



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

*Función de la metaloproteasa de matriz 10 (MMP10) en la
regeneración hepática y la carcinogénesis*

OIHANE GARCÍA IRIGOYEN

Tesis doctoral

2015



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

***Función de la metaloproteasa de matriz 10 (MMP10) en la
regeneración hepática y la carcinogénesis***

Memoria presentada por D^a Oihane García Irigoyen para aspirar al grado de Doctor por
la Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de
Hepatología y Terapia Génica del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) y
autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 1 de septiembre de 2015

Dr. Matías Ávila Zaragoza

Dra. Carmen Berasain Lasarte

Este trabajo se ha llevado a cabo con la ayuda Predoctoral del Programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de España.

“Nada en la vida debe ser temido, sólo comprendido. Ahora es hora de comprender más para temer menos”

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Es difícil enfrentarse a la página en blanco con algo tan personal como son los agradecimientos. Después de estar tantas horas absorta entre artículos científicos con estructuras tan marcadas, la libertad que da la parte de agradecimientos asusta y cuesta encontrar las palabras y el orden en el que agradecer todo el apoyo y la ayuda de estos 4 años.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Universidad de Navarra, al Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) y al entonces director del Departamento de Hepatología, el Dr. Jesús Prieto, la posibilidad de realizar la tesis doctoral y de adentrarme en el mundo de la investigación.

Agradecer también, al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por otorgarme una beca pre-doctoral y al Instituto Carlos III por la financiación concedida mediante los proyectos FIS para la realización de este proyecto.

Me gustaría continuar agradeciendo a mis directores de tesis, el Dr. Matías Ávila y la Dra. Carmen Berasain por formarme y guiarme a lo largo de estos años. Matías, muchas gracias por tu confianza y por todo lo que me has enseñado sobre el mundo de la Hepatología, para mí un área desconocida cuando llegué, y la investigación en general, por asentar en mí las bases de un buen científico y por fomentar la curiosidad y el afán por dar respuesta a lo desconocido. Muchas gracias a los dos por invertir tantas horas en mi formación y por tener paciencia cuando las cosas no salían según lo esperado. A pesar de los momentos duros, los nervios de los seminarios y congresos y las largas horas en el animalario (sobre todo al principio cuando me desmayaba al ver una aguja), ha sido un esfuerzo que ha merecido la pena tanto a nivel científico como personal y por ello os doy las gracias de corazón.

Tampoco quiero olvidarme de mencionar la ayuda ofrecida por el grupo del Dr. Páramo del área de Ciencias Cardiovasculares, especialmente a Josune Orbe y a José Antonio Rodríguez por su atenta disposición. A Txus Bañales por su paciencia con las células biliares. Y, por supuesto, a los Dres. Simone Carotti, Sergio Morini y Umberto Vespasiani de la Universidad campus Bio-Medico de Roma por su inestimable ayuda en el análisis histopatológico.

Jamás me olvidaré de las chicas del laboratorio 4.02, María E, María A, Raquel y Saioa (aunque ya no estés aquí, sigues formando parte de este grupo). Siento que me habéis apoyado en todo momento y que generando tan buen ambiente de trabajo os habéis convertido en algo más que simples compañeras de trabajo. Agradecer también a los colegas de los laboratorios 4.01 y 4.03 (Uxue, Manoli, Emilie, Laura, Dr. Fernando Corrales, Maite, Iker, Dr. Carlos Rodriguez, Eva...) y a los ex-miembros del 4.02 (Silvia, Josepmaria, Roberto...) por estar siempre ahí dispuestos a solucionar cualquier duda y a ayudar en todo lo que necesitase. Y, aún a riesgo de parecer pelota, agradecer a toda la cuarta planta del CIMA por los buenos momentos en el Punto de encuentro y por acogerme con los brazos abiertos cuando me unía a comer o a algún “juevintxo”.

Aunque ya las he mencionado, quiero agradecer de forma especial a Maite y a Uxue por enseñarme de primera mano los entresijos de la experimentación Biomédica. Vosotras fuisteis mi primer contacto con el “cacharreo” del laboratorio.

Maite, contigo aprendí a no perderme en el animalario y a no desmayarme al pinchar a los ratones (menudo susto te di, jeje). Muchísimas gracias por tener tanta paciencia y por explicarme todo con una gran sonrisa y transmitiendo tanta energía positiva. Hiciste que mis comienzos no fueran tan duros. ¡Vas a ser una gran madre, no tengo ninguna duda!

Uxue, tú me has ayudado a lo largo de toda esta tesis y no sólo en lo que a *in vitro* se refiere. Hemos compartido muchas horas de trabajo y quiero darte las gracias por tenderme tu mano y por enseñarme tanto. ¡No me extraña que los italianos quieran seguir viniendo de estancia al CIMA!

Además de los factores materiales y profesionales, la ayuda emocional es de suma importancia a la hora de realizar un trabajo de esta envergadura. Por esto, me gustaría recordar el nombre de aquellas personas de mi entorno más cercano que me han ayudado a sobreponerme en los momentos más estresantes de la realización de la tesis doctoral.

A María (María E, jeje), por ser una amiga desde los inicios de la carrera y por darme la oportunidad de hacer la tesis a tu lado. Hace más de 10 años que nos conocemos, buff nos estamos volviendo viejunas. Hemos vivido grandes momentos juntas y aunque la vida nos haya ido cambiando sé que siempre puedo contar contigo. ¡Gracias por estar siempre ahí!

A Natalia, Ana y Cova. Os conocí en la universidad y desde entonces habéis sido parte importante de mi vida. Especialmente, Natalia. Contigo viví grandes momentos en Bruselas y aprendí a convivir con “hermanas”. A pesar de la distancia (Canadá, Edimburgo...), siempre te siento cercana y dispuesta a escucharme y a animarme. ¡Mil gracias! Aunque quizás sería más correcto: Merci! Dank u wel! Thanks!

A Emilie, por convertirte en tan poco tiempo en una verdadera amiga. Gracias por iluminar con tu sonrisa y tu español “no ibérico” tantos momentos y excursiones. Je te promets d’aller te voir quelque soit l’endroit où tu te trouves.

A Antonio, ahora ya mi “marido” (que raro suena eso). A ti te ha tocado vivir de cerca el lado oscuro de mi personalidad durante los momentos de ira contra el ordenador y los nervios de la tesis. Gracias por haber confiado tanto en mí, por haberme apoyado cada día y por haberme ayudado en todo con tanta positividad, paciencia y dulzura. ¡Esto no hubiera sido posible sin ti! O sí, pero ahora estaría calva... Gracias por quererme incondicionalmente. Maite zaitut laztana!

Y por último, quiero agradecer a “mis aitas” todo lo que han hecho para que yo llegara hasta aquí. ¡Os lo debo todo! Siempre habéis confiado en mí y me habéis ayudado a estudiar lo que quería, a pesar del esfuerzo que os suponía. ¡Sin ninguna duda esta tesis os la dedico a vosotros! Bihotz-bihotzez maite zaituztet!!

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AFP	Alfa fetoproteína
ALT	Alanina aminotransferasa
AP-1	Proteína activadora 1
AR	Anfirregulina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AST	Aspartato aminotransferasa
BCA	Ácido bicincónico
BDL	Ligadura del conducto biliar (<i>bile duct ligation</i>)
BHA	Butilhidroxianisol
BrdU	5'-Bromo-2'-deoxiuridina
BSA	Seroalbúmina bovina
Cdk1	Quinasa dependiente de ciclina 1
DEN	Dietilnitrosamina
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CXCR4	Receptor de quimioquinas 4
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
EDA	Dominio extra A de la fibronectina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido tetraacético de etilenglicol
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DTT	Ditiotreitol

EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EREG	Epirregulina
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares
DPBS	Tampón fosfato salino de Dulbecco
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GPI	Glucosilfosfatidilinositol
HB-EGF	Factor de crecimiento de unión a heparina similar al EGF
HBV	Virus de la hepatitis B
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCV	Virus de la hepatitis C
HGF	Factor de crecimiento hepatocitario
HIF1α	Factor inducible por hipoxia 1 α
HP	Hepatectomía parcial
HO-1	Hemo oxigenasa 1
IgG	Inmunoglobulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
JNK	Quinasa del extremo N-terminal del c-Jun
LPS	Lipopolisacárido
MCP1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MEC	Matriz extracelular
MEK	Quinasa activada por señales extracelulares mitogénicas
MMP	Metaloproteasa de matriz

NAC	N-acetilcisteína
NFκB	Factor nuclear kappa B
NMC	Colangiocitos normales de ratón
Nx	Normoxia
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEA3	Proteína de unión A 3 del estimulador del poliooma
PK	Proteínasa K
PLG	Plasminógeno
P/S	Penicilina/estreptomicina
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDF1	Factor derivado del estroma 1
SDS	Dodecilsulfato sódico
αSMA	α-actina de músculo liso
SOD2	Superóxido dismutasa 2
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TGFα	Factor de crecimiento transformante α
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasas
tPA	Activador tisular del plasminógeno
TAFI	Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina
TBS	Tampón tris salino
TBST	Tampón tris salino con Tween
TLR4	Receptor de tipo TOLL 4
TNFα	Factor de necrosis tumoral α

Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
uPA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WT	Cepa salvaje (<i>wild type</i>)

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	21
1. El hígado: Aspectos generales	23
2. Respuesta hepática al daño agudo y crónico.....	24
2.1. Regeneración hepática	25
2.2. Carcinogénesis hepática.....	28
3. El remodelado de la matriz extracelular (MEC) en la respuesta hepática al daño agudo y crónico.....	31
3.1. El remodelado de la MEC en la regeneración hepática	32
3.2. El remodelado de la MEC en la progresión tumoral del hígado.....	33
4. Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs).....	35
4.1. Estructura de las MMPs	35
4.2. Regulación de las MMPs	38
4.3. MMPs en la respuesta hepática al daño y la regeneración.....	40
4.4. MMPs en la carcinogénesis hepática	42
5. MMP10: funciones biológicas y regulación	43
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
1. MATERIALES	53
1.1. Muestras de hígados humanos	53
1.2. Animales	53
1.3. Líneas celulares.....	54
1.4. Anticuerpos	54
1.5. Plásmidos y oligonucleótidos	55
1.6. Reactivos generales.....	56
2. MÉTODOS	57

2.1. Modelos animales	57
2.2. Análisis de los niveles séricos de transaminasas	59
2.3. Extracción de ARN y retrotranscripción.....	59
2.4. Expresión génica (PCR a tiempo real)	60
2.5. Inmunodetección de proteínas (western-blot).....	61
2.6. Análisis histopatológico del hígado	63
2.7. Inmunohistoquímica.....	63
2.8. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	65
2.9. Transfección transitoria de células.....	67
2.10. Transfección estable de células de hepatocarcinoma humano.....	68
2.11. Tratamientos <i>in vitro</i>	69
2.12. Medida de la actividad luciferasa.....	70
2.13. Ensayo de migración.....	71
2.14. Ensayo de invasión.....	72
2.15. Análisis estadístico.....	72
RESULTADOS	75
1. Expresión de la MMP10 durante el daño y la regeneración hepática.....	77
1.1. Modelo de hepatectomía parcial (HP)	77
1.2. Modelo de daño colestásico: Ligadura del conducto biliar (BDL).....	78
1.3. Modelo de daño hepático agudo: Administración de CCl ₄	80
2. Identificación de las señales que regulan la expresión de la MMP10 en el daño hepático	82
3. Papel de la MMP10 en el daño y la regeneración hepática	86
3.1. Modelo de hepatectomía parcial (HP)	88
3.2. Modelo de daño colestásico (BDL)	90
3.3. Modelo de daño hepático agudo (CCl ₄).....	94

4. Mecanismos por los que la MMP10 puede contribuir a la reparación tisular hepática	97
5. Expresión de la MMP10 en tejido hepático humano normal y enfermo	102
6. Expresión de la MMP10 en un modelo de carcinogénesis hepática experimental (DEN)	104
7. Papel de la MMP10 en la hepatocarcinogénesis.....	105
8. Interacción de la MMP10 con el eje SDF1/CXCR4 en la hepatocarcinogénesis .	110
9. Inducción de la expresión de la MMP10 por hipoxia y SDF1 en células de carcinoma hepatocelular (HCC)	114
10. Influencia del microambiente tumoral sobre la expresión de la MMP10 en células de carcinoma hepatocelular (HCC)	117
DISCUSIÓN.....	119
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	135
ANEXO.....	147

INTRODUCCIÓN

1. EL HÍGADO: ASPECTOS GENERALES

El hígado es un órgano multifuncional con gran capacidad regenerativa que controla procesos fisiológicos clave, convirtiéndolo en un elemento de suma importancia para el organismo. El hígado desempeña un papel central en la homeostasis metabólica del cuerpo, siendo el responsable del metabolismo, síntesis, almacenamiento y redistribución de nutrientes, carbohidratos, lípidos y vitaminas. Este órgano produce un gran número de proteínas séricas, incluyendo la albúmina, las proteínas de fase aguda y los factores de coagulación, como el fibrinógeno y la protrombina. Además, es el principal órgano detoxificante del organismo, encargándose de eliminar productos de desecho y compuestos xenobióticos mediante conversión metabólica y excreción biliar [1-3].

