cirrhosis progression to decompensated stages.⁸ In our model of LSEctin overexpression compared with Wt in cirrhosis, a decreased leukocyte hepatic infiltration is observed, with an increased CD4/CD8 ratio. However, this increased Th expansion is polarized to a tolerogenic status in these transgenic mice, validating previous associative observations. As LSEctin has specific ligands on T cells, we have aimed at deciphering the potential mechanism for LSEctin regulation of T cell response in cirrhosis. LAG-3 has been defined as the main ligand and checkpoint in the inhibition of T

cells¹⁶ and, in cancer, its interaction with LSEctin inhibits CD8 + activation.¹⁷ Our results confirm that LSEctin reduces the IL-17⁺ population in *in vitro* differentiated Th17, and that LAG-3 blockade reverses this modulation. The fact that LSEctin-Fc significantly reduces early signaling substrates activated under CD3 crosslinking and that this inhibition is significantly reversed by blocking the LAG-3 receptor in the T cell population are in line with previous studies reporting on LAG-3 as an inhibitor of TCR early signaling.^{14,16} However, as Th17 differentiation requires additional signaling,¹⁸ we further confirmed significant downregulation of Stat3, Erk1/2, and Akt phosphorylation in IL-6-stimulated T cells exposed to LSEctin-Fc and their significant upregulation after LAG-3 blockade. Importantly, although LSEctin may interact with other ligands such as CD44, this interaction has been related to cell migration and adhesion rather than lymphocyte inhibition.¹⁹ In fact, the role of CD44 in cell activation has been discarded in the past.^{20,21} Regarding control of Th17-cell differentiation, CD69 has been shown to participate in Treg/Th17 balancing, negatively regulating the transcription of ROR γ T and inhibiting differentiation of cells into Th17 lineage.²² We have evaluated CD69 co-expression with LAG-3 in CD4⁺ T cells and the observed increase of CD69+LAG-3+ cells in our cirrhotic model could indicate a LAG-3-dependent reduction of CD69 functional activity, as LAG-3 and PD-1 have been described as negative co-signaling molecules,²³ therefore allowing the differentiation of Th17 cells.

From a translational perspective, the significant increase in LAG-3 expression in hepatic T cells from patients with cirrhosis, as well as the LAG-3-dependent LSEctin reduction of T cell-derived inflammatory substrates observed in mice, enhances the relevance of LSEctin as a molecular brake for the IL17⁺ T-cell expansion in cirrhosis. The loss of LSEctin expression observed in hepatic tissue of patients with

cirrhosis,⁸ also shown in this study, supports its potential role in promoting a hepatic tolerogenic environment during cirrhosis, as LSECtin-KI cirrhotic mice increase the percentage of IL-10-producing T cells in the liver.

In addition to an excessive proinflammatory immune response, compromised T-cell deactivation in cirrhosis leads to immunogenic cell death programs. A significant reduction in the necroptosis intermediary p-Mkl1 is observed in Clec4g-KI mice during cirrhosis, while the apoptosis-related cleaved Caspase 3 remained unaltered. Necroptosis has been defined as a two-faced regulated cell death process developed under microenvironment-dependent conditions.²⁴ While other well-known mechanisms for cell deletion, such as apoptosis, have been proved to be neutral, necroptosis is a type of programmed cell death that induces a significant inflammatory response.²⁵ It is characterized by the rupture of the cell membrane and the release of molecules that can damage adjacent tissues and activate the immune system. MLKL phosphorylation is part of this pathway activation after heterodimerization of RIPK1 and RIPK3.²⁶ Alternatively, RIPK3 overexpression is sufficient to promote necroptosis.²⁷ In fact, RIPK3 but not RIPK1 expression is significantly increased in patients with alcohol-induced cirrhosis and has been proposed as prognostic factor to predict poor outcomes, being related with their neutrophil hepatic infiltration and their model for end-stage liver disease score.²⁸ In line with this, we observed a significant increase in *Ripk3* in Wt cirrhosis that is significantly downregulated in our Clec4g-KI model, further supported by the reduction of *Mkl1* expression. In fact, *Mkl1*^{-/-} mice are protected from high-fat diet induced liver injury.²⁹ Our results underlie the restrictive role of LSECtin in the hepatic tissue under proinflammatory conditions.

Related to the modulation of the hepatic inflammatory environment and the necroptotic pathway activation, LSECtin retrieval in our Clec4g-KI model shows an improvement in liver function biochemical markers as well as an attenuated fibrotic

damage. Hepatic transaminases and bile acids are down-regulated in Clec4g-KI vs. Wt cirrhotic mice. These changes are most likely an indirect effect caused by the LSECtin-driven reduction of the proinflammatory Th differentiation. In this regard, the enterohepatic circulation is dysregulated during cirrhosis,³⁰ and the increase of serum biomarker ALT has been associated with steatosis in patients with chronic liver disease.³¹ However, although specific studies for evaluating a the interaction between LSECtin restoration and fibrosis-engaging routes are needed to support results presented herein, the reduction of the proinflammatory Th17-cell differentiation, as induced by LSECtin, abrogates its contribution to fibrosis progression³² and the neutralization of IL-17 attenuates cholestatic-induced liver fibrosis.^{33,34} This evidence helps explain liver histologic damage mitigation in the Clec4g-KI CCl₄ model. In addition, it is important to stress that, despite activation of tolerogenic differentiation programs after LAG-3 interaction with LSECtin, no increase in TGF- β is observed in Clec4g-KI cirrhotic mice. In this same line of evidence, murine macrophage cell line Raw 264.7 transfected with LSECtin does not increase TGF- β expression.³⁵ Other aspects related to the host-microbe interaction in the LSECtin overexpressing model surely account for these homeostatic changes and must also be considered.

In conclusion, we have developed a murine model of LSECtin overexpression, valuable for evaluating the modulatory effects of this lectin on hepatic inflammation during cirrhosis and have identified the LAG3 receptor as the molecular mechanism by which LSECtin attenuates Th17 differentiation in a proinflammatory context. The capacity of LSECtin to shift the Th profile and reduce levels of proinflammatory cell death programs suggests the utility of restoring the expression of this molecule, the expression of which is reduced in the liver during cirrhosis, through liver-directed molecular strategies.

Affiliations

¹Hepatic and Intestinal Immunobiology Group, Departamento Medicina Clínica e Instituto IDIBE, Universidad Miguel Hernández, San Juan, Alicante, Spain; ²IIS ISABIAL, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain; ³CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁴Liver Vascular Biology Research Group, IDIBAPS, Barcelona, Spain; ⁵Department of Immunology, Ophthalmology and ENT, School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain; ⁶Unidad de Inmunometabolismo e Inflamación, IIS Gregorio Marañón, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

Abbreviations

α -SMA and Acta2, Alpha smooth muscle actin; Akt, Protein kinase B; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine transferase; AST, aspartate transferase; Casp3/8, Caspase 3 and 8; CD, Cluster of differentiation; PD-L1 and Cd274, Programmed Death Ligand-1; CMV, Cytomegalovirus; Col1a1, Collagen 1; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; Erk1/2, Extracellular signal-regulated kinase; fc, constant fraction; Foxp3, Forkhead box P3; HH, Harris hematoxylin; HRP, horseradish peroxidase; IF, immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; IL, interleukin; Ki, knock-in; LAG-3 and Lag3, Lymphocyte-activation gene 3; LSECs, liver sinusoidal endothelial cells; LSECtin^{OE}, LSECtin overexpression; MASH, metabolic dysfunction-associated steatohepatitis; MASLD, metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; Mkl1, Mixed lineage kinase domain like pseudokinase; Mmp2, Matrix metalloproteinase-2; Pd1, Pdcd1, Programmed Death-1; Ripk1/3, Receptor-interacting serine/threonine-protein Kinase 1 and 3; ROI, region of interest; Ror γ t, RAR-related orphan receptor gamma; Stat3, Signal transducer and activator of transcription 3; TCR, T cell receptor; Tgfb1, Transforming growth factor beta 1; Th, T helper; Timp1, Tissue inhibitor of metalloproteinases 1; TLRs, Toll-like receptor; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling; Vim, Vimentin; Wt, wild-type; Zap70, Zeta-chain-associated protein kinase 70.

Financial support

This study was supported by Generalitat Valenciana, Valencia, Spain, under the grant PROMETEO 2021/0033, by Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, under the grants PMP21/0082, PI23/00945 and AC24/00135, by Agencia Estatal de Investigación, Madrid, Spain, under the grants PID2023-149765OB-I00 and PID2023-151347OB-I00, by AGAUR-Generalitat de Catalunya 2021 SGR 01322, and by HORIZON-HLTH-2022-STAYHLTH-02 under agreement No 101095679.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Please refer to the accompanying ICMJE disclosure forms for further details.

Authors' contributions

Concept and design: RF, EC. Animal procedures: IGH, SML. Experimental work: SML, OJ, EAG, PB, AGC. Validation: FJC, JGS, APK. Writing of article: RF, EC.

Data availability statement

The data are available from the authors upon request.

Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2025.101482>.

References

Author names in bold designate shared co-first authorship

- [1] Hammerich L, Tacke F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2023;20:633–646.
- [2] Albillos A, Martin-Mateos R, Van der Merwe S, et al. Cirrhosis-associated immune dysfunction. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2022;19:112–134.
- [3] Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2014;60:197–209.
- [4] Crispe IN. Liver antigen-presenting cells. *J Hepatol* 2011;54:357–365.
- [5] Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, et al. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 2003;171:4984–4989.
- [6] Rau M, Schilling AK, Meertens J, et al. Progression from nonalcoholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis is marked by a higher frequency of Th17 cells in the liver and an increased Th17/resting regulatory T cell ratio in peripheral blood and in the liver. *J Immunol* 2016;196:97–105.
- [7] Zhang H, Yan X, Yang C, et al. Intrahepatic T helper 17 cells recruited by hepatitis B virus X antigen-activated hepatic stellate cells exacerbate the progression of chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2020;27:1138–1149.
- [8] Martinez-Lopez S, Angel-Gomis E, Gomez-Hurtado I, et al. Cirrhosis-downregulated LSEctin can be retrieved by cytokines, shifts the TLR-induced LSEctins secretome and correlates with the hepatic Th response. *Liver Int* 2024;44:996–1010.
- [9] Dominguez-Soto A, Aragoneses-Fenoll L, Gomez-Aguado F, et al. The pathogen receptor liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin is expressed in human Kupffer cells and regulated by PU.1. *Hepatology* 2009;49:287–296.
- [10] Tang L, Yang J, Liu W, et al. Liver sinusoidal endothelial cell lectin, LSEctin, negatively regulates hepatic T-cell immune response. *Gastroenterology* 2009;137:1498–1508. e1491–5.
- [11] Caparros E, Juanola O, Gomez-Hurtado I, et al. Liver sinusoidal endothelial cells contribute to hepatic antigen-presenting cell function and Th17 expansion in cirrhosis. *Cells* 2020;9:1227.
- [12] Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2016;16:433–448.
- [13] Juanola O, Piñero P, Gomez-Hurtado I, et al. Regulatory T cells restrict permeability to bacterial antigen translocation and preserve short-chain fatty acids in experimental cirrhosis. *Hepatol Commun* 2018;2:1610–1623.
- [14] Guy C, Mitrea DM, Chou PC, et al. LAG3 associates with TCR-CD3 complexes and suppresses signaling by driving co-receptor-Lck dissociation. *Nat Immunol* 2022;23:757–767.
- [15] Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, et al. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2007;47:220–227.
- [16] Aggarwal V, Workman CJ, Vignali DAA. LAG-3 as the third checkpoint inhibitor. *Nat Immunol* 2023;24:1415–1422.
- [17] Xu F, Liu J, Liu D, et al. LSEctin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Res* 2014;74:3418–3428.
- [18] Bhaumik S, Basu R. Cellular and molecular dynamics of Th17 differentiation and its developmental plasticity in the intestinal immune response. *Front Immunol* 2017;8:254.
- [19] **Tang L, Yang J**, Tang X, et al. The DC-SIGN family member LSEctin is a novel ligand of CD44 on activated T cells. *Eur J Immunol* 2010;40:1185–1191.
- [20] **Zhao D, Zhang M**, Wang M, et al. Up-regulation of Cbl-b is associated with LSEctin-mediated inhibition of different CD4+ T-cell subsets. *Immunobiology* 2013;218:602–608.
- [21] Yang J, Wang H, Wang M, et al. Involvement of LSEctin in the hepatic natural killer cell response. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;476:49–55.
- [22] **Li Y, Gu Y**, Yang P, et al. CD69 is a promising immunotherapy and prognosis prediction target in cancer. *Immunotargets Ther* 2024;13:1–14.
- [23] Chocarro L, Blanco E, Zuazo M, et al. Understanding LAG-3 signaling. *Int J Mol Sci* 2021;22:5282.
- [24] **Ye K, Chen Z**, Xu Y. The double-edged functions of necroptosis. *Cell Death Dis* 2023;14:163.
- [25] **Jiao H, Wachsmuth L**, Kumari S, et al. Z-nucleic-acid sensing triggers ZBP1-dependent necroptosis and inflammation. *Nature* 2020;580:391–395.
- [26] Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation* 2018;15:199.
- [27] **Dondelinger Y, Aguilera MA**, Goossens V, et al. RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition. *Cell Death Differ* 2013;20:1381–1392.
- [28] Zhang Z, Xie G, Liang L, et al. RIPK3-mediated necroptosis and neutrophil infiltration are associated with poor prognosis in patients with alcoholic cirrhosis. *J Immunol Res* 2018;2018:1509851.
- [29] Wu X, Arya RK, Huang E, et al. Receptor-interacting protein 1 and 3 kinase activity are required for high-fat diet induced liver injury in mice. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023;14:1267996.
- [30] Sauerbruch T, Hennenberg M, Trebicka J, et al. Bile acids, liver cirrhosis, and extrahepatic vascular dysfunction. *Front Physiol* 2021;12:718783.
- [31] Toita R, Kawano T, Fujita S, et al. Increased hepatic inflammation in a normal-weight mouse after long-term high-fat diet feeding. *J Toxicol Pathol* 2018;31:43–47.
- [32] **Wang L, Chen S**, Xu K. IL-17 expression is correlated with hepatitis B-related liver diseases and fibrosis. *Int J Mol Med* 2011;27:385–392.
- [33] Zhang S, Huang D, Weng J, et al. Neutralization of interleukin-17 attenuates cholestatic liver fibrosis in mice. *Scand J Immunol* 2016;83:102–108.
- [34] **Hara M, Kono H**, Furuya S, et al. Interleukin-17A plays a pivotal role in cholestatic liver fibrosis in mice. *J Surg Res* 2013;183:574–582.
- [35] **Yang Z, Li Q**, Wang X, et al. C-type lectin receptor LSEctin-mediated apoptotic cell clearance by macrophages directs intestinal repair in experimental colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:11054–11059.

Keywords: Cirrhosis; LSEctin; CLEC4g; LAG-3; Mouse; IL-17.

Received 19 January 2025; received in revised form 1 June 2025; accepted 4 June 2025; Available online 10 June 2025



Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

DISCUSIÓN

10. DISCUSIÓN

La inflamación crónica y progresiva que caracteriza la cirrosis se debe, entre otros factores, a la pérdida de mecanismos de tolerancia hepática que favorecen la proliferación de una respuesta proinflamatoria frente a la traslocación de antígenos microbianos procedentes de una microbiota disbiótica favorecida por una barrera intestinal deteriorada [132], [138]. No obstante, el conocimiento sobre estos mecanismos es limitado. En esta tesis doctoral proponemos que LSECtin/CLEC4G, un CLR expresado fundamentalmente en LSECs, es uno de los principales promotores de tolerancia hepática que se pierden durante la cirrosis contribuyendo a la desregulación inmunológica propia de esta patología.

Desde que se descubrió que LSECtin participaba en la inhibición de linfocitos T [80], se ha demostrado que esta lectina parece encontrarse en la base de la progresión de numerosos tipos de tumores como mecanismo de escape inmunitario [97], [99], [101]. No obstante, y a pesar de que esto señalaba la relevancia de la capacidad inmunomoduladora de LSECtin, esta función sólo se vinculó con procesos patológicos agudos en el caso del hígado [80], [95], dejando de lado la cirrosis. Trabajos posteriores de nuestro laboratorio apuntaron a la existencia de esta relación en la enfermedad hepática crónica avanzada al mostrar que había una desregulación de la expresión de distintos receptores innatos del endotelio, entre los cuales LSECtin se encontraba reprimida [154]. Concretamente, estos cambios se traducían en un aumento de la habilidad de las LSECs dañadas para reconocer y presentar antígenos a los linfocitos T, convirtiéndose en promotoras de la diferenciación de los Th17 y de la inflamación [154]. Si bien estos resultados no demostraban la responsabilidad directa de LSECtin en la pérdida de tolerancia, la ausencia de efectos apreciables de otras moléculas inmunomoduladoras como TGF β 1 o PDL1, que en contraste con esta lectina, sí se mantenían a niveles elevados en el hígado cirrótico [132], [152], apuntaba a que la represión de LSECtin en las LSECs jugaba un papel importante en la homeostasis inmunológica hepática durante la cirrosis.

Para validar esta implicación, en el primer artículo estudiamos la expresión de LSECtin en cirrosis con más detalle. Confirmamos que existía una fuerte represión de esta lectina en el endotelio hepático y ahondamos en la señalización que genera y modula

en LSECs, así como en los mecanismos que regulan su expresión, demostrando, en última instancia, que se puede recuperar su expresión en la enfermedad [158].

La posición de las LSECs en la circulación hepática y su alta capacidad fagocítica, convierten a estas células en vigilantes idóneas de las amenazas que lleguen al hígado a través de la sangre [29]. Sin embargo, el amplio abanico de receptores que expresan no sólo está implicado en el aclaramiento de moléculas potencialmente peligrosas, sino que también participan en la modulación del microambiente del hígado [33], [35], [36]. De hecho, los cambios en el perfil de expresión de estos receptores innatos a medida que progresa el daño hepático modulan la respuesta inmunitaria, pudiendo incluso exacerbar la inflamación [154], [159].

En el caso de LSECTin, en su papel como receptor y modulador de señales intracelulares en LSECs, pudimos observar que en cirrosis existía una represión de su expresión en modelos animales y en pacientes. Para imitar este fenotipo de “LSEC dañada” generamos una línea celular de endotelio hepático (imLSECs) deficiente para LSECTin (LSECTin-CRISPR) y estudiamos su respuesta frente a distintos estímulos. Al igual que ocurre con el caso de otros receptores innatos, y en particular de muchos CLRs [84], la estimulación de LSECTin con sus ligandos LAG3 y CD44, promovía la fosforilación de las vías de las MAPKs (ERK y p38), AKT y NFkB en imLSECs Wt, mientras que en las células LSECTin-CRISPR este efecto desaparecía. Notablemente, la activación de las vías MAPKs y AKT se han implicado en la promoción de la supervivencia en células endoteliales [160], [161], [162], así como en la regulación de su fenotipo en cirrosis [163]. La activación de estas vías por parte de los ligandos de LSECTin, indicaría que en homeostasis esta lectina podría promover la supervivencia celular, como ocurre con otros PRR [164], [165], mientras que, en cirrosis, donde se reprime, podría contribuir a la muerte del endotelio propia del daño hepático [166], [167].

Otra de las consecuencias de la estimulación de las vías mencionadas, en especial NFkB [168], es la expresión y secreción de diferentes citocinas [169]. Tras estudiar el secretoma de las LSECs en respuesta a CD44 y LAG3 pudimos encontrar de nuevo efectos antagónicos entre las imLSECs Wt y las LSECTin-CRISPR. Las células deficientes para LSECTin secretaban citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF α o IL-

1 β mientras que reprimían la liberación de IL-10 en respuesta a los distintos estímulos. Estos cambios indicaban que la señalización de LSECtin, podría intervenir en la regulación y mantenimiento de la homeostasis del sinusoide. Sabemos que las citocinas derivadas de la activación de otros CLR s modulan la respuesta del sistema inmunitario [67]. En ese sentido, la liberación de IL-6 e IL-1 β tras la estimulación del CLR MINCLE por distintos patógenos, promueve la diferenciación de las Th17 [67], [170]. De una manera similar, la ausencia de LSECtin en las LSECs cirróticas, podría favorecer la diferenciación de esta población de linfocitos al liberar las mismas citocinas y reprimir la IL-10.

Como este tipo de actividad innata suele implicar la señalización sinérgica de múltiples receptores en las APCs, también investigamos la colaboración entre LSECtin y otros PRRs como los TLRs. Además, el hígado y su endotelio se enfrentan constantemente a una importante carga antigénica procedente circulación portal. En el caso de la cirrosis, aún más, ya que la presencia de una microbiota disbiótica junto con una desregulación del eje hígado-intestino favorecen que la presión antigénica hepática sea mayor, así como las respuestas inmunitarias a las que dan lugar [131], [132]. En este contexto patológico, los TLRs contribuyen de manera especial a las respuestas inmunitarias [171], llegando a promover el avance de la enfermedad hepática en determinadas circunstancias [159]. Es por ello que su interacción con la señalización de LSECtin, que promueve respuestas tolerogénicas, es particularmente interesante. Lo primero que pudimos observar en los experimentos de coestimulación es que sí existía una modulación de LSECtin a la señalización mediada por los TLRs como ya se apuntaba en otros contextos fuera del hígado [94]. La activación de las vías del NF κ B, MAPKs o AKT eran distintas entre las células modelo cuando se exponían simultáneamente a los ligandos de los TLRs y de LSECtin. Para CD44, se veía un efecto sinérgico en la señalización conjunta con el LPS y la vía del NF κ B. En líneas generales, y para el resto de las combinaciones con CD44, la integración se tradujo en una bajada de la señalización que, notablemente, desaparecía, o incluso llegaba a aumentar, en el caso de las imLSECs LSECtin-CRISPR. En el caso de LAG3, se produjo cierta sinergia en la activación de casi todas las vías para las combinaciones con los ligandos de los TLRs. De nuevo, estos efectos desaparecían en las células deficientes para LSECtin indicando que eran mediados por la lectina. Estas diferencias en señalización

temprana entre los ligandos de LSECTin podrían deberse a que existen diferentes dominios de interacción lectina-ligando que inducen una respuesta distinta, como ocurría con el caso de Dectin2 [77], [78]. De ser ese el caso, también podría explicar la aparente diferencia que se encuentra en la respuesta del linfocito T según el ligando implicado en esta interacción, donde LAG3, pero no CD44 está involucrado en la inhibición [99], [104]. En cuanto al secretoma de las células expuestas a estas combinaciones, encontramos perfiles de secreción relativamente similares entre la coestimulación con CD44 y LAG3 a pesar de las diferencias observadas en la señalización temprana. El secretoma proinflamatorio producto de la estimulación con los TLRs se contrarrestaba, en líneas generales, por ambos ligandos de LSECTin. Esto sugiere que la señalización de ambos y su interacción con la de los TLRs, sigue un curso temporal diferente que converge en estimulaciones prolongadas. En el caso de la IL-6, por ejemplo, tanto el LPS como Pam3Cys (ligando de TLR2), promovían un aumento de su secreción que se contrarrestaba por la estimulación de LSECTin con ambos ligandos. Las LSECs deficientes para LSECTin, perdían esta habilidad, lo que aumentaba de nuevo la secreción de IL-6 que podría promover aún más la expansión de las Th17 en cirrosis. Esta señalización opuesta entre los TLRs y un CLR ya se ha descrito en el caso de Dectin2 y el TLR4 (**Fig. 5**) lo que ha señalado a Dectin2 como posible diana de modulación de la respuesta inmunitaria innata [67], [78], [172]. De la misma manera, estimular LSECTin en el contexto de la cirrosis podría contribuir a la mejora de la homeostasis inmunológica del hígado.