El principal tipo celular del hígado, que lleva a cabo la mayor parte de sus funciones, es el hepatocito. Los hepatocitos o células parenquimales suponen el 80 % de las células hepáticas y el 20 % restante está, principalmente, constituido por células endoteliales, células de Kupffer, linfocitos y células estelares. Los hepatocitos adultos, a pesar de ser células quiescentes y extremadamente diferenciadas, mantienen la capacidad de proliferar en respuesta a diferentes estímulos, como el daño tóxico o la hepatectomía parcial [1]. Las células endoteliales de los sinusoides hepáticos son fenestradas para facilitar el intercambio de macromoléculas con los hepatocitos. Entre los hepatocitos y las células endoteliales encontramos un espacio llamado “espacio de Disse”, en el que se localizan las células estelares hepáticas. Estas células multifuncionales de origen mesenquimal se encargan de almacenar gotas de ácido retinoico, pero durante el daño hepático se activan y adquieren un fenotipo similar al de los miofibroblastos, produciendo matriz extracelular y volviéndose contráctiles [3].

Estructuralmente, el parénquima hepático se compone de unidades de aspecto hexagonal denominadas lobulillos, que consisten en láminas de hepatocitos dispuestos de forma radiada en torno a una vena central (vena centrolobulillar). Cada lobulillo está rodeado por seis espacios porta en los que se encuentran una rama de la arteria hepática (sangre oxigenada), una rama de la vena porta (sangre poco oxigenada y rica en nutrientes proveniente del tracto gastrointestinal y del bazo), un capilar linfático y un conducto biliar. A través de los capilares sinusoidales, presentes entre las láminas de hepatocitos, la sangre fluye de forma centrípeta desde los espacios porta hasta las venas

centrales, que confluyen en la vena hepática. El lobulillo puede dividirse en tres zonas generales: periportal (zona 1), pericentral (zona 3) y transicional (zona 2). Los hepatocitos de la zona 1 hacia la zona 3 están expuestos a concentraciones crecientes de xenobióticos y toxinas procesadas y a concentraciones decrecientes de oxígeno [3].

La complejidad funcional, estructural y celular que presenta el hígado remarca su importancia fisiológica, pero también pone de manifiesto su exposición a insultos provenientes del sistema circulatorio, como metabolitos tóxicos o agentes infecciosos.

2. RESPUESTA HEPÁTICA AL DAÑO AGUDO Y CRÓNICO

Debido a las funciones esenciales que cumple en la regulación del metabolismo y a su papel como principal órgano detoxificante del organismo, el hígado, está expuesto a múltiples insultos endógenos y exógenos, cuyos daños deben ser rápida y eficazmente reparados. Diferentes tipos de insultos pueden ser los causantes del daño hepático, como los virus, las enfermedades autoinmunes o las toxinas, incluyendo el alcohol o los quimioterápicos, así como la pérdida de masa debida a la resección del tejido hepático en pacientes con tumores hepáticos primarios o metástasis entre otros. Las enfermedades hepáticas representan actualmente la quinta causa de muerte en el mundo occidental y, a pesar de la heterogeneidad de los agentes causales, la progresión de las mismas atraviesa una serie de estadios comunes. Un evento central en el inicio del daño hepático es la muerte del hepatocito, la cual desencadena una reacción inflamatoria ligada a una potente respuesta regenerativa que trata de restaurar el tejido hepático perdido. En esta respuesta se implican diferentes tipos celulares, citoquinas, factores de crecimiento y metabolitos en una compleja y controlada interacción. El reclutamiento y la activación de células inflamatorias, incluyendo los macrófagos residentes, es un evento inicial en la regeneración hepática tras una lesión, el cual parece jugar un papel esencial a la hora de activar la proliferación de los hepatocitos aún viables. Para restaurar la masa perdida es también esencial la participación de células productoras de matriz extracelular (MEC), como las células estelares hepáticas activadas [2, 4-6].

Ante una agresión aguda y transitoria, la respuesta hepática puede entenderse como un mecanismo de reparación y cicatrización controlado, que apenas deja secuelas. En cambio, si la lesión persiste, como ocurre en la infección crónica por los virus de la

hepatitis B (HBV) o de la hepatitis C (HCV), en el consumo crónico del alcohol o en la obesidad, la respuesta inflamatoria se perpetúa (hepatitis crónica) y el parénquima hepatocelular es progresivamente sustituido por tejido fibroso. Si la lesión es severa y persistente, esta fibrosis puede progresar a cirrosis, condición en la que la función hepática se ve comprometida y la arquitectura normal del parénquima queda destruida por septos fibrosos que rodean nódulos de hepatocitos en regeneración. En el hígado cirrótico la oncogénesis y la aparición de carcinoma hepatocelular (HCC) están facilitadas [7, 8].

Estas evidencias apoyan la idea de que la progresión de la lesión hepática (desarrollo de fibrosis y evolución a cirrosis), resulta en gran medida de la activación crónica y no controlada de mecanismos fisiológicos de regeneración y reparación tisular. El desarrollo del daño hepático y sus secuelas son una preocupación sanitaria creciente en todo el mundo, por lo que el conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares que gobiernan con éxito la restauración de las funciones hepáticas tras un insulto son claves en la búsqueda de estrategias terapéuticas aplicables a las enfermedades hepáticas humanas.

2.1. Regeneración hepática

La asombrosa capacidad de regeneración del hígado ha sido reconocida desde la antigua Grecia, como puede apreciarse en el mito de Prometeo. El titán Prometeo fue condenado por el dios Zeus a ser encadenado en el monte Cáucaso donde un águila devoraría su hígado. Durante la noche, el hígado regeneraba permitiendo al águila devorarlo una y otra vez, asegurando así, el sufrimiento eterno de Prometeo.

La respuesta proliferativa programada que se da en el hígado ante una pérdida de función parenquimal es llamada regeneración hepática. Sin embargo, el término más adecuado sería “hipertrofia e hiperplasia compensatoria”, ya que la resección parcial del tejido hepático no induce el reemplazo espacial de la parte perdida, sino que las células de la porción remanente proliferan y/o aumentan su tamaño con la intención de restaurar la masa hepática original [3]. Se trata de un fenómeno extremadamente complejo y bien regulado en el que las fluctuaciones de citoquinas, factores de crecimiento y metabolitos dan lugar al inicio de la proliferación de las células hepáticas, al igual que al cese de la

replicación una vez se ha recuperado el tamaño óptimo de masa hepática acorde al organismo [2, 9, 10].

El modelo de hepatectomía parcial (HP) de dos tercios fue primeramente descrito por Higgins y Anderson en 1931 [11] y sigue siendo uno de los modelos de regeneración hepática más utilizados. Este proceso experimental en el que se eliminan los dos lóbulos hepáticos frontales, que constituyen en torno a un 70% de la masa hepática, cuenta con múltiples ventajas como la inducción de una potente respuesta regeneradora con un inicio de la proliferación celular extremadamente sincronizado y un daño estructural de los lóbulos remanentes mínimo. No obstante, el principal inconveniente del modelo de HP reside en su limitada aplicabilidad para interpretar la dinámica de la regeneración hepática en las enfermedades humanas, que suelen cursar con inflamación y muerte del hepatocito [3, 12].

En comparación, también existen diversos modelos de daño químico que causan el daño y la muerte del hepatocito activando una respuesta inflamatoria, además de la respuesta regenerativa. Entre los agentes comúnmente usados para inducir el daño hepático se encuentra el tetracloruro de carbono (CCl_4), cuya activación metabólica en el hígado genera radicales libres hepatotóxicos. Entre las ventajas de estos modelos de daño hepático se encuentran una mayor similitud a la respuesta regenerativa desencadenada en las enfermedades hepáticas humanas, que comúnmente presentan daño e infiltrado inflamatorio, y la facilidad para transformar el daño agudo en crónico mediante la administración repetida del compuesto químico [3].

Si analizamos el proceso de regeneración hepática siguiendo el modelo de HP vemos que inmediatamente después de la resección, el flujo vascular hepático es forzado a perfundir a través de una porción capilar mucho menor de la original. Por lo que se produce un aumento de la presión portal y capilar, junto a un incremento en la disponibilidad de factores de crecimiento y hormonas circulantes. El remodelado de la MEC, llevado a cabo por diversas proteasas, es otro de los fenómenos que se aprecian de forma temprana tras la HP. Esta reorganización de la matriz juega un papel importante en el inicio de la regeneración hepática, ya que da lugar a la liberación local de factores de crecimiento [3]. Por tanto, la activación, proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de las células en el hígado en regeneración estarán controladas por un gran número de factores de crecimiento y citoquinas, que llegan al hígado a través del sistema circulatorio o que son expresados y liberados en el sitio del

daño [4]. Además de factores de crecimiento y citoquinas, también están implicadas señales metabólicas como los ácidos biliares, cuya correcta circulación enterohepática es indispensable para el adecuado desarrollo del proceso regenerativo [13]. Por otra parte, la división celular es un fenómeno poco frecuente en el hígado adulto, ya que los hepatocitos en condiciones normales permanecen quiescentes en la fase G₀ del ciclo celular. Sin embargo tras la HP, o tras un insulto de tipo tóxico, alrededor del 95 % de los hepatocitos son conducidos hacia la fase G₁ del ciclo celular en respuesta a la gran cantidad de estímulos desencadenados [1, 9].

La regeneración hepática transcurre a través de diferentes fases secuenciales, perfectamente interconectadas y reguladas, tradicionalmente identificadas como fase de iniciación o fase de *priming*, en la que los hepatocitos pasan a un estado celular competente para la replicación, fase de proliferación, en la que se da la expansión celular, y fase de terminación, en la que se suspende la replicación celular una vez se ha recuperado la masa hepática adecuada. La fase de iniciación se caracteriza por la producción de una serie de citoquinas, que estimulan la transición G₀-G₁ de las células hepáticas, entre las que se encuentran el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la interleuquina 6 (IL-6) y, en segundo plano, los factores de transcripción activados por éstas, el factor nuclear κ B (NF κ B) y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3). El lipopolisacárido bacteriano (LPS), procedente del sistema digestivo a través de la sangre portal, y la activación de miembros del sistema inmune innato son, en parte, responsables de la producción de estas citoquinas por las células de Kupffer y las células estelares. Una vez los hepatocitos han entrado en un estado de competencia replicativa son capaces de responder a la acción de factores de crecimiento, los cuales inducirán la progresión hacia la fase S del ciclo celular. Los factores de crecimiento de la fase de proliferación que mejor han sido caracterizados durante la regeneración hepática son el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y diversos miembros de la familia de los ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), como el factor de crecimiento de unión a heparina similar al EGF (HB-EGF), el factor de crecimiento transformante α (TGF α), la anfirregulina (AR) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). También participan diversos metabolitos comitogénicos, que modulan la capacidad de los factores de crecimiento para estimular la síntesis de ADN, como la insulina, el glucagón y la serotonina. Simultáneamente a este estímulo mitogénico se producirá una degradación y remodelado de la MEC que

permitirá la creación de un entorno adecuado para la proliferación celular. Finalmente, una vez recuperada la masa hepática, la replicación debe cesar y para ello entran en juego factores como el factor de crecimiento transformante β (TGF β), principalmente producido por las células estelares, y las activinas, capaces de proporcionar las señales adecuadas para que termine el proceso de proliferación [1, 4, 9, 12, 14] (figura 1).

En resumen, un gran número de genes y rutas de señalización han sido implicados en la correcta regeneración y en el mantenimiento de las funciones del hígado durante el proceso regenerativo. En cualquier caso, pueden definirse tres componentes clave en el desarrollo de esta respuesta: las citoquinas, los factores de crecimiento y los metabolitos. Existen intrincadas interacciones y una marcada redundancia entre las vías de señalización de estos componentes, por lo que la pérdida de un solo gen raramente conduce a la completa inhibición de la regeneración, sino a un retraso en el proceso [9, 15].

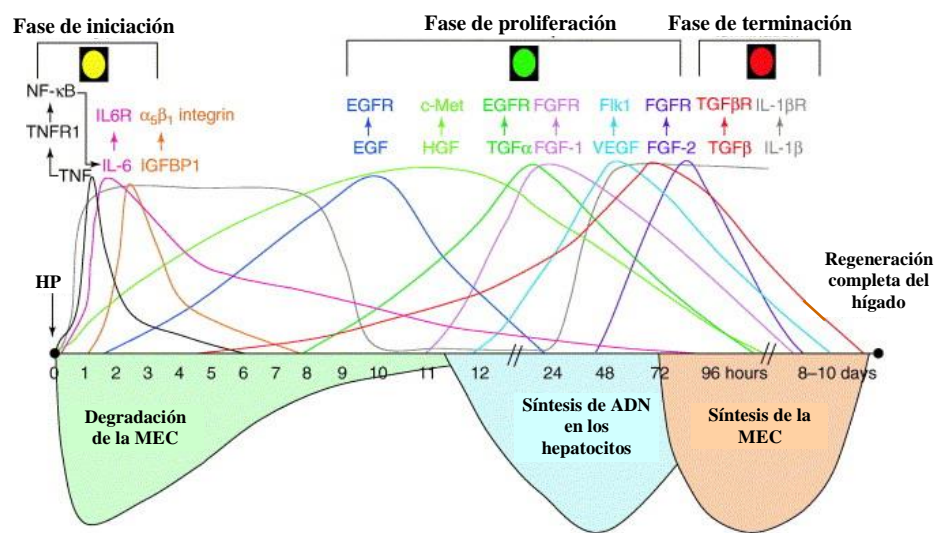


Figura 1. Fases de la regeneración hepática. La figura muestra las principales moléculas implicadas en las diferentes fases de la regeneración tras una HP. Adaptado de Mohammed y Khokha 2005 [12].