En cuanto a la expresión de LSECTin en cirrosis, se observó una relación estrecha entre la biología de la lectina y la evolución de la enfermedad hepática. En los pacientes cirróticos, al igual que en los modelos animales, la expresión de LSECTin era menor conforme avanzaba el daño. De esta manera, encontrábamos en los pacientes descompensados una expresión menor de la que se observaba en los pacientes compensados o sanos, sugiriendo que los procesos inflamatorios del hígado también podrían estar relacionados con los cambios en LSECTin. Esta expresión provenía exclusivamente del endotelio ya que no se hallaron indicios histológicos de su expresión en macrófagos hepáticos de pacientes ni en los animales modelo. En sangre periférica, por otro lado, los niveles de la forma soluble de LSECTin seguían el patrón opuesto al del tejido hepático. Eran mayores conforme avanzaba la enfermedad. Al

igual que ocurre en el caso de DC-SIGN [88], la liberación de su forma soluble se produce en respuesta a estímulos proinflamatorio, contribuyendo a las actividades opsonizadoras de otros leucocitos [173]. LSECtin, como PRR reconocido, también podría colaborar de esta manera con otros fagocitos profesionales en el aclaramiento sistémico de partículas virales [92] o cuerpos apoptóticos como en el caso del colon [90]. Sin embargo, su capacidad inmunomoduladora ha llevado a que se explore más su potencial como biomarcador, encontrándose relación entre su expresión y la progresión de distintos tipos de tumor donde los niveles de la forma soluble podrían relacionarse con el pronóstico [101]. De ser este el caso, los niveles de LSECtin soluble podrían servir como biomarcador a la hora de valorar la progresión de la cirrosis.

Comprobamos también que existía una relación entre la represión de LSECtin y la expansión de los linfocitos T en el hígado de pacientes cirróticos. Concretamente, tanto a nivel de tejido como a nivel transcripcional, existía una correlación inversa entre los niveles de LSECtin y la proliferación proinflamatoria de los Th17 (RORC/ROR γ T+), implicados en la progresión de las enfermedades hepáticas [139], [174]. Los resultados del modelo *in vitro* apuntaban a que los cambios producidos en el secretoma de las LSECs, con un aumento de la IL-6 y una bajada de la IL-10, podrían contribuir a la expansión de las Th17. Además, la evidencia acumulada sobre el papel de las LSECs en la modulación de las células T [46], [59], y en particular de LSECtin, en el hígado inflamado [80], señalaba a esta lectina como uno de los principales responsables de prevención de la progresión del daño hepático a través del mantenimiento de la homeostasis inmunitaria local.

Dada las consecuencias de la represión de LSECtin nos propusimos estudiar también que factores podrían modular su expresión en el caso del hígado. En ese sentido, las citocinas constituyen un sistema de señalización cruzado clave en este órgano que gana más peso durante la cirrosis [14], [132]. Además, en el caso de otros componentes de la familia de los CLRs, como DC-SIGN, existe una regulación clara por parte de estas moléculas siendo inducido por IL-4 y reprimido por IFN- γ [175]. De hecho, se ha sugerido que LSECtin estaría regulada por IL-4 en células mieloides [83], y por IL-8, IL-6 o IL10 en células tumorales durante procesos cancerígenos [99], [102]. En el contexto de las LSECs, nuestros resultados mostraron que las citocinas de

carácter proinflamatorio eran capaces de reprimir su expresión. Esto explicaría la represión de LSECtin presente en el tejido hepático de los pacientes cirróticos y los modelos animales, donde la fuente original de daño (consumo de alcohol o el CCl₄ respectivamente) promueve la liberación de moléculas inductoras de la inflamación que podrían ser responsables de la represión de esta lectina [176]. También comprobamos que las citocinas de carácter antiinflamatorio, como la IL-13, generaban el efecto contrario induciendo la expresión de LSECtin. Como estos resultados se presentaban como un posible sistema de recuperación de esta lectina en cirrosis, exploramos esta posibilidad en cultivos primarios de endotelio proveniente del modelo animal de la enfermedad. IL-13 sola o en combinación con otras citocinas antiinflamatorias, rescataba la expresión de LSECtin en el endotelio hepático dañado, demostrando que su expresión se podía reprogramar mediante una intervención exógena. Este resultado, junto con el papel que parece ejercer la ausencia de esta lectina en la expansión de las Th17 en hígado de los pacientes cirróticos, demostraban que la recuperación de LSECtin podría ser un mecanismo para restaurar las funciones homeostáticas del endotelio durante la inflamación crónica hepática.

Para profundizar en este concepto, en el segundo artículo usamos un modelo animal de sobreexpresión de LSECtin. El modelo nos permitió explorar los efectos beneficiosos de mantener unos niveles elevados de LSECtin durante la progresión de la enfermedad y su implicación en la modulación del sistema inmunitario hepático.

Tras corroborar que la sobreexpresión de LSECtin persistía durante la cirrosis hepática en el modelo Ki, exploramos distintos componentes del sistema inmunitario en el hígado de estos animales. En primer lugar, encontramos una reducción de la infiltración leucocitaria (CD45+) en comparación con los animales Wt. Mediante citometría de flujo comprobamos que esta infiltración se caracterizaba por menores niveles de monocitos (Ly6C+) y un ratio más elevado de CD4/CD8, que está inversamente relacionado con el daño hepático [177]. A pesar de este aumento relativo en el compartimento de las CD4, las poblaciones que lo formaban eran mayoritariamente tolerogénicas (IL-10+) en el hígado de los animales Ki cirróticos. Además, estos CD4 expresaban niveles elevados de PD1, lo que es propio de linfocitos T exhaustos y Tregs [178]. En el caso de los animales Wt, donde sí encontramos una

represión de LSECtin en cirrosis, la población más abundante de CD4 era la Th17, confirmando nuestros resultados previos en humanos y otros modelos animales [154], [158]. Estas diferencias se veían acompañadas con cambios en el perfil de citocinas quimioatrayentes expresadas en el hígado. En los Wt cirróticos, aumentaban los niveles de moléculas que atraen a las Th17 como Ccl20, Cxcl9 o Cxcl11 en comparación con animales Ki [179].

La reducción de los cambios proinflamatorios que observamos en los animales que sobreexpresan LSECtin también tenía consecuencias claras sobre la supervivencia del tejido hepático. Un exceso de presión inflamatoria puede generar daños permanentes a un tejido promoviendo la muerte celular de las células que lo componen [180]. Cuando se encuentra elevado en exceso, el TNF- α , por ejemplo, está implicado en la inducción de muerte celular por diversos mecanismos [181]. En el caso del hígado cirrótico, donde estas moléculas abundan, observamos una alteración de las vías de muerte celular por apoptosis y necroptosis [182]. De hecho, los ratones Wt cirróticos tenían elevados la Caspasa 3 escindida y p-Mkl1, indicadores de apoptosis y de necroptosis respectivamente. En los ratones Ki, en contraste se observaban niveles reducidos de p-Mkl1, al igual que una represión transcripcional de otros componentes de la vía de necroptosis. En ese sentido, la reducción de las Th17 en los hígados que sobreexpresaban LSECtin podría explicar estas diferencias. Mientras el daño provocado por el CCl₄ es inevitable, de ahí la inducción de apoptosis por igual, la reducción de la IL-17 en el microambiente hepático de estos animales podría explicar la menor actividad de la vía de la necroptosis [183], [184]. En efecto, la activación de otros componentes de esta vía, como RIPK3, están vinculados con la progresión de la enfermedad hepática [185], [186], enfatizando el efecto protector de LSECtin en este escenario.

Respecto a la función hepática, la bioquímica en los ratones Ki cirróticos se encontraba menos alterada que en los animales Wt, mostrando menores niveles de transaminasas circulantes y ácidos biliares. De forma similar, la sobreexpresión de LSECtin en los animales Ki ofrecía una protección parcial frente al daño fibrótico. Encontramos menores niveles de deposición de colágeno, así como una menor activación de los miofibroblastos hepáticos a través de la expresión de los marcadores α Sma y Vim,

respectivamente [187]. Si bien LSECtin no parecía tener una relación directa con la acumulación de matriz extracelular o el funcionamiento de los hepatocitos, su capacidad para modular el ambiente proinflamatorio podría prevenir indirectamente la activación de las HSCs mediada por la IL-17 [139], [140] reduciendo así la fibrogénesis. Adicionalmente, el ambiente inflamatorio de la cirrosis puede promover la capilarización de las LSECs [144]. En este estado patológico el endotelio promueve la activación de las HSCs al aumentar la liberación de factores como PDGF o TGF- β 1 y reducir la de otros como el óxido nítrico [188]. Por tanto, la protección del fenotipo endotelial que ejerce LSECtin al modular la inflamación, también podría contribuir a la reducción de la fibrosis.

Finalmente, y después de observar los efectos protectores de la sobreexpresión de LSECtin en cirrosis, quisimos evaluar los posibles mecanismos por los que esta lectina regulaba la repuesta de los linfocitos Th17. Entre los ligandos específicos de LSECtin que con más probabilidad podría cumplir ese rol, destacaba LAG3 por ser un inhibidor conocido de la respuesta T-dependiente [114]. De hecho, su interacción con LSECtin en el contexto del cáncer promueve la inhibición de linfocitos CD8 favoreciendo la progresión tumoral [99]. En éstos, LSECtin provocaba la inhibición de la proliferación y la liberación de citocinas como se había descrito para las CD4 también [80]. Si bien la expresión de LAG3 en linfocitos activados es conocida, la presencia de este marcador en Th17 y su implicación en la función de estas células no se ha explorado lo suficiente, especialmente en el contexto de la cirrosis. Comprobamos que este receptor aumentaba en los linfocitos CD4 y CD8 de hígado en el modelo animal de cirrosis, como también ocurre en sangre periférica de pacientes cirróticos [189]. De hecho, se han encontrado niveles altos de LAG3 en CD8 hepáticos en pacientes cirróticos [190], donde la expresión de este receptor está inversamente relacionada con el pronóstico de la enfermedad [191]. En el caso de las CD4 hepáticas, LAG3 se ha definido principalmente como un marcador de agotamiento [192], sin embargo, nuestros resultados apuntaban a una implicación funcional mayor. Dentro de las CD4, las Th17 experimentaban un gran aumento en la expresión de LAG3. Significativamente, un aumento claro de células ROR γ T/LAG3+ en el hígado de pacientes cirróticos confirmaban este resultado.

Para profundizar en el rol de LAG3 en las Th17 realizamos ensayos de diferenciación *in vitro*. En línea con los resultados de los hígados Ki cirróticos, la exposición de los linfocitos a LSEctin reducía dicha diferenciación a Th17 y la liberación de IL-17 por parte de estas células, mientras que el bloqueo de LAG-3 revertía este proceso, confirmando la implicación directa de esta lectina en regulación de las Th17. Como LSEctin ya había mostrado anteriormente capacidad para inhibir la señalización del TCR [80], de una manera similar a como lo lograba LAG3 [119], nos propusimos evaluar su interdependencia en el contexto hepático. Así, el bloqueo de la señalización del TCR que ejercía LSEctin en linfocitos estimulados *in vitro* era revertido por un anticuerpo anti-LAG3. La señalización LSEctin-LAG3 en linfocitos T podría estar mediada por la ligasa de ubiquitina CBL-b, implicada en la inducción de tolerancia [193]. De hecho, la estimulación de linfocitos CD4 con LSEctin inhibía la producción de citocinas de una manera CBL-b dependiente [96]. De una manera similar, esta ligasa parece estar “aguas abajo” de LAG3 [194] donde es necesaria para la correcta señalización del receptor y el bloqueo de la función linfocitaria [195], lo que reforzaría la idea de una colaboración LSEctin-LAG3 en este proceso.

Dado que la diferenciación en Th17 no sólo requiere la estimulación del TCR, sino que también necesita la activación de la vía de las STATs dependientes de citocinas [196], exploramos el papel de la interacción LSEctin-LAG3 en la señalización de la IL-6. La estimulación con esta citocina promovía en los linfocitos la fosforilación de STAT3, ERK y AKT. LSEctin inhibía parcialmente esta señalización y, al igual que en el caso del TCR, el bloqueo de LAG3 revertía este efecto. Respecto al papel de este receptor en la modulación la actividad de citocinas, LAG3 se ha implicado en los últimos años en la regulación de numerosas vías de señalización, la JAK-STAT incluida [197]. De hecho, parece regular la vía de STAT5, en el contexto de la señalización de IL-2 e IL-7 [198], [199]. En el caso de LSEctin, podría regular la señalización de STAT1 en células tumorales [100], por lo que nuestros resultados confirman la profunda implicación de esta lectina, y su ligando LAG3, en la modulación de estas vías en linfocitos.

Por otro lado, en el hígado cirrótico de los animales Ki, podíamos observar una expansión de células CD4 IL-10+ además de la retracción de los Th17. Esto, junto con

el incremento de la señal de Foxp3 en estos mismos hígados, nos indicaba que la sobreexpresión de LSEctin debía estar promoviendo el fenotipo de las Treg. Curiosamente, estas células mostraban niveles altos de LAG3 en homeostasis, elevándose ligeramente en cirrosis. El estudio del papel de esta molécula en Tregs ha demostrado que, lejos de promover su inhibición como en los Th17, es imprescindible para su función inmunomoduladora [200], [201], [202]. De hecho, la estimulación de LAG3 en Tregs está implicada en la diferenciación y la proliferación de estos linfocitos, siendo necesaria su estimulación para producción adecuada de IL-10 por parte de estas células. [199], [200], [203]. Nuestros experimentos *in vitro* mostraron que LSEctin promovía la diferenciación de esta población reguladora de una manera LAG3 dependiente. Además, observamos un mayor número de Tregs en el hígado de los animales Ki, así como la presencia de células CD4 con altos niveles de IL-10+. Estos resultados también concordaban con el efecto que tiene LSEctin expresado en células de melanoma donde promueve la liberación de IL-10 por parte de las Treg durante la progresión tumoral [99]. En conjunto, se ilustra el papel que juega también LSEctin en la biología de las células reguladoras.

En resumen, a lo largo de estos dos trabajos hemos demostramos que la modulación de la respuesta proinflamatoria de LSEctin está mediada por su ligando en linfocitos T LAG3. Esta interacción principalmente controla en homeostasis el balance Th17/Treg hepático inhibiendo los primeros y promoviendo los segundos. En cirrosis, por el contrario, la pérdida de expresión de LSEctin compromete la capacidad de desactivación de las células T del endotelio y favorece una respuesta Th17 dependiente, como se observa en modelos animales y en pacientes. Significativamente, la expresión de esta lectina se puede recuperar en las LSECs cirróticas mediante el uso de citocinas antiinflamatorias. El consecuente aumento de LSEctin en cirrosis podría regular las poblaciones inmunitarias reduciendo el daño necroptótico, la extensión de la fibrosis y la pérdida de la función hepática como vemos en nuestro modelo de sobreexpresión. En éste, el compartimento de las células CD4 transita a poblaciones reguladoras promoviendo la homeostasis. Así concluimos que la modulación de LSEctin supone un mecanismo sólido reprogramación de las LSECs y de promoción de tolerancia hepática que podría mostrar un valor potencial como diana terapéutica en cirrosis.



CONCLUSIONES

UNIVERSITAS Miguel Hernández

11. CONCLUSIONES

1. LSEctin tiene un papel fundamental modulando la respuesta del endotelio a los estímulos a los que está expuesto como antígenos bacterianos o la interacción linfocitaria promoviendo respuestas tolerogénicas.
2. La expresión de LSEctin se encuentra reprimida durante la cirrosis hepática en pacientes y en modelos animales, pudiendo modularse negativamente por citocinas proinflamatorias y positivamente por citocinas antiinflamatorias, lo que podría constituir una herramienta de reprogramación endotelial en cirrosis.
3. Mantener la expresión de LSEctin durante la cirrosis hepática se traduce en un menor daño histológico, menor muerte celular y un ambiente inmunitario local menos proinflamatorio caracterizado por bajos niveles de Th17.
4. LSEctin inhibe la señalización del TCR y de IL-6 a través de LAG3, receptor que expresan los linfocitos durante el daño hepático, atenuando la diferenciación de las Th17.



Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

BIBLIOGRAFÍA

12. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. R. Z. Abdel-Misih and M. Bloomston, 'Liver Anatomy', 2010, *W.B. Saunders*. doi: 10.1016/j.suc.2010.04.017.
- [2] S. Lorente, M. Hautefeuille, and A. Sanchez-Cedillo, 'The liver, a functionalized vascular structure', *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-73208-8.
- [3] E. Trefts, M. Gannon, and D. H. Wasserman, 'The liver', Nov. 06, 2017, *Cell Press*. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
- [4] C. Sanz-García, A. Fernández-Iglesias, J. Gracia-Sancho, L. A. Arráez-Aybar, Y. A. Nevzorova, and F. J. Cubero, 'The Space of Disse: The Liver Hub in Health and Disease', *Livers 2021, Vol. 1, Pages 3-26*, vol. 1, no. 1, pp. 3–26, Feb. 2021, doi: 10.3390/LIVERS1010002.
- [5] C. Berasain and M. A. Avila, 'Regulation of hepatocyte identity and quiescence', *Cell Mol Life Sci*, vol. 72, no. 20, p. 3831, Oct. 2015, doi: 10.1007/S00018-015-1970-7.
- [6] J. M. Banales, R. C. Huebert, T. Karlsen, M. Strazzabosco, N. F. LaRusso, and G. J. Gores, 'Cholangiocyte pathobiology', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 2019 16:5*, vol. 16, no. 5, pp. 269–281, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41575-019-0125-y.
- [7] J. Poisson *et al.*, 'Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases', *J Hepatol*, vol. 66, no. 1, pp. 212–227, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.JHEP.2016.07.009.
- [8] A. Blouin, R. P. Bolender, and E. R. Weibel, 'Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study', *J Cell Biol*, vol. 72, no. 2, p. 441, 1977, doi: 10.1083/JCB.72.2.441.
- [9] S. Shetty, P. F. Lalor, and D. H. Adams, 'Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 2018 15:9*, vol. 15, no. 9, pp. 555–567, May 2018, doi: 10.1038/s41575-018-0020-y.
- [10] L. J. Dixon, M. Barnes, H. Tang, M. T. Pritchard, and L. E. Nagy, 'Kupffer Cells in the Liver', *Compr Physiol*, vol. 3, no. 2, p. 785, 2013, doi: 10.1002/CPHY.C120026.
- [11] A. T. Nguyen-Lefebvre and A. Horuzsko, 'Kupffer Cell Metabolism and Function', *J Enzymol Metab*, vol. 1, no. 1, p. 101, 2015, Accessed: May 08, 2025. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4771376/>
- [12] Y. Wen, J. Lambrecht, C. Ju, and F. Tacke, 'Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities', *Cell Mol Immunol*, vol. 18, no. 1, pp. 45–56, Jan. 2021, doi: 10.1038/S41423-020-00558-8.
- [13] D. R. Kamm and K. S. McCommis, 'Hepatic stellate cells in physiology and pathology', *Journal of Physiology*, vol. 600, no. 8, pp. 1825–1837, Apr. 2022, doi: 10.1113/JP281061.
- [14] P. Kubes and C. Jenne, 'Immune Responses in the Liver', *Annual Review of Immunology*, vol. 33, p. 8, Jan. 2018, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052415>.
- [15] A. J. Highton, I. S. Schuster, M. A. Degli-Esposti, and M. Altfeld, 'The role of natural killer cells in liver inflammation', *Semin Immunopathol*, vol. 43, no. 4, pp. 519–533, Aug. 2021, doi: 10.1007/S00281-021-00877-6.
- [16] X. Ficht and M. Iannacone, 'Immune surveillance of the liver by T cells', *Sci Immunol*, vol. 5, no. 51, p. 2351, Sep. 2020, doi: 10.1126/SCIIMMUNOL.ABA2351
- [17] H. Ishibashi, M. Nakamura, A. Komori, K. Migita, and S. Shimoda, 'Liver architecture, cell function, and disease', Sep. 2009. doi: 10.1007/s00281-009-0155-6.
- [18] S. L. Aronoff, K. Berkowitz, and B. Shreiner, 'Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon', 2004. [Online]. Available: <http://diabetesjournals.org/spectrum/article-pdf/17/3/183/558189/0183.pdf>
- [19] S. Bihari, J. Bannard-Smith, and R. Bellomo, 'Albumin as a drug: its biological effects beyond volume expansion', Sep. 01, 2020, *College of Intensive Care Medicine*. doi: 10.1016/s1441-2772(23)00394-0.
- [20] O. A. Almazroo, M. K. Miah, and R. Venkataramanan, 'Drug Metabolism in the Liver', *Clin Liver Dis*, vol. 21, no. 1, pp. 1–20, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.CLD.2016.08.001.
- [21] B. Flores, H. D. Trivedi, S. C. Robson, and A. Bonder, 'Hemostasis, bleeding and thrombosis in liver disease', *J Transl Sci*, vol. 3, no. 3, p. 10.15761/JTS.1000182, 2017, doi: 10.15761/JTS.1000182.
- [22] C. N. Jenne and P. Kubes, 'Immune surveillance by the liver', *Nat Immunol*, vol. 14, no. 10, pp. 996–1006, 2013, doi: 10.1038/NI.2691.