2.2. Carcinogénesis hepática

El HCC es el tumor maligno primario más común en el hígado y la tercera causa más frecuente de mortalidad asociada a cáncer en el mundo, con más de 750.000 nuevos casos diagnosticados cada año. Actualmente, el HCC, es una enfermedad mortal, en la que los índices de mortalidad igualan a los de incidencia en muchos países debido a la falta de terapias eficaces una vez ha sido diagnosticado el tumor [16-18]. En torno a un

70% de pacientes con HCC experimentan una recaída tras haberse sometido a una resección o ablación o son diagnosticados en un estado avanzado de la enfermedad. El único tratamiento aprobado para estos pacientes sigue siendo la administración sistémica de Sorafenib, un inhibidor multiquinasa. Sin embargo, la esperanza de vida media de los pacientes con HCC tratados con este fármaco es de tan solo un año, indicando la necesidad de una mejora en el tratamiento de esta enfermedad [17].

La mayoría de los casos de HCC se desarrollan en un entorno de daño hepático crónico, fibrosis e inflamación causados, frecuentemente, por consumo excesivo de alcohol, infección por los virus de la hepatitis B o C o la esteatohepatitis no alcohólica asociada a la obesidad y el síndrome metabólico. La distribución del HCC en la población mundial no es homogénea y la etiología es claramente multifactorial; entre sus factores de riesgo encontramos las hepatitis víricas, el alcohol, la cirrosis biliar primaria, carcinógenos ambientales, enfermedades metabólicas de origen genético, la hepatitis autoinmune y el hígado graso por causas no alcohólicas. Su prevalencia es especialmente alta en zonas de Asia y África donde los principales agentes causales son las infecciones por HBV o HCV y la intoxicación alimentaria con la aflatoxina B₁ (carcinógeno ambiental), mientras que en los países occidentales las infecciones virales están siendo desplazadas como principales factores de riesgo por el consumo excesivo de alcohol y la obesidad [19, 20]. La exposición continuada del hígado a estos agentes de tipo viral, tóxico o metabólico lleva al establecimiento de una patología crónica, siendo en el 80-90% de los casos el hígado cirrótico la base sobre la que surge el HCC [16]. En este contexto hepatológico se dan fenómenos de muerte del hepatocito, liberando especies reactivas del oxígeno (ROS) que pueden causar daño oxidativo en el ADN, inflamación y regeneración en un intento por revertir el daño celular [6]. La activación de los mecanismos inflamatorios y proliferativos da lugar a la síntesis y liberación de gran variedad de factores de crecimiento y citoquinas, cuya expresión sostenida en el tiempo puede llevar a la proliferación descontrolada de las células hepáticas [19]. Por tanto, nos encontramos ante una situación de estimulación y proliferación celular masiva, que junto al daño oxidativo en el ADN (o la integración del ADN viral en el mismo), puede propiciar la aparición y perduración de alteraciones genéticas y epigenéticas heterogéneas en los hepatocitos y su posible desdiferenciación y transformación maligna.

En el caso de la infección crónica por el HBV, la integración del ADN del virus en el genoma del huésped causa una inestabilidad genómica y una profunda alteración de genes relacionados con el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular. Además, la expresión de las proteínas virales, como la HBx, pueden activar vías relacionadas con la progresión tumoral [18, 21]. Asimismo, numerosos estudios han sugerido que factores de transcripción activados durante la respuesta hepática al daño como el NFκB o el STAT3, las citoquinas IL-6 e IL-1α, el dominio EDA de la fibronectina (capaz de activar a los receptores de tipo TOLL) y los ligandos del EGFR participan en el desarrollo tumoral [18, 22]. Factores de crecimiento, como el HGF y la AR, implicados en la proliferación de las células hepáticas durante el proceso fisiológico de la regeneración, han sido también involucrados en el control de la proliferación e invasión de las células de HCC [18, 23]. Igualmente, múltiples quimioquinas y sus receptores, entre las que se encuentra el CXCL12 (también llamada factor derivado del estroma 1, SDF1) y el receptor CXCR4, que juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria, han resultado tener propiedades quimiotácticas críticas en el tráfico celular desde y hacia el tejido tumoral, participando en la evasión del sistema inmune, la angiogénesis, la invasión y la diseminación del tumor [18].

Desde un punto de vista molecular el HCC es un tipo de tumor heterogéneo, y aunque el perfil transcripcional y el análisis mutacional permiten la clasificación del mismo en distintos subtipos, la identificación de verdaderas mutaciones causales está resultando complicada [24]. La heterogeneidad presente puede ser una de las causas subyacentes al limitado éxito obtenido con las terapias dirigidas en pacientes con HCC [17]. La biología del HCC es todavía más complicada debido a las intrincadas y complejas interacciones entre el cáncer y las células del estroma en el microambiente tumoral [18, 25]. El microambiente tumoral está compuesto por las células tumorales, la MEC en la que están embebidas, las células del estroma y las proteínas secretadas por todas ellas (figura 2). Las células inflamatorias, angiogénicas y fibroblásticas interactúan de manera recíproca con las células cancerosas en un medio hipóxico, enriquecido en quimioquinas y factores de crecimiento, generando una matriz extracelular patológica [18, 26]. Este perturbado y dinámico microambiente favorece el crecimiento tumoral, la angiogénesis y el proceso metastásico, por lo que estrategias farmacológicas dirigidas a este entorno tumoral serían de gran interés para el tratamiento del HCC.

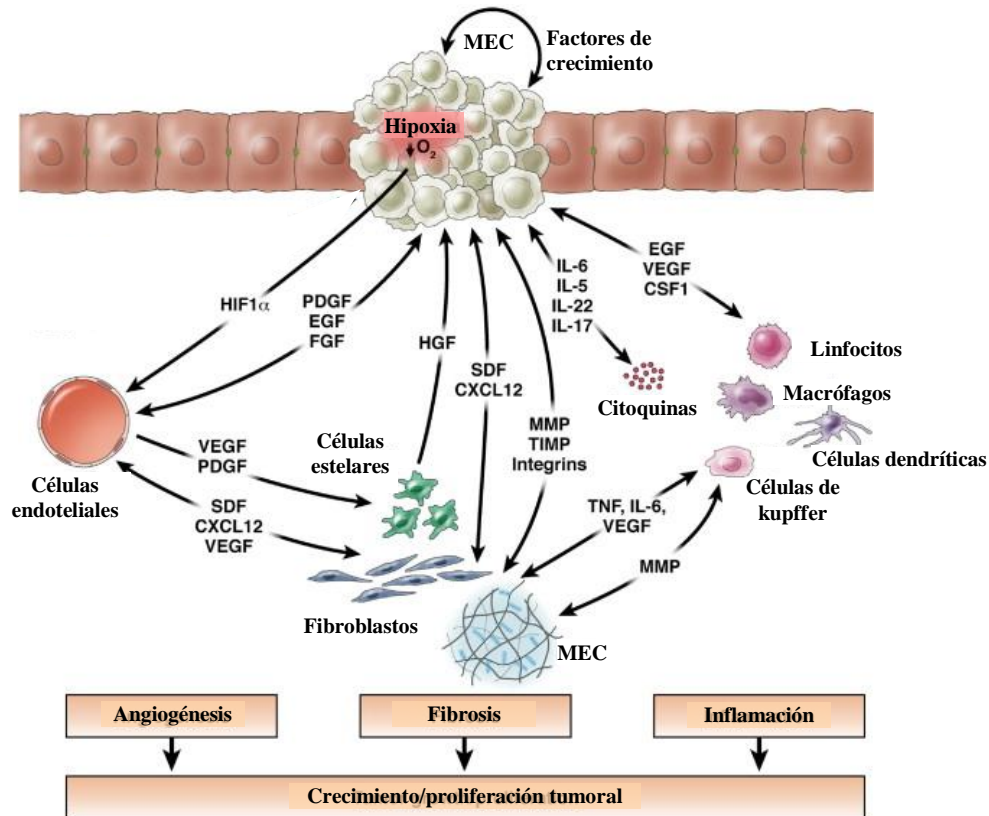


Figura 2. Esquema de los componentes del microambiente tumoral. Interacciones de las células y de los mecanismos moleculares en el entorno tumoral. Adaptado de Hernandez-Gea y cols. 2013 [18].

3. EL REMODELADO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) EN LA RESPUESTA HEPÁTICA AL DAÑO AGUDO Y CRÓNICO

La habilidad del hígado para regenerar tras un daño físico o tóxico requiere, además de la controlada proliferación de las células hepáticas, un adecuado remodelado de la MEC que permita restaurar la arquitectura hepática, es decir, la organización lobular y funcional de las células en proliferación. La MEC está compuesta por varias macromoléculas entre las que destacan la fibronectina, el colágeno, la laminina, la vitronectina y los proteoglicanos. Esta matriz es un soporte físico dinámico para las células, que además actúa como un reservorio de diversas moléculas reguladoras del comportamiento celular. Por tanto, la remodelación de la MEC tiene la capacidad de modular la diferenciación, la migración, el crecimiento y la apoptosis celular [12, 27, 28].

3.1. El remodelado de la MEC en la regeneración hepática

Durante la regeneración hepática, la matriz sufre un proceso de degradación, permitiendo la proliferación de las células hepáticas y liberando diversos factores clave para el inicio y la progresión del proceso regenerativo, como son el HGF y el TGF β , que permanecían anclados a la MEC en forma latente. Además, se ha demostrado que esta degradación de la matriz es crítica para la transición G1/S del ciclo celular de los hepatocitos y para la inducción de la quinasa dependiente de ciclina 1 (Cdk1). En consecuencia, la coordinada biosíntesis y eliminación proteolítica de componentes de la MEC resulta ser esencial para la correcta regeneración hepática [12, 27-29].

La remodelación de la matriz también forma parte de la respuesta hepática al daño. Durante este proceso se establece una matriz provisional, compuesta por macromoléculas como la fibrina/fibrinógeno y la fibronectina, que en estadios iniciales estabiliza las áreas dañadas y proporciona soporte a las células en proliferación [28, 30]. Sin embargo, para recuperar la arquitectura hepática funcional, esta matriz transitoria debe ser resuelta una vez finalizado el proceso de regeneración. En la reparación tisular se producen cambios tanto cuantitativos como cualitativos en la composición de la MEC. En el hígado normal el espacio subendotelial contiene una matriz de baja densidad similar a la membrana basal, pero en el hígado dañado esta matriz es sustituida por una rica en fibras de colágeno, fibronectina y proteoglicanos. Esta modificación en la composición de la MEC afecta al comportamiento celular y puede dar lugar a la activación de las células estelares, principales responsables de la producción de matriz durante fibrosis hepática [31, 32].

El activo y controlado remodelado de la MEC requerido durante la regeneración hepática, es mediado, principalmente, por dos clases de proteasas, las serina proteasas y las metaloproteasas de matriz (MMPs), que actúan de manera coordinada junto a sus inhibidores, entre los que se encuentran los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) y el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) [3, 12]. Utilizando diferentes modelos de daño y regeneración hepática se ha establecido el papel de diversas serina proteasas, como el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), el activador tisular del plasminógeno (tPA) y la plasmina, en la reacción regenerativa [12, 27, 28, 33, 34]. La actividad del uPA, por ejemplo, aumenta a los pocos minutos de la HP y da inicio a la cascada de remodelación de la matriz mediante la conversión del

plasminógeno en la proteasa activa plasmina, que es capaz de activar a MMPs clave para esta degradación proteolítica. Entre las dianas directas de la plasmina encontramos a la fibrina, que es un componente consistente de la MEC en las áreas hepáticas dañadas. La degradación de diversos componentes de la MEC por la plasmina, las MMPs y otras proteasas libera factores de crecimiento como el HGF inactivo, que permanecía anclado a la matriz. El uPA es capaz de procesar el HGF activándolo y permitiendo su unión al receptor c-MET, desencadenando la proliferación celular [3, 4, 27, 28, 33].

3.2. El remodelado de la MEC en la progresión tumoral del hígado

Por otro lado, el remodelado de la MEC también juega un papel importante en la progresión tumoral del hígado. Al igual que ocurre en el proceso de regeneración hepática, la aparición del HCC requiere del remodelado de la MEC, llevado a cabo principalmente por las MMPs, que permita la generación del espacio necesario para el crecimiento del tumor, además de la liberación de señales que fomenten su desarrollo. Por ejemplo, el HCC, es un tumor altamente vascularizado y una vez establecido, la supervivencia de las células neoplásicas dependerá de la formación de una nueva red vascular que aporte nutrientes y oxígeno al recién asentado tumor, siendo el remodelado de la MEC parte esencial de este proceso [18].