- [23] S. Ekpanyapong and K. R. Reddy, 'Infections in Cirrhosis', *Curr Treat Options Gastroenterol*, vol. 17, no. 2, p. 254, Jun. 2019, doi: 10.1007/S11938-019-00229-2.
- [24] K. M. Irvine, I. Ratnasekera, E. E. Powell, and D. A. Hume, 'Casuses and consequences of innate immune dysfunction in cirrhosis', *Front Immunol*, vol. 10, no. FEB, p. 427136, Feb. 2019, doi: 10.3389/FIMMU.2019.00293/XML/NLM.
- [25] A. K. Horst, K. Neumann, L. Diehl, and G. Tiegs, 'Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells', *Cellular & Molecular Immunology 2016 13:3*, vol. 13, no. 3, pp. 277–292, Apr. 2016, doi: 10.1038/cmi.2015.112.
- [26] M. W. Robinson, C. Harmon, and C. O'Farrelly, 'Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis', *Cell Mol Immunol*, vol. 13, no. 3, pp. 267–276, May 2016, doi: 10.1038/CMI.2016.3,.
- [27] P. A. Knolle and D. Wohlleber, 'Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells', *Cell Mol Immunol*, vol. 13, no. 3, pp. 347–353, May 2016, doi: 10.1038/CMI.2016.5,.
- [28] C. V. Carman and R. Martinelli, 'T lymphocyte-endothelial interactions: Emerging understanding of trafficking and antigen-specific immunity', *Front Immunol*, vol. 6, no. NOV, p. 146916, Nov. 2015, doi: 10.3389/FIMMU.2015.00603/XML/NLM.
- [29] B. Smedsrød, 'Clearance function of scavenger endothelial cells', *Comp Hepatol*, vol. 3, no. Suppl 1, p. S22, Jan. 2004, doi: 10.1186/1476-5926-2-S1-S22.
- [30] A. Schurich *et al.*, 'Distinct kinetics and dynamics of cross-presentation in liver sinusoidal endothelial cells compared to dendritic cells', *Hepatology*, vol. 50, no. 3, pp. 909–919, 2009, doi: 10.1002/HEP.23075,.
- [31] K. M. Breiner, H. Schaller, and P. A. Knolle, 'Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: A new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms', *Hepatology*, vol. 34, no. 4 I, pp. 803–808, 2001, doi: 10.1053/JHEP.2001.27810,.
- [32] L. P. Ganesan, S. Mohanty, J. Kim, K. R. Clark, J. M. Robinson, and C. L. Anderson, 'Rapid and Efficient Clearance of Blood-borne Virus by Liver Sinusoidal Endothelium', *PLoS Pathog*, vol. 7, no. 9, p. e1002281, Sep. 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1002281.
- [33] E. Pandey, A. S. Nour, and E. N. Harris, 'Prominent Receptors of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Liver Homeostasis and Disease', *Front Physiol*, vol. 11, p. 873, Jul. 2020, doi: 10.3389/FPHYS.2020.00873.
- [34] L. P. Ganesan *et al.*, 'FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes', *J Immunol*, vol. 189, no. 10, p. 4981, Nov. 2012, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1202017.
- [35] A. Uhrig *et al.*, 'Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver', *J Leukoc Biol*, vol. 77, no. 5, pp. 626–633, May 2005, doi: 10.1189/JLB.0604332,.
- [36] P. A. Knolle *et al.*, 'Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10', *Clin Exp Immunol*, vol. 107, no. 3, pp. 555–561, 1997, doi: 10.1046/J.1365-2249.1997.D01-959.X,.
- [37] J. Amersfoort, G. Eelen, and P. Carmeliet, 'Immunomodulation by endothelial cells — partnering up with the immune system?', *Nature Reviews Immunology 2022 22:9*, vol. 22, no. 9, pp. 576–588, Mar. 2022, doi: 10.1038/s41577-022-00694-4.
- [38] D. H. Adams, S. G. Hubscher, N. C. Fisher, A. Williams, and M. Robinson, 'Expression of E-selectin and E-selectin ligands in human liver inflammation', *Hepatology*, vol. 24, no. 3, pp. 533–538, Sep. 1996, doi: 10.1053/jhep.1996.v24.pm0008781319.
- [39] P. F. Lalor, J. M. Clements, R. Pigott, M. J. Humphries, J. H. Spragg, and G. B. Nash, 'Association between receptor density, cellular activation, and transformation of adhesive behavior of flowing lymphocytes binding to VCAM-1', *Eur J Immunol*, vol. 27, no. 6, pp. 1422–1426, Jun. 1997, doi: 10.1002/EJI.1830270619,.
- [40] J. Wong *et al.*, 'A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature', *Journal of Clinical Investigation*, vol. 99, no. 11, pp. 2782–2790, Jun. 1997, doi: 10.1172/JCI119468,.
- [41] T. Ichida *et al.*, 'Localization of hyaluronan in human liver sinusoids: A histochemical study using hyaluronan-binding protein', *Liver*, vol. 16, no. 6, pp. 365–371, 1996, doi: 10.1111/J.1600-0676.1996.TB00763.X,.
- [42] D. G. Jackson, 'Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis', *APMIS*, vol. 112, no. 7–8, pp. 526–538, Jul. 2004, doi: 10.1111/J.1600-0463.2004.APM11207-0811.X,.

- [43] M. Falkowski, K. Schledzewski, B. Hansen, and S. Goerdts, 'Expression of stabilin-2, a novel fasciclin-like hyaluronan receptor protein, in murine sinusoidal endothelia, avascular tissues, and at solid/ liquid interfaces', *Histochem Cell Biol*, vol. 120, no. 5, pp. 361–369, Nov. 2003, doi: 10.1007/S00418-003-0585-5,.
- [44] B. McDonald and P. Kubes, 'Interactions between CD44 and hyaluronan in leukocyte trafficking', *Front Immunol*, vol. 6, no. FEB, 2015, doi: 10.3389/FIMMU.2015.00068,.
- [45] B. Eksteen *et al.*, 'Hepatic endothelial CCL25 mediates the recruitment of CCR9+ gut-homing lymphocytes to the liver in primary sclerosing cholangitis', *Journal of Experimental Medicine*, vol. 200, no. 11, pp. 1511–1517, 2004, doi: 10.1084/JEM.20041035,.
- [46] A. Carambia *et al.*, 'TGF- β -dependent induction of CD4+CD25+Foxp3 + Tregs by liver sinusoidal endothelial cells', *J Hepatol*, vol. 61, no. 3, pp. 594–599, 2014, doi: 10.1016/j.jhep.2014.04.027.
- [47] A. Schrage *et al.*, 'Enhanced T cell transmigration across the murine liver sinusoidal endothelium is mediated by transcytosis and surface presentation of chemokines', *Hepatology*, vol. 48, no. 4, pp. 1262–1272, Oct. 2008, doi: 10.1002/HEP.22443,.
- [48] A. W. Lohse *et al.*, 'Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells', *Gastroenterology*, vol. 110, no. 4, pp. 1175–1181, 1996, doi: 10.1053/gast.1996.v110.pm8613007.
- [49] A. Limmer *et al.*, 'Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance', *Nat Med*, vol. 6, no. 12, pp. 1348–1354, 2000, doi: 10.1038/82161,.
- [50] G. J. Freeman *et al.*, 'Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation', *Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, no. 7, pp. 1027–1034, Oct. 2000, doi: 10.1084/JEM.192.7.1027,.
- [51] L. Diehl, A. Schurich, R. Grochtmann, S. Hegenbarth, L. Chen, and P. A. Knolle, 'Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance', *Hepatology*, vol. 47, no. 1, pp. 296–305, Jan. 2008, doi: 10.1002/HEP.21965,.
- [52] N. von Oppen *et al.*, 'Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization', *Hepatology*, vol. 49, no. 5, pp. 1664–1672, May 2009, doi: 10.1002/HEP.22795,.
- [53] D. Wohlleber *et al.*, 'TNF-Induced Target Cell Killing by CTL Activated through Cross-Presentation', *Cell Rep*, vol. 2, no. 3, pp. 478–487, Sep. 2012, doi: 10.1016/J.CELREP.2012.08.001.
- [54] A. Schurich *et al.*, 'Dynamic Regulation of CD8 T Cell Tolerance Induction by Liver Sinusoidal Endothelial Cells', *The Journal of Immunology*, vol. 184, no. 8, pp. 4107–4114, Apr. 2010, doi: 10.4049/JIMMUNOL.0902580,.
- [55] J. P. Böttcher *et al.*, 'Liver-primed memory T cells generated under noninflammatory conditions provide anti-infectious immunity', *Cell Rep*, vol. 3, no. 3, pp. 779–795, 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.008.
- [56] P. A. Knolle *et al.*, 'Induction of cytokine production in naive CD4+ T cells by antigen- presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward T(h1) cells', *Gastroenterology*, vol. 116, no. 6, pp. 1428–1440, 1999, doi: 10.1016/S0016-5085(99)70508-1.
- [57] C. Wiegand, C. Frenzel, J. Herkel, K. J. Kallen, E. Schmitt, and A. W. Lohse, 'Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells', *Hepatology*, vol. 42, no. 1, pp. 193–199, Jul. 2005, doi: 10.1002/HEP.20756,.
- [58] K. Neumann, C. Rudolph, C. Neumann, M. Janke, D. Amsen, and A. Scheffold, 'Liver sinusoidal endothelial cells induce immunosuppressive IL-10-producing Th1 cells via the Notch pathway', *Eur J Immunol*, vol. 45, no. 7, pp. 2008–2016, Jul. 2015, doi: 10.1002/EJI.201445346,.
- [59] A. Carambia *et al.*, 'Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells', *J Hepatol*, vol. 58, no. 1, pp. 112–118, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.jhep.2012.09.008.
- [60] A. Tanne *et al.*, 'A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against Mycobacterium tuberculosis', *Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 10, pp. 2205–2220, Sep. 2009, doi: 10.1084/JEM.20090188,.
- [61] K. M. Dennehy and G. D. Brown, 'The role of the β -glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection', *J Leukoc Biol*, vol. 82, no. 2, pp. 253–258, Aug. 2007, doi: 10.1189/JLB.1206753.
- [62] F. Lafouresse *et al.*, 'L-selectin controls trafficking of chronic lymphocytic leukemia cells in lymph node high endothelial venules in vivo', *Blood*, vol. 126, no. 11, pp. 1336–1345, Sep. 2015, doi: 10.1182/blood-2015-02-626291.

- [63] G. D. Brown, J. A. Willment, and L. Whitehead, 'C-type lectins in immunity and homeostasis', *Nat Rev Immunol*, vol. 18, no. 6, pp. 374–389, Jun. 2018, doi: 10.1038/S41577-018-0004-8,.
- [64] A. N. Zelensky and J. E. Gready, 'The C-type lectin-like domain superfamily', *FEBS Journal*, vol. 272, no. 24, pp. 6179–6217, Dec. 2005, doi: 10.1111/J.1742-4658.2005.05031.X.
- [65] M. Da Glória Sousa *et al.*, 'Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin', *Cell Host Microbe*, vol. 9, no. 5, pp. 436–443, May 2011, doi: 10.1016/j.chom.2011.04.005.
- [66] B. N. Gantner, R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill, 'Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2', *Journal of Experimental Medicine*, vol. 197, no. 9, pp. 1107–1117, May 2003, doi: 10.1084/JEM.20021787,.
- [67] T. B. H. Geijtenbeek and S. I. Gringhuis, 'C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation', *Nat Rev Immunol*, vol. 16, no. 7, pp. 433–448, Jul. 2016, doi: 10.1038/NRI.2016.55,.
- [68] B. Ferwerda *et al.*, 'Human Dectin-1 Deficiency and Mucocutaneous Fungal Infections', *New England Journal of Medicine*, vol. 361, no. 18, pp. 1760–1767, Oct. 2009, doi: 10.1056/NEJMOA0901053.
- [69] S. LeibundGut-Landmann *et al.*, 'Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17', *Nat Immunol*, vol. 8, no. 6, pp. 630–638, Jun. 2007, doi: 10.1038/NI1460,.
- [70] S. I. Gringhuis *et al.*, 'Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- κ B activation through Raf-1 and Syk', *Nat Immunol*, vol. 10, no. 2, pp. 203–213, 2009, doi: 10.1038/NI.1692,.
- [71] T. B. H. Geijtenbeek and S. I. Gringhuis, 'Signalling through C-type lectin receptors: Shaping immune responses', *Nat Rev Immunol*, vol. 9, no. 7, pp. 465–479, Jul. 2009, doi: 10.1038/NRI2569,.
- [72] S. I. Gringhuis, J. den Dunnen, M. Litjens, B. van het Hof, Y. van Kooyk, and T. B. H. Geijtenbeek, 'C-Type Lectin DC-SIGN Modulates Toll-like Receptor Signaling via Raf-1 Kinase-Dependent Acetylation of Transcription Factor NF- κ B', *Immunity*, vol. 26, no. 5, pp. 605–616, May 2007, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2007.03.012,.
- [73] S. I. Gringhuis, J. den Dunnen, M. Litjens, M. van der Vlist, and T. B. H. Geijtenbeek, 'Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to Mycobacterium tuberculosis, HIV-1 and Helicobacter pylori', *Nat Immunol*, vol. 10, no. 10, pp. 1081–1088, 2009, doi: 10.1038/NI.1778,.
- [74] Y. Guo *et al.*, 'Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR', *Nat Struct Mol Biol*, vol. 11, no. 7, pp. 591–598, Jul. 2004, doi: 10.1038/NSMB784,.
- [75] S. I. Gringhuis *et al.*, 'Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production', *Nature Communications* 2014 5:1, vol. 5, no. 1, pp. 1–12, Oct. 2014, doi: 10.1038/ncomms6074.
- [76] S. I. Gringhuis, T. M. Kaptein, B. A. Wevers, A. W. Mesman, and T. B. H. Geijtenbeek, 'Fucose-specific DC-SIGN signalling directs T helper cell type-2 responses via IKK ϵ -and CYLD-dependent Bcl3 activation', *Nat Commun*, vol. 5, May 2014, doi: 10.1038/NCOMMS4898,.
- [77] S. Saijo *et al.*, 'Dectin-2 recognition of α -mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against candida albicans', *Immunity*, vol. 32, no. 5, pp. 681–691, May 2010, doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.001.
- [78] N. A. Barrett *et al.*, 'Dectin-2 mediates Th2 immunity through the generation of cysteinyl leukotrienes', *Journal of Experimental Medicine*, vol. 208, no. 3, pp. 593–604, Mar. 2011, doi: 10.1084/JEM.20100793,.
- [79] I. Machida *et al.*, 'Cysteinyl Leukotrienes Regulate Dendritic Cell Functions in a Murine Model of Asthma', *The Journal of Immunology*, vol. 172, no. 3, pp. 1833–1838, Feb. 2004, doi: 10.4049/JIMMUNOL.172.3.1833,.
- [80] L. Tang *et al.*, 'Liver Sinusoidal Endothelial Cell Lectin, LSEctin, Negatively Regulates Hepatic T-Cell Immune Response', *Gastroenterology*, vol. 137, no. 4, 2009, doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.051.
- [81] W. Liu *et al.*, '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', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 18, pp. 18748–18758, Apr. 2004, doi: 10.1074/JBC.M311227200,.

- [82] T. Gramberg *et al.*, 'LSEctin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus', *Virology*, vol. 340, no. 2, p. 224, Sep. 2005, doi: 10.1016/J.VIROL.2005.06.026.
- [83] A. Dominguez-Soto *et al.*, 'The DC-SIGN-related lectin LSEctin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells', *Blood*, vol. 109, no. 12, pp. 5337–5345, Jun. 2007, doi: 10.1182/BLOOD-2006-09-048058.
- [84] D. Sancho and C. Reis e Sousa, 'Signaling by myeloid C-Type lectin receptors in immunity and homeostasis', *Annu Rev Immunol*, vol. 30, pp. 491–529, Apr. 2012, doi: 10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-031210-101352,.
- [85] Á. Domínguez-Soto *et al.*, 'The pathogen receptor liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin is expressed in human Kupffer cells and regulated by PU.1', *Hepatology*, vol. 49, no. 1, pp. 287–296, 2009, doi: 10.1002/HEP.22678,.
- [86] F. Zhang, S. Ren, and Y. Zuo, 'DC-SIGN, DC-SIGNR and LSEctin: C-type lectins for infection', *Int Rev Immunol*, vol. 33, no. 1, pp. 54–66, Jan. 2014, doi: 10.3109/08830185.2013.
- [87] J. Auwerx *et al.*, 'Capture and transmission of HIV-1 by the C-type lectin L-SIGN (DC-SIGNR) is inhibited by carbohydrate-binding agents and polyanions', *Antiviral Res*, vol. 83, no. 1, pp. 61–70, Jul. 2009, doi: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2009.03.011,.
- [88] S. Mummidi *et al.*, 'Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms: Inter-individual variation in expression of DC-sign transcripts', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 35, pp. 33196–33212, Aug. 2001, doi: 10.1074/JBC.M009807200,.
- [89] Q. Li, H. cheng, Y. Liu, X. Wang, F. He, and L. Tang, 'Activation of mTORC1 by LSEctin in macrophages directs intestinal repair in inflammatory bowel disease', *Cell Death Dis*, vol. 11, no. 10, Oct. 2020, doi: 10.1038/S41419-020-03114-4,.
- [90] Z. Yang *et al.*, 'C-type lectin receptor LSEctin-mediated apoptotic cell clearance by macrophages directs intestinal repair in experimental colitis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 115, no. 43, pp. 11054–11059, Oct. 2018, doi: 10.1073/PNAS.1804094115,.
- [91] A. S. Powlesland *et al.*, 'A novel mechanism for LSEctin binding to Ebola virus surface glycoprotein through truncated glycans', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 1, pp. 593–602, Jan. 2008, doi: 10.1074/jbc.M706292200.
- [92] T. Gramberg *et al.*, 'LSEctin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus', *Virology*, vol. 340, no. 2, p. 224, Sep. 2005, doi: 10.1016/J.VIROL.2005.06.026.
- [93] Y. Li *et al.*, 'C-type lectin LSEctin interacts with DC-SIGNR and is involved in hepatitis C virus binding', *Mol Cell Biochem*, vol. 327, no. 1–2, pp. 183–190, 2009, doi: 10.1007/S11010-009-0056-Y,.
- [94] D. Zhao *et al.*, 'The Myeloid LSEctin Is a DAP12-Coupled Receptor That Is Crucial for Inflammatory Response Induced by Ebola Virus Glycoprotein', *PLoS Pathog*, vol. 12, no. 3, Mar. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1005487,.
- [95] B. Liu *et al.*, 'Liver Sinusoidal Endothelial Cell Lectin Inhibits CTL-Dependent Virus Clearance in Mouse Models of Viral Hepatitis', *The Journal of Immunology*, vol. 190, no. 8, pp. 4185–4195, Apr. 2013, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1203091,.
- [96] D. Zhao *et al.*, 'Up-regulation of Cbl-b is associated with LSEctin-mediated inhibition of different CD4+ T-cell subsets', *Immunobiology*, vol. 218, no. 4, pp. 602–608, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.imbio.2012.07.017.
- [97] D. Liu *et al.*, 'LSEctin on tumor-associated macrophages enhances breast cancer stemness via interaction with its receptor BTN3A3', *Cell Research 2019 29:5*, vol. 29, no. 5, pp. 365–378, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41422-019-0155-6.
- [98] Y. Zhang *et al.*, 'Clinical significance of LSEctin and its association with PVR in non-small-cell lung cancer patients', *Ann Transl Med*, vol. 8, no. 21, p. 1393, Nov. 2020, doi: 10.21037/ATM-20-3665.
- [99] F. Xu *et al.*, 'LSEctin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses', *Cancer Res*, vol. 74, no. 13, pp. 3418–3428, Jul. 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2690,.
- [100] Y. Zhang *et al.*, 'Novel roles of LSEctin in gastric cancer cell adhesion, migration, invasion, and lymphatic metastasis', *Cell Death Dis*, vol. 13, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.1038/S41419-022-05026-X,.
- [101] Y. Zuo *et al.*, 'Novel roles of liver sinusoidal endothelial cell lectin in colon carcinoma cell adhesion, migration and in-vivo metastasis to the liver', *Gut*, vol. 62, no. 8, pp. 1169–1178, Aug. 2013, doi: 10.1136/GUTJNL-2011-300593,.

- [102] S. Fang *et al.*, 'CXCL8 Up-Regulated LSECtin through AKT Signal and Correlates with the Immune Microenvironment Modulation in Colon Cancer', *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 21, Nov. 2022, doi: 10.3390/CANCERS14215300,.
- [103] R. Xu *et al.*, 'Antibody-Decorated Nanoplatfom to Reprogram Macrophage and Block Immune Checkpoint LSECtin for Effective Cancer Immunotherapy', *Nano Lett*, vol. 24, no. 28, pp. 8723–8731, Jul. 2024, doi: 10.1021
- [104] L. Tang, J. Yang, X. Tang, W. Ying, X. Qian, and F. He, 'The DC-SIGN family member LSECtin is a novel ligand of CD44 on activated T cells', *Eur J Immunol*, vol. 40, no. 4, pp. 1185–1191, Apr. 2010, doi: 10.1002/EJI.200939936,.
- [105] A. R. Jordan, R. R. Racine, M. J. P. Hennig, and V. B. Lokeshwar, 'The role of CD44 in disease pathophysiology and targeted treatment', *Front Immunol*, vol. 6, no. APR, p. 137736, Apr. 2015, doi: 10.3389/FIMMU.2015.00182/XML/NLM.
- [106] H. C. DeGrendele, P. Estess, and M. H. Siegelman, 'Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site', *Science (1979)*, vol. 278, no. 5338, pp. 672–675, Oct. 1997, doi: 10.1126/SCIENCE.278.5338.672,.
- [107] S. Wu, Y. Tan, F. Li, Y. Han, S. Zhang, and X. Lin, 'CD44: a cancer stem cell marker and therapeutic target in leukemia treatment', *Front Immunol*, vol. 15, p. 1354992, Apr. 2024, doi: 10.3389/FIMMU.2024.1354992/XML/NLM.
- [108] J. Yang *et al.*, 'Involvement of LSECtin in the hepatic natural killer cell response', *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 476, no. 1, pp. 49–55, Jul. 2016, doi: 10.1016/J.BBRC.2016.05.072.
- [109] Y. Katayama, A. Hidalgo, J. Chang, A. Peired, and P. S. Frenette, 'CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils', *Journal of Experimental Medicine*, vol. 201, no. 8, pp. 1183–1189, Apr. 2005, doi: 10.1084/JEM.20042014,.
- [110] W. D. Hanley, M. M. Burdick, K. Konstantopoulos, and R. Sackstein, 'CD44 on LS174T colon carcinoma cells possesses E-selectin ligand activity', *Cancer Res*, vol. 65, no. 13, pp. 5812–5817, Jul. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4557,.
- [111] D. A. Rhodes, W. Reith, and J. Trowsdale, 'Regulation of Immunity by Butyrophilins', *Annu Rev Immunol*, vol. 34, pp. 151–172, May 2016, doi: 10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-041015-055435,.
- [112] J. U. Ammann, A. Cooke, and J. Trowsdale, 'Butyrophilin Btn2a2 Inhibits TCR Activation and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway Signaling and Induces Foxp3 Expression in T Lymphocytes', *The Journal of Immunology*, vol. 190, no. 10, pp. 5030–5036, May 2013, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1203325,.
- [113] I. A. Smith *et al.*, 'BTN1A1, the Mammary Gland Butyrophilin, and BTN2A2 Are Both Inhibitors of T Cell Activation', *The Journal of Immunology*, vol. 184, no. 7, pp. 3514–3525, Apr. 2010, doi: 10.4049/JIMMUNOL.0900416,.
- [114] V. Aggarwal, C. J. Workman, and D. A. A. Vignali, 'LAG-3 as the third checkpoint inhibitor', *Nat Immunol*, vol. 24, no. 9, p. 1415, Sep. 2023, doi: 10.1038/S41590-023-01569-Z.
- [115] S. Grebinoski *et al.*, 'Autoreactive CD8+ T cells are restrained by an exhaustion-like program that is maintained by LAG3', *Nat Immunol*, vol. 23, no. 6, pp. 868–877, Jun. 2022, doi: 10.1038/S41590-022-01210-5,.
- [116] C. J. Workman and D. A. A. Vignali, 'The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells', *Eur J Immunol*, vol. 33, no. 4, pp. 970–979, Apr. 2003, doi: 10.1002/EJI.200323382,.
- [117] B. Huard, P. Prigent, M. Tournier, D. Bruniquel, and F. Triebel, 'CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins', *Eur J Immunol*, vol. 25, no. 9, pp. 2718–2721, 1995, doi: 10.1002/EJI.1830250949,.
- [118] T. K. Maeda, D. Sugiura, I. mi Okazaki, T. Maruhashi, and T. Okazaki, 'Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 294, no. 15, pp. 6017–6026, Apr. 2019, doi: 10.1074/jbc.RA119.007455.
- [119] C. Guy *et al.*, 'LAG3 associates with TCR-CD3 complexes and suppresses signaling by driving co-receptor-Lck dissociation', *Nat Immunol*, vol. 23, no. 5, pp. 757–767, May 2022, doi: 10.1038/S41590-022-01176-4;
- [120] N. Joller, A. C. Anderson, and V. K. Kuchroo, 'LAG-3, TIM-3, and TIGIT: Distinct functions in immune regulation', *Immunity*, vol. 57, no. 2, pp. 206–222, Feb. 2024, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2024.01.010/