La red dinámica formada por la MEC, las células no tumorales y las moléculas secretadas por éstas, participa en la generación de un entorno promotor y permisivo para la iniciación y la progresión del HCC. Durante la fibrogénesis hepática desencadenada ante un daño crónico, se produce la activación de las células del estroma, incluidas las células estelares, que darán lugar a la secreción de múltiples moléculas reguladoras del comportamiento celular y a la deposición de MEC. Estas alteraciones anatómicas típicas de la fibrosis provocan un aumento de la resistencia al flujo sanguíneo que reduce el intercambio metabólico de oxígeno, favoreciendo la generación de hipoxia. Surge así, un microambiente con reducida disponibilidad de oxígeno y rico en factores reguladores, como son el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el HGF y el TGF β , que activarán la expresión de diversos genes implicados en angiogénesis, evasión del sistema inmune, invasión y metástasis [18, 26, 35]. Como hemos comentado anteriormente, no solo importa la

cantidad de MEC sino también su composición. La laminina 5, por ejemplo, es un componente poco habitual de la MEC del hígado sano, pero es altamente expresada en HCCs con fenotipo agresivo. Las células estelares son capaces de producir y secretar esta glicoproteína que favorece la migración de las células de HCC mediante la activación de la vía de señalización de la quinasa activada por señales extracelulares mitogénicas/proteína quinasa regulada por señales extracelulares (MEK/ERK) [36].

Una vez que el tumor se ha establecido, el papel del microambiente tumoral en la regulación del comportamiento del carcinoma ha sido reconocido también en otros órganos, incluyendo el pulmón, la mama y el páncreas. La producción anormal de MEC y la alteración de sus propiedades físicas es frecuente en estos tipos de cáncer. En el carcinoma de mama el estroma del tumor es 10 veces más rígido que el de la mama normal, debido en parte a una acumulación excesiva de colágeno y otros componentes de la MEC. En el caso del carcinoma de pulmón, se ha descrito un mal pronóstico en pacientes que presentan un aumento de la producción de proteínas de la MEC, incluyendo fibronectina, colágeno IV y tenascina C, ya que la adhesión de las células neoplásicas a estos componentes de la matriz se asocia a la activación de vías antiapoptóticas [18]. Es decir, durante la enfermedad, la actividad de las enzimas implicadas en la remodelación de la matriz está alterada dando lugar a un microambiente caracterizado por la acumulación de componentes de la MEC y una mayor rigidez, lo cual contribuye a la progresión del tumor mediante la estimulación de vías de señalización activadas, entre otras, por integrinas.

Sin embargo, no sólo la deposición de componentes de la MEC está implicada en la progresión tumoral, también lo está su degradación. La degradación de la MEC es un paso fundamental durante la expansión local de las células tumorales, su intra y extravasación e invasión, claves para el proceso metastásico [25].

En conclusión, existe una continua biosíntesis y degradación proteolítica de la matriz y la inclinación de la balanza entre estos procesos dependerá de la activación de las células productoras de MEC y de la actividad de las proteasas de matriz [34]. Estudios realizados durante los últimos años apoyan mediante evidencias crecientes que las proteasas implicadas en la remodelación de la MEC, como las MMPs, son las principales mediadoras de las alteraciones observadas en el microambiente tumoral durante la progresión del cáncer [25].

4. LAS METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR (MMPs)

Gross y Lapiere [37] demostraron en 1962 la existencia, en la piel que recubre el rabo reabsorbido de la rana metamorfoseada, de enzimas difusibles capaces de degradar geles de colágeno fibrilar nativo. Ésta es la primera referencia de lo que actualmente se conocen como metaloproteasas de matriz, y desde entonces se han identificado más de 20 MMPs en humanos. Las MMPs pertenecen a una familia de endopeptidasas zinc dependientes conocidas por su habilidad para degradar diversos componentes de la MEC y otras proteínas no matriciales. Su actividad está estrechamente regulada y han sido implicadas en gran variedad de procesos fisiológicos, incluyendo cicatrización y reparación tisular, involución uterina y organogénesis, así como en condiciones patológicas cuando su actividad se descontrola, como desordenes inflamatorios, vasculares y autoinmunes, fibrosis y carcinogénesis [25, 38, 39]. La expresión de la gran mayoría de las MMPs es prácticamente nula en los tejidos sanos, en reposo, pero se induce rápidamente en respuesta al daño causado por traumatismos, infecciones o toxinas. Las citoquinas inflamatorias, así como diversos factores de crecimiento, son capaces de inducir la expresión y secreción de las MMPs en diversos tipos celulares [40].

4.1. Estructura de las MMPs

La clasificación de esta familia de endopeptidasas se ha ido modificando a lo largo de los años, pero generalmente, las MMPs presentes en vertebrados se denominan siguiendo una numeración correlativa, según su fecha de descripción, aunque existen para ellas nombres alternativos que hacen referencia al sustrato principal sobre el que actúan o a su ubicación. Siguiendo este criterio las MMPs se han clasificado, como se muestra en la tabla 1, en al menos 6 subgrupos: colagenasas (MMP1, MMP8, MMP13 y MMP18), gelatinasas (MMP2 y MMP9), estromelisininas (MMP3, MMP10 y MMP11), matrilisininas (MMP7 y MMP26), MMPs ancladas a membrana o MT-MMPs (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 y MMP25) y otras (MMP12, MMP19, MMP20, MMP21, MMP23, MMP27 y MMP28) [39, 41]. Las MMPs 4, 5, 6 y 22 faltan en la lista, ya que se descubrió que eran idénticas a otros miembros previamente descritos [38].

Tabla 1. Clasificación y sustratos de las MMPs

Nombre	MMP	Sustrato MEC	Sustrato no MEC
Colagenasas			
Colagenasa 1	MMP1	Colágeno I, II, III, VII, VIII y X, gelatina, fibronectina, laminina, tenascina, vitronectina	α_1 -PI, IL-1 β , proTNF α , proMMP2, proMMP9
Colagenasa 2	MMP8	Colágeno I, II, III, V, VII, VIII y X, gelatina, agrecano	α_1 -PI, α_2 -antiplasmina, angiotensina, fibrinógeno
Colagenasa 3	MMP13	Colágeno I, II, III, IV, IX, X y XIV, gelatina, agrecano, fibronectina, perlecan, tenascina	proMMP9, fibrinógeno
Colagenasa 4 (<i>Xenopus</i>)	MMP18	—	—
Gelatinasas			
Gelatinasa A	MMP2	Colágeno I, IV, V, VII, X, XI y XIV, gelatina, agrecano, fibronectina, elastina, laminina, versicano, osteonectina	α_1 -PI, IL-1 β , proTNF α , TGF β , proMMP1, proMMP9, proMMP13
Gelatinasa B	MMP9	Colágeno IV, V, VII, X y XIV, gelatina, agrecano, fibronectina, elastina, laminina, osteonectina, entactina	α_1 -PI, IL-1 β , proTNF α , angiotensina, plasminógeno
Estromelisininas			
Estromelisinina 1	MMP3	Colágeno III, IV, V, IX y X, gelatina, elastina, agrecano, fibronectina, laminina, perlecan, tenascina	α_1 -PI, IL-1 β , proTNF α , proHB-EGF, fibrinógeno/fibrina, E-cadherina, plasminógeno, proMMP1, proMMP7, proMMP8, proMMP9, proMMP13
Estromelisinina 2	MMP10	Colágeno III, IV y V, gelatina, elastina, agrecano, fibronectina, laminina	fibrinógeno/fibrina, TAFI, proMMP1, proMMP7, proMMP8, proMMP9, proMMP13
Estromelisinina 3	MMP11	Colágeno IV, gelatina, fibronectina, laminina	α_1 -PI
Matrilisininas			
Matrilisinina 1	MMP7	Colágeno I y IV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, agrecano, entactina	α_1 -PI, proTNF α , plasminógeno, Fas L, proMMP1, proMMP2, proMMP7, proMMP9
Matrilisinina 2	MMP26	Colágeno IV, gelatina, fibronectina	α_1 -PI, fibrinógeno, proMMP9
MMPs ancladas a membrana (MT-MMPs)			
MT1-MMP	MMP14	Colágeno I, II y III, gelatina, agrecano, fibronectina, perlecan, tenascina, laminina	α_1 -PI, proTNF α , fibrinógeno/fibrina, proMMP2, proMMP13
MT2-MMP	MMP15	Fibronectina, perlecan, tenascina, laminina	proTNF α , proMMP2
MT3-MMP	MMP16	Colágeno III, gelatina, fibronectina, laminina	α_1 -PI, proMMP2
MT4-MMP	MMP17	Gelatina	proTNF α , fibrinógeno/fibrina, proMMP2
MT5-MMP	MMP24	Gelatina, fibronectina	proMMP2
MT6-MMP	MMP25	Colágeno IV, gelatina, fibronectina	α_1 -PI, fibrinógeno/fibrina, proMMP2
Otras			
Metaloelastasa	MMP12	Colágeno IV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, agrecano, entactina	α_1 -PI, proTNF α , fibrinógeno/fibrina, plasminógeno

Tabla 1. Clasificación y sustratos de las MMPs (continuación)

—	MMP19	Colágeno IV, gelatina, laminina, fibronectina	fibrinógeno/fibrina
Enamelisina	MMP20	Amelogenina	—
XMMP (Xenopus)	MMP21	Gelatina	—
CA-MMP	MMP23	Gelatina	—
—	MMP27	Gelatina	—
Epilisina	MMP28	—	—

Tabla 1. Clasificación de las MMPs y su sustrato especificidad. Tabla basada en Chakraborti 2003, Visse y Nagase 2003 y Orbe 2011 [39, 41, 42].

La estructura básica de las MMPs presenta una serie de dominios comunes. Cada MMP posee un péptido señal situado en el extremo amino terminal, que se elimina en el retículo endoplásmico y que se encarga de determinar si la proteína va a ser secretada o anclada a la membrana. Inmediatamente después se encuentra el propéptido o prodominio, de unos 80 aminoácidos, que contiene el motivo “*cysteine switch*”, PRCGXPD, cuya cisteína conservada se protege con el ion zinc del dominio catalítico manteniendo a la enzima inactiva. A continuación se localiza el dominio catalítico, de en torno a 170 aminoácidos, que contiene el sitio activo altamente conservado donde se encuentra el motivo de unión al zinc, HEXGHXXGXXH. Por último, y con excepción de la MMP7, la MMP26 y la MMP23, las MMPs poseen un dominio similar a hemopexina, situado en el extremo carboxilo terminal, de unos 200 aminoácidos, que está conectado con el dominio catalítico mediante una pequeña región bisagra (figura 3) [38, 43, 44].

Determinados subgrupos de MMPs presentan otros dominios adicionales específicos. Por ejemplo, las gelatinasas (MMP2 y MMP9) poseen tres dominios fibronectina de tipo II, que están implicados en su capacidad para degradar determinados sustratos como el colágeno IV, la gelatina y la elastina. Por otro lado, y a pesar de que la mayor parte de las MMPs son secretadas como proenzimas, las MT-MMPs contienen una secuencia que las mantiene ancladas a la membrana celular. MMP14, MMP25, MMP16 y MMP24 poseen un dominio transmembrana junto a un dominio intracelular corto y MMP17 y MMP25 presentan un glucosilfosfatidilinositol (GPI) que les permite permanecer enganchadas a la membrana (figura 3). Además, estas

seis MT-MMPs, la MMP11, la MMP23 y la MMP28 contienen un dominio de reconocimiento por furina (RX[R/K]R) en el extremo carboxilo terminal del propéptido, lo que permite su activación intracelular [38, 41].

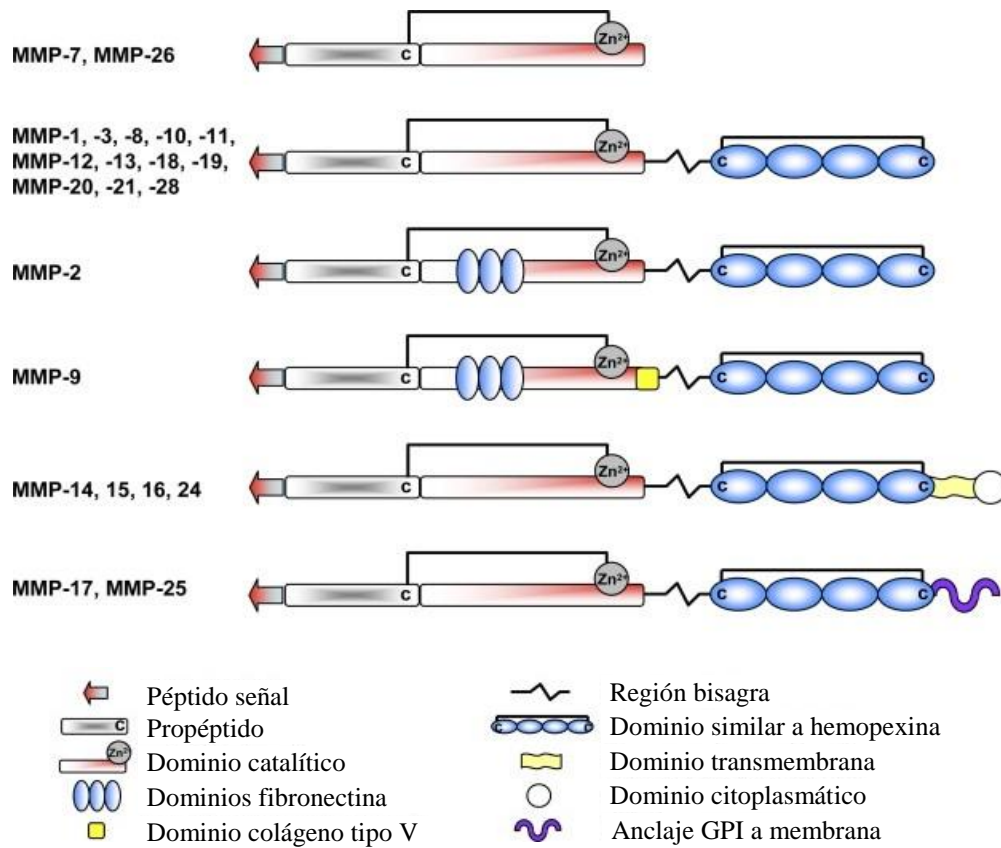


Figura 3. Estructura de las MMPs. Organización de los dominios de las diferentes MMPs descritas en mamíferos. Adaptado de Hemman y cols. 2007 [43].