- [121] R. A. Mariuzza, S. Shahid, and S. S. Karade, 'The immune checkpoint receptor LAG3: Structure, function, and target for cancer immunotherapy', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 300, no. 5, p. 107241, May 2024, doi: 10.1016/J.JBC.2024.107241/ASSET/81E2549A-DF44-4FA5-85E5-032984E3413F/MAIN.ASSETS/GR6.JPG.
- [122] F. Heymann and F. Tacke, 'Immunology in the liver — from homeostasis to disease', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2016 13:2, vol. 13, no. 2, pp. 88–110, Jan. 2016, doi: 10.1038/nrgastro.2015.200.
- [123] C. Nathan and A. Ding, 'Nonresolving Inflammation', *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 871–882, 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.02.029.
- [124] P. Ginès, A. Krag, J. G. Abraldes, E. Solà, N. Fabrellas, and P. S. Kamath, 'Liver cirrhosis', *The Lancet*, vol. 398, no. 10308, pp. 1359–1376, Oct. 2021, doi: 10.1016/S0140-6736(21)01
- [125] S. G. Sepanlou *et al.*, 'The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017', *Lancet Gastroenterol Hepatol*, vol. 5, no. 3, pp. 245–266, Mar. 2020, doi: 10.1016/S2468-1253(19)30349-8.
- [126] E. A. Tsochatzis, J. Bosch, and A. K. Burroughs, 'Liver cirrhosis', *The Lancet*, vol. 383, no. 9930, pp. 1749–1761, May 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(14)60121-5.
- [127] E. A. Tsochatzis, J. Bosch, and A. K. Burroughs, 'New therapeutic paradigm for patients with cirrhosis', *Hepatology*, vol. 56, no. 5, pp. 1983–1992, Nov. 2012, doi: 10.1002/HEP.25915.
- [128] N. A. Terrault, C. Francoz, M. Berenguer, M. Charlton, and J. Heimbach, 'Liver Transplantation 2023: Status Report, Current and Future Challenges', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 21, no. 8, pp. 2150–2166, Jul. 2023, doi: 10.1016/J.CGH.2023.04.005.
- [129] D. Q. Huang *et al.*, 'Global epidemiology of cirrhosis — aetiology, trends and predictions', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 20, no. 6, p. 388, Jun. 2023, doi: 10.1038/S41575-023-00759-2.
- [130] A. Pellicoro, P. Ramachandran, J. P. Iredale, and J. A. Fallowfield, 'Liver fibrosis and repair: Immune regulation of wound healing in a solid organ', *Nat Rev Immunol*, vol. 14, no. 3, pp. 181–194, Mar. 2014, doi: 10.1038/NRI3623,.
- [131] A. Tripathi *et al.*, 'The gut-liver axis and the intersection with the microbiome', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 15, no. 7, pp. 397–411, Jul. 2018, doi: 10.1038/S41575-018-0011-Z,.
- [132] A. Albillos, R. Martin-Mateos, S. Van der Merwe, R. Wiest, R. Jalan, and M. Álvarez-Mon, 'Cirrhosis-associated immune dysfunction', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2021 19:2, vol. 19, no. 2, pp. 112–134, Oct. 2021, doi: 10.1038/s41575-021-00520-7.
- [133] D. L. Shawcross, N. A. Davies, R. Williams, and R. Jalan, 'Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis', *J Hepatol*, vol. 40, no. 2, pp. 247–254, 2004, doi: 10.1016/j.jhep.2003.10.016.
- [134] L. Téllez *et al.*, 'Non-selective beta-blockers impair global circulatory homeostasis and renal function in cirrhotic patients with refractory ascites', *J Hepatol*, vol. 73, no. 6, pp. 1404–1414, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jhep.2020.05.011.
- [135] Y. M. Yang, S. Y. Kim, and E. Seki, 'Inflammation and Liver Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets', *Semin Liver Dis*, vol. 39, no. 1, pp. 26–42, 2019, doi: 10.1055/S-0038-1676806,.
- [136] R. Volpes, J. J. van den Oord, and V. J. Desmet, 'Memory T cells represent the predominant lymphocyte subset in acute and chronic liver inflammation', *Hepatology*, vol. 13, no. 5, pp. 826–829, May 1991, doi: 10.1002/HEP.1840130504.
- [137] C. T. Weaver and R. D. Hatton, 'Interplay between the TH 17 and TReg cell lineages: A (co-)evolutionary perspective', *Nat Rev Immunol*, vol. 9, no. 12, pp. 883–889, Dec. 2009, doi: 10.1038/NRI2660,.
- [138] H. K. Drescher, L. M. Bartsch, S. Weiskirchen, and R. Weiskirchen, 'Intrahepatic TH17/TReg Cells in Homeostasis and Disease—It's All About the Balance', *Front Pharmacol*, vol. 11, p. 588436, Oct. 2020, doi: 10.3389/FPHAR.2020.588436/XML/NLM.
- [139] F. Meng *et al.*, 'Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice', *Gastroenterology*, vol. 143, no. 3, 2012, doi: 10.1053/j.gastro.2012.05.049.
- [140] Z. Tan *et al.*, 'IL-17A Plays a Critical Role in the Pathogenesis of Liver Fibrosis through Hepatic Stellate Cell Activation', *The Journal of Immunology*, vol. 191, no. 4, pp. 1835–1844, Aug. 2013, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1203013,.

- [141] E. Kobayashi, M. Kobayashi, K. Tsuneyama, T. Fukami, M. Nakajima, and T. Yokoi, 'Halothane-Induced Liver Injury is Mediated by Interleukin-17 in Mice', *Toxicological Sciences*, vol. 111, no. 2, pp. 302–310, Oct. 2009, doi: 10.1093/TOXSCI/KFP165.
- [142] C. Hellerbrand, B. Stefanovic, F. Giordano, E. R. Burchardt, and D. A. Brenner, 'The role of TGF β 1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo', *J Hepatol*, vol. 30, no. 1, pp. 77–87, 1999, doi: 10.1016/S0168-8278(99)80010-5,.
- [143] I. R. Wanless, F. Wong, L. M. Blendis, P. Greig, E. J. Heathcote, and G. Levy, 'Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: Possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension', *Hepatology*, vol. 21, no. 5, pp. 1238–1247, May 1995, doi: 10.1016/0270-9139(95)90043-8.
- [144] J. Gao *et al.*, 'Angiocrine signaling in sinusoidal homeostasis and liver diseases', *J Hepatol*, vol. 81, no. 3, pp. 543–561, Sep. 2024, doi: 10.1016/j.jhep.2024.05.014.
- [145] M. Ortega-Ribera *et al.*, 'Increased sinusoidal pressure impairs liver endothelial mechanosensing, uncovering novel biomarkers of portal hypertension', *JHEP Reports*, vol. 5, no. 6, p. 100722, Jun. 2023, doi: 10.1016/J.JHEPR.2023.100722.
- [146] J. C. García-Pagán, J. Gracia-Sancho, and J. Bosch, 'Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis', *J Hepatol*, vol. 57, no. 2, pp. 458–461, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.jhep.2012.03.007.
- [147] J. Gracia-Sancho, E. Caparramp, and A. Fernamp, 'Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, doi: 10.1038/s41575-020-00411-3.
- [148] Q. Dai, Q. Ain, N. Seth, M. Rooney, and A. Zipprich, 'Liver sinusoidal endothelial cells: Friend or foe in metabolic dysfunction- associated steatotic liver disease/metabolic dysfunction-associated steatohepatitis', *Digestive and Liver Disease*, vol. 57, no. 5, pp. 493–503, May 2025, doi: 10.1016/J.DLD.2025.01.189.
- [149] L. S. Feder, J. A. Todaro, and D. L. Laskin, 'Characterization of interleukin-1 and interleukin-6 production by hepatic endothelial cells and macrophages', *J Leukoc Biol*, vol. 53, no. 2, pp. 126–132, Feb. 1993, doi: 10.1002/JLB.53.2.126.
- [150] Q. Guo *et al.*, 'Liver sinusoidal endothelial cell expressed vascular cell adhesion molecule 1 promotes liver fibrosis', *Front Immunol*, vol. 13, p. 983255, Aug. 2022, doi: 10.3389/FIMMU.2022.983255/PDF.
- [151] J. Brancale and S. Vilarinho, 'A single cell gene expression atlas of 28 human livers', *J Hepatol*, vol. 75, no. 1, pp. 219–220, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.jhep.2021.03.005.
- [152] E. Pose *et al.*, 'Programmed Death Ligand 1 Is Overexpressed in Liver Macrophages in Chronic Liver Diseases, and Its Blockade Improves the Antibacterial Activity Against Infections', *Hepatology*, vol. 74, no. 1, pp. 296–311, Jul. 2021, doi: 10.1002/HEP.31644,.
- [153] V. Singh, A. Khurana, P. Allawadhi, A. K. Banothu, K. K. Bharani, and R. Weiskirchen, 'Emerging Role of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Chronic Liver Diseases', *Front Pharmacol*, vol. 12, p. 790963, Dec. 2021, doi: 10.3389/FPHAR.2021.790963.
- [154] E. Caparrós *et al.*, 'Liver Sinusoidal Endothelial Cells Contribute to Hepatic Antigen-Presenting Cell Function and Th17 Expansion in Cirrhosis', *Cells*, vol. 9, no. 5, May 2020, doi: 10.3390/CELLS9051227,.
- [155] I. Gómez-Hurtado *et al.*, 'Gut microbiota dysbiosis is associated with inflammation and bacterial translocation in mice with CCl₄-Induced fibrosis', *PLoS One*, vol. 6, no. 7, 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0023037,.
- [156] J. Gracia-Sancho, B. Laviña, A. Rodríguez-Vilarrupla, H. García-Calderó, J. Bosch, and J. C. García-Pagán, 'Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers', *J Hepatol*, vol. 47, no. 2, pp. 220–227, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.jhep.2007.03.014.
- [157] J. Meyer, C. Gonelle-Gispert, P. Morel, and L. Bühler, 'Methods for Isolation and Purification of Murine Liver Sinusoidal Endothelial Cells: A Systematic Review', *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0151945, Mar. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0151945.
- [158] S. Martínez-López *et al.*, 'Cirrhosis-downregulated LSECtin can be retrieved by cytokines, shifts the TLR-induced LSECs secretome and correlates with the hepatic Th response', *Liver International*, vol. 44, no. 4, pp. 996–1010, Apr. 2024, doi: 10.1111/LIV.15836,.
- [159] S. N. Weber, A. Bohner, D. H. Dapito, R. F. Schwabe, and F. Lammert, 'TLR4 Deficiency Protects against Hepatic Fibrosis and Diethylnitrosamine-Induced Pre-Carcinogenic Liver Injury in Fibrotic Liver', *PLoS One*, vol. 11, no. 7, p. e0158819, Jul. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0158819.