4.2. Regulación de las MMPs

Debido a su importante implicación en multitud de procesos fisiológicos, en los cuales las MMPs actúan como interruptor dual promoviendo o inhibiendo determinadas reacciones, su actividad está estrictamente regulada a diferentes niveles, incluyendo la transcripción génica, la activación del zimógeno y la inhibición de la enzima activa. La desregulación de las MMPs y sus inhibidores ha sido relacionada con la fibrosis hepática y el carcinoma hepatocelular entre otros [45].

4.2.1. Regulación a nivel transcripcional

Los niveles de expresión génica de la mayoría de las MMPs son bajos en el tejido sano, pero se inducen cuando el remodelado de la matriz es requerido. La expresión de estas enzimas es principalmente regulada a nivel transcripcional y es inducida por múltiples factores extracelulares como citoquinas, factores de crecimiento y las interacciones con las células adyacentes y la MEC. Se han descrito diversos elementos reguladores en la región promotora de los genes de las MMPs, entre ellos se encuentran el elemento de respuesta al factor de transcripción proteína activadora 1 (AP-1), a la proteína de unión A 3 del estimulador del poliovirus (PEA3), al NFκB y al elemento inhibidor TGFβ (TIE), que suelen actuar de forma cooperativa. Los complejos AP-1 son heterodímeros formados por proteínas de las familias de proto-oncogenes JUN y FOS y diversas vías de señalización mediadas por factores de crecimiento y citoquinas convergen en el elemento de respuesta a AP-1, presente en la región promotora del gen de la gran mayoría de las MMPs inducibles [39, 46, 47]. Por ejemplo, se ha observado que las citoquinas TNFα e IL-1 dan lugar a la inducción transcripcional de la MMP1 y la MMP3 mediante la activación transcripcional de *c-Jun* y la transactivación de uno de los sitios AP-1 de la región promotora de estas proteasas. Además, se ha observado que el elemento de respuesta a AP-1 juega un papel importante en la represión de la expresión de las MMPs mediada por el TGFβ, los retinoides y las hormonas glucocorticoideas [47]. Por otro lado, también se ha descrito el efecto de mecanismos epigenéticos y de procesos relacionados con la estabilidad del ARN mensajero en el control de la expresión de las MMPs [48-50].

4.2.2. Activación de las proMMPs

Como ya se ha mencionado, la mayor parte de las MMPs son secretadas como proenzimas o zimógenos, que generalmente pasan a su conformación activa en el exterior celular. El grupo SH del residuo cisteína del prodominio interacciona con el ion zinc del sitio activo impidiendo que cumpla su función catalítica. Mediante la eliminación proteolítica del prodominio se produce la ruptura de la interacción Cys-Zn²⁺, lo que permite la unión de una molécula de agua al zinc y la consiguiente activación de la proteasa. La modificación química de la cisteína del prodominio por ROS, SDS, pH o calor, entre otros, también puede provocar la liberación del átomo de

zinc del sitio activo de la MMP y, por tanto, favorecer la activación enzimática [38, 41, 51]. Se ha descrito que la serina proteasa plasmina es capaz de activar una gran cantidad de proMMPs, entre las que se encuentran proMMP1, proMMP3, proMMP7, proMMP9, proMMP10 y proMMP13, y las MMPs activas, a su vez, pueden procesar otras proMMPs, provocando su activación [41].

Sin embargo, algunas MMPs, como las MT-MMPs, la MMP11, la MMP23 y la MMP28, pueden ser activadas intracelularmente gracias a su secuencia de reconocimiento por furinas [41, 44].

4.2.3. Inhibición de las MMPs

La actividad de las MMPs está también regulada por una serie de inhibidores endógenos naturales. La función proteolítica de las MMPs *in vivo* dependerá, por tanto, del balance local de las enzimas activas y sus inhibidores fisiológicos, entre los que destacan los TIMPs. Los TIMPs son inhibidores específicos que se unen a las MMPs en una relación estequiométrica 1:1 [51]. Hasta la fecha se han descrito cuatro TIMPs en vertebrados, TIMP1, TIMP2, TIMP3 y TIMP4. Todas las MMPs pueden ser inhibidas por al menos uno de los TIMPs, aunque, cabe destacar, que la fuerza de la unión y por tanto la magnitud de la inhibición dependerá de cada MMP en particular [43].

También existen inhibidores más generales de proteasas como la α_2 -macroglobulina, el α_1 -inhibidor de proteasa y la α_1 -quimiotripsina, que son capaces de unirse al sitio activo de las MMPs. El complejo inhibidor-MMP resultante es rápidamente eliminado por endocitosis mediada por receptor [38, 51].

La interacción altamente controlada de las MMPs y sus inhibidores es responsable del constante recambio de la matriz hepática y del mantenimiento de la homeostasis y la arquitectura del hígado sano [43].

4.3. MMPs en la respuesta hepática al daño y la regeneración

La sobre-expresión de múltiples MMPs ha sido demostrada en el hígado durante la regeneración [43, 45, 52]. Como ya se ha comentado en el apartado 3.1 (El remodelado de la MEC en la regeneración hepática), las MMPs y sus inhibidores son claves en el recambio y remodelado de la MEC, al igual que en el procesamiento y activación de

factores de crecimiento y citoquinas, siendo todo ello de suma importancia durante el proceso de la regeneración hepática [29]. En el hígado sano normal, la expresión basal de las MMPs y los TIMPs es normalmente baja, pero, tras un daño hepático agudo, la expresión de estas enzimas es inducida siguiendo un patrón temporal distinto en cada caso [43, 52]. Determinadas citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento profundamente implicados en las reacciones de reparación tisular, como el TNF α , el TGF β y los ligandos del EGFR, han sido identificados como importantes reguladores de la expresión de MMPs y TIMPs en las células hepáticas [52, 53]. Las células estelares y otras células implicadas en el proceso fibrótico, como los macrófagos, secretan un repertorio de MMPs capaces de degradar el colágeno y otras moléculas de la matriz. Las MMPs se expresan, incluso, en el hígado cirrótico, pero su actividad es regulada por los potentes inhibidores TIMPs [54]. Durante el daño crónico del tejido hepático, las células estelares se activan e incrementan su expresión de los TIMPs, dando lugar a la inhibición de la actividad MMP y a la consiguiente acumulación de proteínas de la matriz en el espacio extracelular [43].

A pesar de la aparición de profundos cambios en la expresión y actividad hepática de MMPs y TIMPs durante la respuesta hepática al daño [52], poco se sabe sobre la función de MMPs concretas en este proceso. Entre las mejor caracterizadas se encuentran la MMP13 (la colagenasa intersticial en roedores) y la MMP9, cuyos papeles han podido ser analizados gracias a los estudios en ratones deficientes para estas proteasas [29, 40, 55, 56]. Al compararlos con ratones normales, los ratones deficientes para la MMP9 que han sido sometidos a una HP del 70% muestran un retraso en la respuesta regenerativa. La proMMP9 se activa rápidamente tras la HP, pudiendo contribuir a la proliferación hepatocitaria mediante la modificación del entrono matricial en el hígado remanente. Además, la MMP9 parece estar implicada en la inducción del HGF tras la HP [29]. El efecto del HGF sobre la síntesis del ADN en los hepatocitos *in vivo* se ve potenciado cuando el hígado es pretratado con colagenasa, sugiriendo que el remodelado de la matriz en estadios iniciales de la regeneración puede jugar un papel en el *priming* de los hepatocitos [29, 45]. La implicación de la MMP9 en la regeneración hepática también ha sido confirmada en modelos de daño hepático agudo causado por la administración de CCl₄ [40, 43]. Igualmente, el uso de ratones deficientes para la MMP13 ha permitido describir el papel de esta proteasa en la resolución de la fibrosis en modelos de daño colestásico y daño agudo inducido por CCl₄ [55, 56].

4.4. MMPs en la carcinogénesis hepática

Cada vez más estudios apoyan el papel de las MMPs como importantes moduladoras del microambiente tumoral. El desarrollo del tumor requiere de la reorganización del tejido hepático y de la ruptura de las barreras preexistentes en el mismo, proceso principalmente regulado por las MMPs y los TIMPs. Al menos cuatro características del cáncer, incluyendo la migración, la invasión, la vasculogénesis y la metástasis, son dependientes del microambiente matricial que rodea a la lesión tumoral. Las MMPs son claves en estos procesos, y sus funciones se extienden más allá del simple remodelado de la MEC, siendo capaces de procesar moléculas implicadas en la adhesión celular, modulando las interacciones célula-célula y célula-MEC y afectando incluso a la supervivencia de las células tumorales [18, 25, 51]. La expresión de algunas MMPs, como la MMP1, la MMP2, la MMP3 y la MMP9, está incrementada en los tejidos humanos de HCC [57, 58], y además, estudios mecanísticos *in vitro* han demostrado que varias de estas metaloproteasas pueden contribuir a la migración e invasión de las células de HCC [59, 60]. Aunque, como se ha comentado en el apartado anterior, la expresión de diversas MMPs ha sido observada en modelos experimentales de daño hepático agudo y crónico, y la contribución a la respuesta hepática de la MMP9 y la MMP13 durante el daño y la regeneración ha sido descrita en los correspondientes modelos de ratones deficientes [29, 55, 56], no abundan los estudios experimentales *in vivo* que analicen el papel de MMPs concretas en la hepatocarcinogénesis.

La expresión y el papel de las MMPs y sus inhibidores son diversos durante el desarrollo tumoral. Estudios reciente han demostrado que los miembros de la familia MMP ejercen diferentes funciones en los diferentes estadios de la progresión del cáncer. En particular, pueden tanto promover como inhibir el desarrollo del tumor dependiendo de factores como la localización y el estadio tumoral, la localización enzimática y el perfil de sustratos disponible [25]. Las MMPs están implicadas en múltiples pasos del desarrollo tumoral y pueden favorecer su progresión promoviendo el crecimiento de las células cancerosas, la migración e invasión de las mismas, el proceso metastásico, la angiogénesis y la resistencia a la apoptosis mediante el procesamiento proteolítico de diversos sustratos involucrados en estos procesos, entre los que se encuentran componentes estructurales de la MEC, factores de crecimiento, receptores tirosina quinasa, moléculas de adhesión celular y otras proteinasas [44]. Sin embargo, siguiendo su ya mencionado comportamiento dual, también pueden inhibir dichos procesos

ejerciendo un efecto antitumoral. Por ejemplo, el procesamiento del proHB-EGF, por miembros de la familia de las metaloproteasas, da lugar a la forma madura y activa de este ligando del EGFR, promoviendo la supervivencia celular [61]. Del mismo modo, la eliminación de las barreras físicas al degradar la MEC adyacente y la generación de factores proangiogénicos por las MMPs fomentan la generación de una red de irrigación y el crecimiento del tumor. No obstante, las MMPs también pueden inhibir el desarrollo tumoral mediante la generación de moléculas angioestáticas como la endostatina y la angiotensina y la promoción de la apoptosis mediante la generación de cambios en determinados componentes de la MEC, como es el caso de la laminina y su influencia en la señalización por integrinas, y la escisión de la cadherina E [25, 44].

Debido a la importancia de las funciones llevadas a cabo por las MMPs durante el desarrollo tumoral, han sido consideradas como posibles dianas terapéuticas. Sin embargo, teniendo en cuenta el papel dual y la faceta antitumoral de estas enzimas en determinadas situaciones de desarrollo del cáncer [25], no resulta sorprendente el hecho de que los ensayos clínicos iniciales utilizando inhibidores de amplio espectro para las MMPs resultaran en fracaso [62]. El reto actual consiste en distinguir el papel concreto que juega cada MMP en cada caso, obteniendo la información necesaria para la generación de inhibidores más específicos y eficaces.

5. MMP10: FUNCIONES BIOLÓGICAS Y REGULACIÓN

Dentro de la familia de las MMPs, la MMP10, también llamada estromelina 2, presenta un amplio espectro de sustratos *in vitro* (tabla 1) y además de tener la capacidad de procesar una amplia gama de componentes de la MEC, ha resultado ser capaz de activar otras MMPs como las proMMP1, 7, 8, 9 y 13 [63, 64]. La MMP10 es secretada como una proenzima de 53 kDa y es activada a su forma madura de 47 kDa [46] por otras proteasas como la plasmina [65]. Esta MMP presenta un 82% de homología en la secuencia de aminoácidos con su compañera de grupo, la estromelina 1 o MMP3, además de compartir una gran similitud en su estructura y especificidad de sustratos *in vitro* (tabla 1) [66, 67]. Sin embargo, ambas estromelinas muestran patrones diferentes de regulación transcripcional y de distribución tisular, que apuntan a la ejecución de funciones fisiológicas distintas en procesos tales como el desarrollo del esqueleto óseo [66], la cicatrización cutánea [68, 69] y el remodelado vascular [63, 70].

Aparte de las diferencias espacio-temporales en sus patrones de expresión, un estudio reciente demostró analizando la constante de inhibición del TIMP1 y del TIMP2 para las estromelisininas, MMP3 y MMP10, que la fuerza con la que inhiben los TIMPs a la MMP3 es mayor. Por tanto, a pesar de que la homología en la secuencia del dominio catalítico para estas enzimas es la más elevada entre las MMPs, la MMP3 y la MMP10 difieren en la fuerza con la que se unen a sus inhibidores tejido-específicos [71], lo que afectará a la capacidad de ejercer sus diferentes funciones.

La MMP10 ha sido detectada en diversos carcinomas y se ha sugerido su implicación en el proceso de cicatrización de diferentes tejidos [63, 72, 73]. En concreto, ha demostrado llevar a cabo funciones importantes en la migración celular de los queratinocitos y en el proceso de cicatrización normal de la piel, donde su expresión ha sido detectada en el extremo del epitelio en migración. Un patrón similar fue descrito en el tejido intestinal dañado, en el que la MMP10 fue localizada en los enterocitos en migración [72], y cuya inducción en colon en respuesta al daño ha sido implicada en la resolución del mismo [73]. Además, recientemente, se ha descrito que durante la reparación tisular, la MMP10 derivada de los macrófagos promueve la resolución del tejido cicatricial, favoreciendo la actividad colagenolítica de los mismos mediante la inducción de la expresión de la MMP13 [74]. Aún así, aparte de la mención de la inducción de la expresión del ARN mensajero de la MMP10 durante el daño agudo en el hígado de rata [52], se desconocía la potencial implicación de esta MMP en la reparación del tejido hepático. Curiosamente, un estudio reciente ha descrito que la MMP10 presenta un efecto profibrinolítico *in vivo*, potenciando la actividad fibrinolítica del activador tisular del plasminógeno y siendo capaz de proteolizar al inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) [42]. Estas observaciones, junto al conocimiento de la importancia del sistema del plasminógeno en la reparación del tejido hepático [28, 33, 34, 75, 76], nos instaron a evaluar el papel de la MMP10 en la respuesta hepática al daño y la regeneración. Por añadidura, diversos factores de crecimiento y citoquinas implicados en el proceso de regeneración hepática como el EGF, el TGF β y el TNF α han demostrado ser capaces de inducir la expresión de la MMP10 en diversas líneas celulares [65, 77, 78].

En relación con la regulación de la expresión génica de la MMP10, un estudio reciente demostró que la inducción de esta MMP por la trombina era mediada por las vías de señalización ERK1/2 y quinasa c-Jun del extremo N-terminal (JNK). En este

contexto, los autores vieron que el elemento de respuesta a AP-1 localizado en la región proximal del promotor de la MMP10, en torno a la posición -65 (figura 4), era esencial para la transactivación de éste [79]. En la región promotora del gen de la MMP10 encontramos también otros elementos reguladores como elementos de respuesta a PEA3 y otro sitio de unión al complejo AP-1 [46] (figura 4).

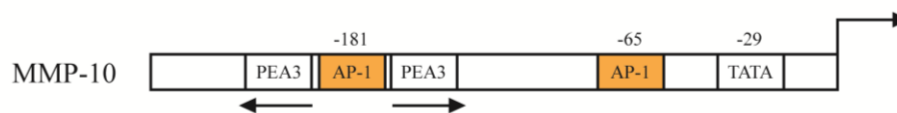


Figura 4. Estructura del promotor de la MMP10. Adaptado de Westermarck y cols. 1999 [46].

Por otro lado, así como la controlada sobre-expresión de la MMP10 en los queratinocitos ha sido implicada en la cicatrización de la piel, su excesiva expresión en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello está correlacionada con el proceso de metástasis y la invasibilidad de sus células cancerosas [80]. Las evidencias indican que la activación crónica y desregulada de los mecanismos biológicos involucrados en la reparación tisular acaba contribuyendo a la degeneración del órgano y a la progresión de la enfermedad, incluyendo el desarrollo del cáncer. Esto es especialmente evidente en el hígado, donde la respuesta inflamatoria y fibrogénica, procesos esenciales para la regeneración y la reparación parenquimal, terminan derivando en la hepatocarcinogénesis [61, 81]. Como ya se ha mencionado, la expresión de la MMP10 se ve incrementada durante el daño hepático [52], así como también lo está en muestras de tejido humano de HCC [82]. A pesar de ello, la potencial implicación de esta proteasa en la hepatocarcinogénesis no ha sido totalmente aclarada.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El hígado presenta una extraordinaria capacidad de regeneración tras la pérdida de tejido parenquimal. Uno de los componentes esenciales de la respuesta regenerativa es el remodelado de la MEC, proceso llevado a cabo, principalmente, por proteasas entre las que se encuentran las MMPs. El remodelado de la MEC, además de ser parte de la reacción desencadenada para recuperar la arquitectura hepática funcional durante la respuesta daño-regeneración, es un proceso implicado en la progresión del carcinoma hepatocelular.

Diversas características del desarrollo del cáncer, incluyendo la migración, la invasión, la vasculogénesis y la metástasis, son dependientes del microambiente matricial que rodea a la lesión tumoral y las MMPs son claves en su regulación. No obstante, sus funciones se extienden más allá del simple remodelado de la MEC, siendo capaces de procesar y activar factores de crecimiento y moléculas implicadas en la adhesión celular, modulando las interacciones célula-célula y célula-MEC y afectando incluso a la supervivencia de las células tumorales.

Observaciones puntuales previas realizadas en modelos de daño hepático agudo y muestras de HCC humano indican que la expresión de la MMP10, o estromelisin 2, es baja en el hígado sano pero se induce marcadamente durante la respuesta a la lesión y en los tejidos tumorales. El papel de la MMP10 en estas circunstancias fisiopatológicas no es conocido.

OBJETIVOS

1. Caracterizar la regulación de la expresión génica y la función de la MMP10 en la respuesta hepática al daño agudo y crónico y durante el proceso de regeneración hepática.
2. Evaluar la contribución de la MMP10 a la carcinogénesis hepática, los mecanismos que regulan su expresión en células de HCC y su potencial actividad pro-tumorigénica.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Muestras de hígados humanos

Todas las muestras de tejido hepático humano utilizadas en este proyecto se recogieron con el consentimiento informado de los pacientes y se codificaron para su uso.

Como ha sido descrito anteriormente [83], las muestras humanas de hígado cirrótico y con carcinoma hepatocelular se obtuvieron en pacientes sometidos a hepatectomía parcial o trasplante hepático y las muestras de hígado sano fueron recogidas durante operaciones de tumores digestivos o mediante biopsias percutáneas de hígado en pacientes que presentaban hígado normal o con cambios mínimos.

Las muestras hepáticas fueron congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente después de su obtención para su posterior procesamiento. Los protocolos de estudio para el manejo de dichas muestras fueron aprobados por los Comités éticos de la Universidad de Navarra (076/2003) (Pamplona, España), la Universidad Campus Bio-Médico (Roma, Italia), el Hospital Universitario San Carlos (Madrid, España) y el Biobanco Nacional Francés del Cáncer.

1.2. Animales

Los animales empleados para la experimentación fueron ratones de fondo genético C57BL/6. Se utilizó la cepa salvaje, WT y ratones deficientes en MMP10, MMP10^{-/-}, cedidos por el Dr Willian C. Parks (Centre for Lung Biology, University of Washington). También se emplearon ratones inmunodeprimidos Athymic Balb/c-Nude-Foxn1^{mu} para un modelo de xenoinjerto. Todos los animales se mantuvieron en el animalario del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) en condiciones adecuadas de estabulación, con alimentación y agua *ad libitum*.

Los protocolos de experimentación animal fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Navarra (Protocolos 025/10, 178/12 y 58/13).

1.3. Líneas celulares

La línea celular derivada de carcinoma hepatocelular humano Huh7 se obtuvo de la *Japanese Collection of Research Bioresources* (JCRB) manteniéndose en cultivo en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) y con 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (P/S).

La línea de colangiocarcinoma humano Huh28 fue adquirida del Health Science Research Resources Bank (HSRRB, Tokio, Japón) y se mantuvo en cultivo en medio RPMI suplementado con 10% de FBS y 1% P/S.

Los colangiocitos normales de ratón (NMC) y las células de Kupffer de ratón fueron aisladas y mantenidas en cultivo como se ha descrito anteriormente [10, 53].

La línea celular no transformada de hepatocito de ratón AML12 y las células de ratón monocito/macrófago RAW 264.7, ambas de la *American Type Culture Collection* (ATCC), fueron cultivadas respectivamente en DMEM/F12 suplementado con un 1% de insulina-transferrina-selenio (ITS), 40 ng/mL dexametasona, 10% FBS y 1% P/S y en DMEM suplementado con 10% FBS y 1% P/S.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en incubadores con filtro Hepa a 37°C en una atmósfera con un 95% de humedad y una proporción de O₂ del 21% y de CO₂ del 5%. Paralelamente, en los experimentos que requerían condiciones de hipoxia, las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera con un 90% de humedad y una proporción de O₂ del 1%, de CO₂ del 5% y de N₂ del 94%, en una cámara de hipoxia H35 hypostation de Don Whitley (West Yorkshire, Reino Unido).

Los medios de cultivo, la tripsina, el FBS, los antibióticos y la insulina utilizados en el cultivo celular proceden de Gibco/Invitrogen (Paisley, Reino Unido) y la dexametasona de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). El tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS) es de Lonza (Verviers, Bélgica). El material de cultivo utilizado (placas, pipetas, rascadores y falcons) se adquirió de Costar/Corning (Corning, NY, EEUU) y Sarstedt (Newton, NC, EEUU).

1.4. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados se detallan en la tabla 2:

Tabla 2. Tabla de anticuerpos

Anticuerpo	Método	Casa comercial	Referencia
BrdU	IHQ	Amersham	RPN202
CD31	IHQ	R&D Systems	AF3628
CXCR4	WB (1°)/IHQ	Abcam	ab2074
CXCR4	IHQ	Abnova	H00007852
Fibrinogen	IHQ	Dako	A0080
Fibrinogen gamma chain	WB (1°)	Abcam	ab62527
Fibronectin	WB (1°)/IHQ	Abcam	ab23751
fibronectin (EP5)	WB (1°)	Santa Cruz	sc-8422
GAPDH	WB (1°)	Cell Signaling	2118S
c-Jun (N)	ChIP	Santa Cruz	sc-45
Ki67	IHQ	Thermo Scientific	RM9106
MMP10	IHQ	Abcam	ab38930
MMP10	WB (1°)/IHQ	Acris	AP07210PU-N
MMP10	WB (1°)	R&D Systems	MAB9101
α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)	WB (1°)	Sigma Aldrich	A2547
anti-IgG goat-HRP	WB (2°)	Santa Cruz	sc-2020
anti-IgG mouse-HRP	WB (2°)	Sigma Aldrich	A0168
anti-IgG rabbit-HRP	WB (2°)	Sigma Aldrich	A0545
IgG rabbit	ChIP	Santa Cruz	sc-2025

Tabla 2. Tabla de los anticuerpos utilizados. WB: *western blot*.

1.5. Plásmidos y oligonucleótidos

El plásmido utilizado para el clonaje de la MMP10 y la generación de células establemente transfectadas fue el pcDNA6/V5-HisB obtenido de Invitrogen, mientras que el vector pGL3 Basic de Promega, que lleva luciferasa como gen reportero, fue el elegido para las transfecciones transitorias con el promotor de la MMP10.