- [160] A. Alavi, J. D. Hood, R. Frausto, D. G. Stupack, and D. A. Cheresh, 'Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli', *Science (1979)*, vol. 301, no. 5629, pp. 94–96, Jul. 2003, doi: 10.1126/SCIENCE.1082015,.
- [161] R. Srinivasan *et al.*, 'Erk1 and Erk2 Regulate Endothelial Cell Proliferation and Migration during Mouse Embryonic Angiogenesis', *PLoS One*, vol. 4, no. 12, p. e8283, 2009, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0008283.
- [162] X. Wang, Y. Wang, H. P. Kim, A. M. K. Choi, and S. W. Ryter, 'FLIP inhibits endothelial cell apoptosis during hyperoxia by suppressing Bax', *Free Radic Biol Med*, vol. 42, no. 10, pp. 1599–1609, May 2007, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.020.
- [163] Y. Lao *et al.*, 'Targeting Endothelial Erk1/2-Akt Axis as a Regeneration Strategy to Bypass Fibrosis during Chronic Liver Injury in Mice', *Molecular Therapy*, vol. 26, no. 12, pp. 2779–2797, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.ymthe.2018.08.016.
- [164] M. Panchoo and A. Lacko, 'Scavenger receptor class B type 1 regulates neuroblastoma cell proliferation, migration and invasion', *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 495, no. 1, pp. 614–620, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.BBRC.2017.10.154.
- [165] U. A. Hasan *et al.*, 'Cell proliferation and survival induced by Toll-like receptors is antagonized by type I IFNs', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 19, pp. 8047–8052, May 2007, doi: 10.1073/PNAS.0700664104/SUPPL_FILE/00664FIG9.JPG.
- [166] H. Kojima *et al.*, 'Cold stress-induced ferroptosis in liver sinusoidal endothelial cells determines liver transplant injury and outcomes', *JCI Insight*, vol. 9, no. 3, Feb. 2024, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.174354.
- [167] A. Badmann, S. Langsch, A. Keogh, T. Brunner, T. Kaufmann, and N. Corazza, 'TRAIL enhances paracetamol-induced liver sinusoidal endothelial cell death in a Bim- and Bid-dependent manner.', *Cell Death Dis*, vol. 3, no. 12, pp. e447–e447, Dec. 2012, doi: 10.1038/CDDIS.2012.185;
- [168] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, and S. C. Sun, 'NF- κ B signaling in inflammation', *Signal Transduct Target Ther*, vol. 2, no. 1, pp. 1–9, Jul. 2017, doi: 10.1038/SIGTRANS.2017.23
- [169] A. Tapia-Abellán *et al.*, 'Role of MAP Kinases and PI3K-Akt on the cytokine inflammatory profile of peritoneal macrophages from the ascites of cirrhotic patients', *Liver International*, vol. 33, no. 4, pp. 552–560, Apr. 2013, doi: 10.1111/LIV.12072,.
- [170] Y. Miyake *et al.*, 'C-type Lectin MCL Is an Fc γ -Coupled Receptor that Mediates the Adjuvanticity of Mycobacterial Cord Factor', *Immunity*, vol. 38, no. 5, pp. 1050–1062, May 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2013.03.010.
- [171] Y. Fan, Y. Li, Y. Chu, J. Liu, L. Cui, and D. Zhang, 'Toll-Like Receptors Recognize Intestinal Microbes in Liver Cirrhosis', *Front Immunol*, vol. 12, p. 608498, Feb. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2021.608498.
- [172] M. W. Parsons *et al.*, 'Dectin-2 Regulates the Effector Phase of House Dust Mite-Elicited Pulmonary Inflammation Independently from Its Role in Sensitization', *The Journal of Immunology*, vol. 192, no. 4, pp. 1361–1371, Feb. 2014, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1301809,.
- [173] N. Plazolles, J.-M. Humbert, L. Vachot, B. Verrier, C. Hocke, and F. Halary, 'Pivotal Advance: The promotion of soluble DC-SIGN release by inflammatory signals and its enhancement of cytomegalovirus-mediated cis-infection of myeloid dendritic cells', *J Leukoc Biol*, vol. 89, no. 3, pp. 329–342, Oct. 2010, doi: 10.1189/JLB.0710386,.
- [174] M. Rau *et al.*, 'Progression from Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis Is Marked by a Higher Frequency of Th17 Cells in the Liver and an Increased Th17/Resting Regulatory T Cell Ratio in Peripheral Blood and in the Liver', *The Journal of Immunology*, vol. 196, no. 1, pp. 97–105, Jan. 2016, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1501175,.
- [175] M. Relloso *et al.*, 'DC-SIGN (CD209) Expression Is IL-4 Dependent and Is Negatively Regulated by IFN, TGF- β , and Anti-Inflammatory Agents', *The Journal of Immunology*, vol. 168, no. 6, pp. 2634–2643, Mar. 2002, doi: 10.4049/JIMMUNOL.168.6.2634,.
- [176] P. Pratim Das and S. Medhi, 'Role of inflammasomes and cytokines in immune dysfunction of liver cirrhosis', *Cytokine*, vol. 170, p. 156347, Oct. 2023, doi: 10.1016/J.CYTO.2023.156347.
- [177] S. Martínez-López *et al.*, 'Aging Deteriorates Blood Brain Barrier Function and Polarizes Adaptive T Cell Expansion Contributing to Neurocognitive Damage in Experimental Cirrhosis', *Aging Dis*, pp. 0-, Nov. 2024, doi: 10.14336/AD.2024.0932.
- [178] E. Giancchetti and A. Fierabracci, 'Inhibitory Receptors and Pathways of Lymphocytes: The Role of PD-1 in Treg Development and Their Involvement in Autoimmunity Onset and Cancer Progression', *Front Immunol*, vol. 9, no. OCT, p. 2374, Oct. 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.02374.

- [179] F. Marra and F. Tacke, 'Roles for Chemokines in Liver Disease', *Gastroenterology*, vol. 147, no. 3, pp. 577-594.e1, Sep. 2014, doi: 10.1053/J.GASTRO.2014.06.043.
- [180] H. Anderton, I. P. Wicks, and J. Silke, 'Cell death in chronic inflammation: breaking the cycle to treat rheumatic disease', *Nature Reviews Rheumatology* 2020 16:9, vol. 16, no. 9, pp. 496–513, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41584-020-0455-8.
- [181] S. Zhao *et al.*, 'The concentration of tumor necrosis factor- α determines its protective or damaging effect on liver injury by regulating Yap activity', *Cell Death & Disease* 2020 11:1, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2020, doi: 10.1038/s41419-020-2264-z.
- [182] R. F. Schwabe and T. Luedde, 'APOPTOSIS AND NECROPTOSIS IN THE LIVER: A MATTER OF LIFE AND DEATH', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 15, no. 12, p. 738, Dec. 2018, doi: 10.1038/S41575-018-0065-Y.
- [183] S. Y. Lee *et al.*, 'IL-17 Induces Autophagy Dysfunction to Promote Inflammatory Cell Death and Fibrosis in Keloid Fibroblasts via the STAT3 and HIF-1 α Dependent Signaling Pathways', *Front Immunol*, vol. 13, p. 888719, Jun. 2022, doi: 10.3389/FIMMU.2022.888719/FULL.
- [184] J. Wang *et al.*, 'NaHS alleviates neuropathic pain in mice by inhibiting IL-17-mediated dopamine (DA) neuron necroptosis in the VTA', *Brain Res Bull*, vol. 220, Jan. 2025, doi: 10.1016/j.brainresbull.2024.111168.
- [185] X. Wu, R. K. Arya, E. Huang, M. R. McMullen, and L. E. Nagy, 'Receptor-interacting protein 1 and 3 kinase activity are required for high-fat diet induced liver injury in mice', *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 14, p. 1267996, Dec. 2023, doi: 10.3389/FENDO.2023.1267996/BIBTEX.
- [186] Z. Zhang *et al.*, 'RIPK3-Mediated Necroptosis and Neutrophil Infiltration Are Associated with Poor Prognosis in Patients with Alcoholic Cirrhosis', *J Immunol Res*, vol. 2018, p. 1509851, 2018, doi: 10.1155/2018/1509851.
- [187] T. Kisseleva and D. Brenner, 'Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 18, no. 3, pp. 151–166, Mar. 2021, doi: 10.1038/S41575-020-0037
- [188] J. Gao, B. Zuo, and Y. He, 'Liver sinusoidal endothelial cells as potential drivers of liver fibrosis (Review)', *Mol Med Rep*, vol. 29, no. 3, Mar. 2024, doi: 10.3892/MMR.2024.13164,.
- [189] G. Yadav, A. Goel, M. Kumar, H. S. Malhotra, H. Katiyar, and H. Dandu, 'Unlocking the immune puzzle: T Cell exhaustion in cirrhosis and implication for immunotherapy', *J Investig Med*, Jan. 2025, doi: 10.1177/10815589251320368.
- [190] K. Zheng *et al.*, 'Unraveling the Heterogeneity of CD8+ T-Cell Subsets in Liver Cirrhosis: Implications for Disease Progression', *Gut Liver*, vol. 19, no. 3, p. 410, May 2024, doi: 10.5009/GNL230345.
- [191] L. Pedersen *et al.*, 'The FGL-1/LAG-3 Axis is Associated With Disease Course in Alcohol-associated Hepatitis: A Preliminary Report', *J Clin Exp Hepatol*, vol. 15, no. 1, Jan. 2025, doi: 10.1016/j.jceh.2024.102424.
- [192] Y. Dong *et al.*, 'CD4+ T cell exhaustion revealed by high PD-1 and LAG-3 expression and the loss of helper T cell function in chronic hepatitis B', *BMC Immunol*, vol. 20, no. 1, pp. 1–9, Aug. 2019, doi: 10.1186/S12865-019-0309-9/TABLES/1.
- [193] Q. Liu, W. Y. Langdon, and J. Zhang, 'E3 ubiquitin ligase Cbl-b in innate and adaptive immunity', *Cell Cycle*, vol. 13, no. 12, p. 1875, Jun. 2014, doi: 10.4161/CC.29213.
- [194] L. Chocarro *et al.*, 'PD-1/LAG-3 co-signaling profiling uncovers CBL ubiquitin ligases as key immunotherapy targets', *EMBO Mol Med*, vol. 16, no. 8, pp. 1791–1816, Aug. 2024, doi: 10.1038/S44321-024-00098-Y,.
- [195] Y. Jiang *et al.*, 'Ligand-induced ubiquitination unleashes LAG3 immune checkpoint function by hindering membrane sequestration of signaling motifs', *Cell*, vol. 188, no. 9, pp. 2354-2371.e18, May 2025, doi: 10.1016/J.CELL.2025.02.014.
- [196] S. Bhaumik and R. Basu, 'Cellular and molecular dynamics of Th17 differentiation and its developmental plasticity in the intestinal immune response', *Front Immunol*, vol. 8, no. MAR, Mar. 2017, doi: 10.3389/FIMMU.2017.00254,.
- [197] Y. Wang *et al.*, 'Pan-cancer and single-cell analysis reveal dual roles of lymphocyte activation gene-3 (LAG3) in cancer immunity and prognosis', *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, pp. 1–17, Dec. 2024, doi: 10.1038/S41598-024-74808-4
- [198] D. M. Previte *et al.*, 'Lymphocyte Activation Gene-3 Maintains Mitochondrial and Metabolic Quiescence in Naive CD4+ T Cells', *Cell Rep*, vol. 27, no. 1, pp. 129-141.e4, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.CELREP.2019.03.004.

- [199] N. M. Durham *et al.*, 'Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3) Modulates the Ability of CD4 T-cells to Be Suppressed In Vivo', *PLoS One*, vol. 9, no. 11, p. e109080, Nov. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0109080.
- [200] C. Camisaschi *et al.*, 'LAG-3 Expression Defines a Subset of CD4+CD25highFoxp3+ Regulatory T Cells That Are Expanded at Tumor Sites', *The Journal of Immunology*, vol. 184, no. 11, pp. 6545–6551, Jun. 2010, doi: 10.4049/JIMMUNOL.0903879.
- [201] D. Kim *et al.*, 'Inhibitory co-receptor Lag3 supports Foxp3+ regulatory T cell function by restraining Myc-dependent metabolic programming', *Immunity*, vol. 57, no. 11, Nov. 2024, doi: 10.1016/j.immuni.2024.08.008.
- [202] C. T. Huang *et al.*, 'Role of LAG-3 in regulatory T cells', *Immunity*, vol. 21, no. 4, pp. 503–513, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.immuni.2004.08.010.
- [203] B. R. Burton *et al.*, 'Sequential transcriptional changes dictate safe and effective antigen-specific immunotherapy', *Nat Commun*, vol. 5, Sep. 2014, doi: 10.1038/NCOMMS5741,.