Para el estudio de la expresión del gen codificante de la MMP10, así como de otros genes analizados, se diseñaron cebadores específicos para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. La secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados se muestra en la tabla 3:

Tabla 3. Tabla de cebadores

Nombre del gen	Cebador SE (5'-3')	Cebador AS (5'-3')
Actina	CGCGTCCACCCGAG	CCTGGTGCCTAGGGCG
Afp	GCCATGAAGTGGATCACACC	CTCCTCGGTGGCTTCCGGAA
ANKRD1	CGAGAGGCAGAGCTCAAAAA	GGGCTCCAGCTTCCATTAAC
AR	CTGCTGGTCTTAGGCTCAGG	CCAGGTTCTCGATGTATCTGC
CXCR4	ATCTTCCTGCCACCATCTA	TAGCGGTCCAGACTGATGAA
EGF	CCCTGGATCCTATTACTGCAC	GAAAGCAATCACATTCCCAGG
Ereg	ACAAAGTGTAGCTCTGACATG	CGATTTCTGTACCATCTGCAG
HB-EGF	ATGAAGCTGCTGCCGTCGGTG	TGGATGCAGTAGTCCTTGTATTTT
Histona 3A	AAAGCCGCTCGCAAGAGTGCG	ACTTGCCTCCTGCAAAGCAC
MCP1	CCACTCACCTGCTGCTACTC	TTCACATTCAAAGGTGCTGAAG
MMP10 (humano)	GCTCTGCCTATCCTCTGAGTG	CAACGTCAGGAACTCCACACC
Mmp10 (ratón)	CCTGTGTTGTCTGTCTCTCCAAGA	CGTGCTGACTGAATCAAAGGAC
MMP10prom (ChIP)	TTAAATGTTTGTGAACATTCAGACTT	TACCCCTAGTGGCCTTTCT
MMP3	GGAAATCAGTTCTGGGCTATACGA	TAGAAATGGCAGCATCGATCTTC
MMP13	CCTGATGTGGGTGAATACAATG	GGTTTCATCATCATCAAATGG
TNF α	GAGTGACAAGCCTGTAGCCC	CCCTTCTCCAGCTGGAAGAC
MMP10 (Clonaje)	SE : GGTACCATGATGCATCTTGCATTCCTTGTGC AS : GAATTCGATGGATGCCTCTTGGATAACCTGC	
MMP10 (Promotor)	SE : GAGCTCTCGTATGGCAGCACAGTAGG AS : CTCGAGACAGCACAAAGGAATGCAAGA	
MMP10 (mutagénesis)	SE : AGACTTAAAAAACACATGCAGGAACCATACTGTTGGTGTATCTCAGCA AS : TGCTGAGATCACCAACAGTATGGTTCCTGCATGTGTTTTTAAAGTCT	

Tabla 3. Tabla de los cebadores utilizados y sus secuencias.

1.6. Reactivos generales

Los reactivos químicos mencionados a lo largo de la presente tesis (sales, ácidos, tampones, etc.) son de grado analítico y fueron suministrados por Sigma Aldrich, Calbiochem, Merck Millipore (Darmstadt, Alemania), GE Healthcare y Scharlau (Barcelona, España).

En cuanto a los reactivos para la electroforesis de proteínas son de BioRad Laboratories (Hercules, CA, EEUU), así como el reactivo de Bradford y los marcadores preteñidos de peso molecular.

La procedencia de otros productos de uso específico se detalla más adelante en el apartado Métodos, a la vez que se especifica su utilización.

2. MÉTODOS

2.1. Modelos animales

Los siguientes modelos experimentales fueron realizados en ratones de fondo genético C57BL/6 de 8-10 semanas de edad tanto de la cepa salvaje (WT) como de la deficiente en MMP10 (MMP10^{-/-}). También utilizamos ratones inmunodeprimidos de fondo genético Athymic Balb/c-Nude-Foxn1^{nu} para el modelo de xenoinjerto. Una vez transcurrido el tiempo de los tratamientos, los ratones fueron anestesiados con *IsoFlo*[®] (Abbott, IL, EEUU) y sacrificados por dislocación cervical. Previo a su sacrificio se les extrajo sangre del plexo retroorbital. El tejido hepático fue congelado en nitrógeno líquido o fijado en paraformaldehído para su posterior inclusión en parafina.

2.1.1. Hepatectomía parcial (HP)

Se realizaron operaciones de hepatectomía parcial del 70%, seccionando dos tercios de la masa hepática utilizando el protocolo ya descrito [10, 14]. Brevemente, una incisión transversal subxifoidea fue realizada para permitir la extrusión y ligación extra abdominal de los lóbulos hepáticos lateral izquierdo y medio, que fueron a continuación quirúrgicamente retirados juntos. El grupo control "sham" fue sometido al mismo proceso quirúrgico sin eliminación de la masa hepática.

Los animales fueron sacrificados a las 1, 3, 6, 12, 24, 36, 44, 48, 72, 96 y 168 horas tras la HP. Tras el sacrificio se registró el peso del hígado y del animal para la posterior determinación del crecimiento hepático relativo tras la pérdida de masa.

Para realizar el estudio de síntesis de ADN tras la HP, una hora antes del sacrificio los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 50 mg de 5'-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Sigma) por Kg de peso corporal.

2.1.2. Daño hepático agudo inducido por CCl₄

El modelo de daño hepático agudo fue realizado mediante la administración intraperitoneal de 1 µl de tetracloruro de carbono (CCl₄) por gramo de peso corporal de ratón. El CCl₄ (Sigma) fue disuelto en aceite de oliva (Sigma) en una proporción 1:3 hasta un volumen final aproximado de 100 µl. Los ratones control recibieron un

volumen equivalente de aceite oliva mediante inyección intraperitoneal. Los animales fueron sacrificados a las 24, 48 y 72 horas tras el tratamiento.

2.1.3. Daño hepático asociado a colestasis: ligadura del conducto biliar (BDL)

La ligadura del conducto biliar (BDL) fue realizada según el protocolo previamente descrito [84] para causar daño hepático asociado a colestasis. En resumen, se realizó una incisión en la cavidad peritoneal y el conducto biliar fue expuesto, ligado en dos puntos con hilo de sutura y seccionado entre las dos ligaduras. Los controles “sham” fueron sometidos a la incisión y exposición del conducto biliar que no fue ligado. El sacrificio se realizó a los 3, 7, 14 y 21 días tras la BDL.

2.1.4. Hepatocarcinogénesis inducida por dietilnitrosamina (DEN)

El modelo de hepatocarcinogénesis fue generado mediante la inyección intraperitoneal de 25 mg de dietilnitrosamina (DEN) (Sigma) por kg de ratón de 14 días de edad. Los ratones fueron sacrificados a los 5, 8 y 11 meses tras la inyección del carcinógeno.

Además del tejido hepático, se recogieron los pulmones (nitrógeno líquido o fijación en paraformaldehído para su posterior inclusión en parafina) para analizar el proceso de metástasis. Tanto los hígados como los pulmones fueron analizados macroscópicamente tras su extracción y los tumores visibles fueron cuantificados y medidos con un calibre de Vernier.

2.1.5. Xenoinjerto subcutáneo de células de HCC humanas

En este modelo de xenoinjerto tumoral, se inyectaron subcutáneamente $5 \cdot 10^6$ células de la línea humana Huh7 en PBS en un volumen final de 150 μ l. La inyección fue realizada en el tejido subcutáneo de la zona dorsal inferior de ratones inmunodeprimidos de unas 9 semanas de edad. Los tumores generados fueron extirpados, previo sacrificio de los ratones, un mes tras la inyección subcutánea de las células tumorales humanas.

2.2. Análisis de los niveles séricos de transaminasas

Para el análisis de los niveles séricos de transaminasas, la sangre extraída a los ratones de los diferentes modelos experimentales fue conservada a 4°C durante toda la noche para permitir la completa formación del coágulo sanguíneo. Las muestras de sangre coagulada se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C para obtener el suero en forma de sobrenadante. El suero fue recuperado y conservado a -20°C. La determinación de las transaminasas, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), fue realizada en el analizador *Cobas Hitachi c311 Analyzer* (Roche).

2.3. Extracción de ARN y retrotranscripción

El ácido ribonucleico (ARN) total de las células y tejidos fue aislado tras su homogeneización con el reactivo *TriReagent* (Sigma Aldrich), procedimiento basado en el método de Chomczynsky y Sacchi [85], o mediante el kit *LEV Simply RNA Cells and Tissue kit* utilizando el equipo Maxwell[®] 16 de Promega. La concentración y la calidad del ARN fueron evaluadas mediante la lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

Para la retrotranscripción de las muestras extraídas con el reactivo *TriReagent* se partió de 2 µg de ARN y mediante el tratamiento con la enzima DNasa I (Invitrogen) durante 20 minutos a 37°C, se eliminaron los posibles restos de ADN genómico. A continuación, las muestras fueron desnaturalizadas durante 1 minuto a 90°C y se procedió a la retrotranscripción. La retrotranscripción del ARN a ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario (ADNc) tuvo lugar durante 1 hora a 37°C utilizando una mezcla que contenía (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl y 3 mM MgCl₂), 10 ng/µl de cebadores aleatorios, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (0,5 mM cada uno), 5 mM de ditioneitol (DTT), 1,2 U/µl de inhibidores de RNasa (*RNase out*) y 6 U/µl de la enzima transcriptasa inversa M-MLV. Todos los reactivos eran de Invitrogen excepto los cebadores aleatorios y los nucleótidos que eran de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). El ADNc obtenido mediante este método fue purificado en columnas *Spin Columns* de Centriscp (Princeton Separations, Adelphia, NJ, EEUU).

El sistema de extracción de Promega ya realiza el tratamiento con DNasa por lo que la retrotranscripción no requirió de dicho paso. Para estas muestras se utilizó el kit *iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* de BioRad siguiendo las indicaciones del fabricante y partiendo de 2 µg de ARN. La retrotranscripción fue realizada en un volumen de 20 µl a 42°C durante 30 minutos y posteriormente fue inactivada durante 5 minutos a 85°C. Para mantener la misma concentración de ADNc que en el protocolo anterior, se añadieron 20 µl de agua libre de nucleasas a cada reacción. Todos los ADNcs obtenidos se conservaron a -20°C.

2.4. Expresión génica (PCR a tiempo real)

Las diferencias de expresión génica se analizaron mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real en el termociclador CFX-96 *Real-Time System* de BioRad. El reactivo *iQ SYBR Green Supermix* de la misma casa comercial fue utilizado para las reacciones. La especificidad de los productos amplificados se verificó mediante el análisis de la curva de disociación o *melting*. Para asegurar en cada PCR la especificidad de la cuantificación, la emisión de fluorescencia se midió a la temperatura más alta posible antes del inicio de la curva de disociación.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes, variando para cada gen en estudio (descritos en la tabla 3) las temperaturas de hibridación y de lectura de la fluorescencia.

Desnaturalización inicial:	95°C, 3 min	
Desnaturalización en cada ciclo:	95°C, 30 seg	} 45 ciclos
Hibridación:	X°C, 15 seg	
Extensión:	72°C, 25 seg	
Lectura:	X°C, 10 seg	
Curva de <i>melting</i> :	de 70°C a 99.5°C en intervalos de 0.5°C (60x)	

La cuantificación de la expresión de los ARNs mensajeros (ARNm) en estudio, fue calculada utilizando un gen control de expresión constitutiva, que en la mayoría de los

casos fue, la β -actina o, excepcionalmente, la histona H3. Para ello, se empleó la siguiente fórmula:

$$2^{\Delta CT} = 2^{(CT \text{ gen control} - CT \text{ gen en estudio})}$$

2.5. Inmunodetección de proteínas (western-blot)

2.5.1. Extracción de proteínas y cuantificación

La extracción de proteínas solubles de tejido hepático fue realizada a partir de, aproximadamente, 50 mg de hígado homogeneizado en RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 0,5% deoxicolato sódico) conteniendo una mezcla de inhibidores de fosfatasas (ortovanadato sódico 1mM, fluoruro sódico 10 mM y β -glicerofosfato 100 mM, de Sigma) y el cóctel de inhibidores de proteasas *Complete* de Roche. Para el análisis de los fragmentos de fibronectina, el homogeneizado se realizó en un tampón de urea (urea 7 M, tiourea 1,97 M, CHAPS 65 mM y DTT 6 mg/ml). En ambos casos, las muestras se ultracentrifugaron a 4°C durante 45 minutos a 75000 rpm en una *Optima TLX Ultracentrifuge* de Beckman (CA, EEUU). Los sobrenadantes fueron recogidos y la concentración de proteínas cuantificada respecto a una curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA) mediante el método de Biuret (kit del ácido bicinonínico (BCA) de Sigma) o en el caso del tampón de urea, mediante el método de Bradford (BioRad).

En los ensayos *in vitro*, la extracción de proteínas se realizó rascando las células en DPBS frío y centrifugándolas a 4500 rpm durante 5 minutos en una centrífuga refrigerada. Tras eliminar el DPBS, el pellet celular fue resuspendido, dependiendo de su tamaño, en un volumen de entre 40-80 μ l de RIPA conteniendo la mezcla de inhibidores de fosfatasas y el cóctel de inhibidores de proteasas de Roche. Las muestras fueron sonicadas durante 30 segundos a intensidad media en el sonicador o biorruptor de Diagenode (Liège, Bélgica) y centrifugadas durante 15 minutos a 13000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes fueron recogidos. La cuantificación de la concentración de proteínas fue realizada mediante BCA.

Los lisados proteicos fueron guardados a -80°C y se prepararon para la electroforesis mezclando 30-60 μ g de proteína con tampón de carga (50 mM Tris pH 6,8, 100 mM β -

mercaptoetanol, 2% SDS, 10% glicerol, 0,01% azul de bromofenol) y RIPA o urea para igualar los volúmenes a cargar.

La extracción de proteínas insolubles de tejido hepático para el análisis de depósitos hepáticos de fibrina/fibrinógeno y fibronectina fue realizada homogeneizando 50 mg de tejido en tampón de extracción compuesto por 10 mM de fosfato sódico pH 7,5, 100 mM de ácido ϵ -aminocaproico, 5 mM de EDTA, coctel de inhibidores de proteasas (Roche), 10 U de dalteparina/ml y 2 mM de inhibidor de proteasas PMSF (Sigma). Tras permanecer toda la noche a 4°C girando en una noria orbital, las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue recogido para medir la concentración de proteínas y el pellet fue resuspendido, tras otro lavado con tampón de extracción, en 3 M de urea. Las muestras permanecieron 2 horas a 37°C en agitación y recibieron agitación vigorosa cada hora y justo antes de centrifugar a 14000 g durante 15 minutos a 4°C. El sedimento fue disuelto en 200 μ l tampón de carga 2X (100 mM Tris pH 6,8, 100 mM β -mercaptoetanol, 4% SDS, 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol).

2.5.2. Electroforesis y electrotransferencia

En todos los casos, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (gel de apilamiento al 6% y geles de separación del 7,5 al 10% de poliacrilamida según el tamaño de las proteínas a detectar) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en un tampón de carrera que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0,1% SDS. La electroforesis se realizó a 90 V en el gel de apilamiento y a 120 V una vez que las proteínas alcanzaron el gel de separación. A continuación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa *Hybond-C Extra* de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Reino Unido) en un tampón que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol a voltaje constante (120 V) durante 45 minutos o 1 hora y 15 minutos, según el tamaño de la proteína a detectar.

2.5.3. Inmunodetección

Tras la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada durante una hora a temperatura ambiente con 5% de leche en TBST (25 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl (TBS), 0,1% Tween), para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Seguidamente, se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente, utilizando la concentración adecuada para cada caso (1:100-1:500). Una vez finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas con TBST para eliminar el anticuerpo primario no unido a su diana (3 lavados de 6 minutos) y se incubaron con el anticuerpo secundario a una dilución 1:5000 en 5% de leche en TBST durante una hora a temperatura ambiente. Por último, se lavaron con TBST (3 lavados de 6 minutos) para eliminar los restos de anticuerpo secundario no unido y se finalizó con un lavado de TBS.

El revelado de las membranas fue realizado con el kit de quimioluminiscencia *Western Lightning-ECL* de Perkin Elmer Inc. (Waltham, MA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando las películas *Amersham Hyperfilm ECL* de Amersham Biosciences.

2.6. Análisis histopatológico del hígado

Las muestras de tejido hepático fijadas en paraformaldehído al 4 % fueron incluidas en parafina y cortadas en secciones de 5 µm que fueron posteriormente teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) o Rojo Sirio, tinción que permite visualizar los depósitos de colágeno en el tejido. Los cortes de los diferentes modelos fueron evaluados bajo el microscopio óptico (Olympus BX-51). El grado de necrosis, el estado y tamaño de las lesiones histológicas tumorales y la deposición de colágeno fueron determinadas por dos patólogos (Simone Carotti y Sergio Morini de la Universidad Campus Bio-Medico de Roma, Italia) tal y como se ha descrito anteriormente [86].

2.7. Inmunohistoquímica

Las inmunohistoquímicas se realizaron en cortes de 3-5 µm de tejido hepático incluido en parafina para analizar la expresión y la localización *in situ* de las proteínas MMP10, CD31, fibrinógeno, fibronectina, CXCR4 y Ki67, así como del nucleósido BrdU. Los anticuerpos utilizados están detallados en la tabla 2.

Los cortes fueron desparafinados en tres baños de xileno durante 5 minutos en cada uno de ellos. Posteriormente fueron incubados sucesivamente en dos baños de etanol 100% y otros dos baños de etanol al 96% durante 10 minutos. Tras lavar con la solución

tampón T-PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄ pH 7,4, 0,05% Tween-20) durante 5 minutos (3 lavados), los cortes fueron sumergidos en tampón citrato 10 mM pH 6 (Dako) y sometidos a un calentamiento en microondas, para favorecer la exposición de los epítomos. Se realizó un pulso de 1 minuto a máxima potencia, seguido de otro pulso de 10 minutos a media potencia. Una vez atemperados, los tejidos fueron lavados con T-PBS durante 5 minutos (3 lavados). Tras lo cual, los cortes permanecieron en agua oxigenada al 3% en PBS durante 10 minutos para inactivar la peroxidasa endógena del tejido y fueron nuevamente lavados en T-PBS (3 lavados).

En el caso de las inmunohistoquímicas realizadas en tejido hepático de ratón, algunos anticuerpos producidos en ratón, como el anti-BrdU, requirieron el bloqueo previo de los lugares de unión que darían tinción inespecífica. Para ello, se preparó una disolución 1:66 del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón en T-PBS y 1% de BSA. A continuación, fue añadido el anticuerpo primario correspondiente en cada una de las inmunohistoquímicas y se dejó incubar en una cámara húmeda toda la noche a 4°C. Al término de la incubación, las muestras fueron lavadas 3 veces con T-PBS para posteriormente proceder a la incubación, de nuevo en cámara húmeda, durante 45 minutos con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, ratón o cabra, en función del origen del anticuerpo primario utilizado, marcados con peroxidasa. Transcurrido ese tiempo, las hibridaciones fueron reveladas utilizando diaminobencidina (DAB) (Biocare) como cromógeno. Como último paso del proceso, los cortes fueron deshidratados secuencialmente en baños de xileno, acetona:xileno 1:1 y acetona, permaneciendo 5 minutos en cada uno. El montaje de las preparaciones fue realizado con el medio de montaje DPX.

La especificidad de las reacciones inmunohistoquímicas se comprobó mediante incubación de las secciones con suero no inmune como sustituto del anticuerpo primario.

En la inmunohistoquímica para MMP10 llevada a cabo en las muestras de tejido hepático humano normal y enfermo, se realizó una cuantificación de la expresión de esta proteína. Para este *score* o puntuación se tuvo en cuenta la extensión del marcaje y su intensidad. La extensión de la señal (porcentaje de células positivas) se puntuó del 0 al 3, siendo el 0 = negativo, 1 = 1-5%, 2 = 6-30% y 3 = 31-100%. La intensidad de la

señal también fue evaluada del 0 al 3, siendo 0 = negativa, 1 = débilmente positiva, 2 = moderadamente positiva y 3 = fuertemente positiva.

2.8. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

2.8.1. Extracción de la cromatina

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) fue realizada en la línea de hepatocarcinoma humano Huh7 sembrando $3,5 \times 10^6$ células por placa de 10 cm. En total, fueron utilizadas 8 placas en condiciones de normoxia y 8 en hipoxia. Tras 24 horas, las células fueron fijadas con formaldehído al 1% durante 10 minutos en agitación suave y la reacción fue parada con 0,125 M de glicina. Se realizaron 3 lavados con PBS frío, tras los cuales las células fueron rascadas en 500 μ l de PBS frío con inhibidores de proteasas (10 μ l/ml PMSF) y centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El pellet obtenido fue resuspendido en tampón de lisis 1 (50 mM Hepes-KOH pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 0,5% NP40 o Igepal CA-630) con inhibidores de proteasas (10 μ l/ml PMSF, 1 μ l/ml aprotinina y 1 μ l/ml leupeptina) e incubado en rotación durante 10 minutos a 4°C. A continuación, el homogeneizador *dounce* fue utilizado para romper las células (10 veces por muestra) que fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 5 minutos a 4°C para precipitar los núcleos.

El pellet de núcleos fue resuspendido en 1 ml de tampón de lisis 2 (10 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA) al que se le añadieron los mismos inhibidores de proteasas que al tampón de lisis 1. Las muestras en tubos Eppendorf se incubaron en rotación a 4°C durante 5 minutos y seguidamente se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 minutos a 4°C. El pellet fue resuspendido en 300 μ l de tampón de lisis 3 (10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,1% Na-deoxicolato, 0,5% N-laurilsarcosina) con inhibidores de proteasas. La suspensión obtenida fue sonicada 30 segundos utilizando un baño de agua a alta potencia con hielo. En total, se realizaron 24 ciclos de 30 segundos para obtener fragmentos de ADN de 500-600 bp. Tras la sonicación, se añadió 1:10 de Triton X-100 al 10% y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar los posibles residuos. El sobrenadante (cromatina) fue pasado a tubos nuevos y de acuerdo al volumen obtenido, se guardó el 10% como input a -80°C.

2.8.2. Incubación con el anticuerpo

Por otro lado, se llevó a cabo el prebloqueo y la unión del anticuerpo a las bolitas magnéticas *Dynabeads protein G* (Invitrogen). En tantos tubos Eppendorf como muestras, fueron añadidos 25 μ l de bolitas y 1 ml de solución de bloqueo (0,5% BSA en PBS). Las bolitas fueron retenidas por el colector magnético y la solución fue eliminada. El lavado con solución de bloqueo se repitió dos veces más y se procedió a la adición del anticuerpo. En un volumen final de 250 μ l de bolitas y solución de bloqueo se añadieron 5 μ g de anticuerpo anti-c-JUN (Santa Cruz) dejando incubar toda la noche en rotación a 4°C. Al día siguiente, las bolitas fueron lavadas 3 veces con la solución de bloqueo y resuspendidas en 100 μ l de la misma. Estos 100 μ l de mezcla anticuerpo/bola magnética fueron añadidos a las muestras de cromatina, junto con inhibidores de proteasa, y se dejaron en rotación a 4°C durante toda la noche.

Tras la noche en incubación, se eliminó el sobrenadante de los tubos con la ayuda del colector magnético que retiene las bolitas y se realizaron varios lavados con 1 ml de tampón de lavado (50 mM HEPES-KOH a pH 7,5, 500 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0,1% NP-40, 0,7% Na-Deoxicolato). Finalmente, se añadió 1 ml de TBS y las bolitas fueron transferidas a otro tubo nuevo. Las muestras fueron centrifugadas a 960 rcf durante 3 minutos y con la ayuda del colector magnético el TBS fue retirado.

2.8.3. Elución del complejo anticuerpo/proteína/DNA

Tras los lavados con TBS, las bolitas fueron resuspendidas con 100 μ l de tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 1% SDS) y calentadas a 65°C durante 12-18 horas tras mezclar vigorosamente para revertir el *crosslinking* del formaldehído. Paralelamente, 30 μ l del input fueron descongelados, mezclados con 70 μ l de tampón de elución y calentados junto con las muestras.

A continuación, los 100 μ l de sobrenadante fueron pasados a un tubo limpio y se les añadió 100 μ l de tampón Tris-EDTA (10 mM Tris, 1mM EDTA) para diluir el SDS del tampón de elución. Tras sendos tratamientos con 3 μ l de 1 mg/ml de *RNase A* (Fermentas) a 37°C durante 30 minutos y 3 μ l de 10 mg/ml de *Proteinase K* (Fermentas) a 55°C durante 1 hora, se procedió a la purificación del ADN con el *PCR purification kit* (Qiagen). Las muestras fueron eluidas con 50 μ l de tampón de elución y el resultado analizado por PCR a tiempo real utilizando los cebadores de la tabla 3.

2.9. Transfección transitoria de células

2.9.1. Construcción con el promotor de la MMP10 y mutagénesis dirigida

La región promotora proximal del gen humano *MMP10* fue clonada para analizar la regulación de su expresión. Para ello, un fragmento de 2 kb de esta región promotora del gen de la *MMP10* (posición -1934/+66) fue amplificado mediante PCR a partir de ADN genómico obtenido de células HepG2 y la secuencia fue introducida de forma direccionada en el vector comercial pGL3 Basic (Promega), que lleva luciferasa como gen reportero. Este plásmido fue cedido por el Dr. Páramo del área de Ciencias Cardiovasculares del CIMA.

Una vez obtenido el plásmido, se pasó a su producción en bacterias competentes *E. coli*. Las bacterias fueron transformadas mediante choque térmico y crecidas en LB Broth (Sigma) en condiciones estériles, a 37°C y en agitación durante toda la noche. Los plásmidos fueron, finalmente, purificados mediante *Endofree Plasmid Maxi Kit* (Quiagen, Hilden, Alemania) y su concentración cuantificada en el NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

La mutagénesis dirigida del sitio AP1 del promotor de la *MMP10* (posición -67 a -61) fue llevada a cabo con el *QuickChange II site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se utilizó como molde la construcción del promotor de la *MMP10* en pGL3 Basic descrita anteriormente y se diseñaron cebadores (descritos en la tabla 3) con la mutación específica del sitio AP1, mutación en la que se sustituyó TGAATCA por GGAACCA. Tanto la secuencia mutada como la construcción del promotor no mutada fueron comprobadas mediante secuenciación.

2.9.2. Transfección

La transfección fue llevada a cabo mediante el sistema *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) basado en la utilización de un lípido catiónico, que se asocia al ADN, y otro neutro, que favorece la captación por parte de las células. Se sembraron 10^5 células Huh7 por pocillo de placa de 24 pocillos en DMEM 10% FBS sin antibióticos. Al día siguiente, se preparó en medio Opti-MEM (Gibco/Invitrogen) la mezcla lípido y ADN que consistía en 1 µg de plásmido con el gen de estudio (promotor *MMP10*) o plásmido

control (Renilla) por pocillo en una relación 1:1,5 respecto a la Lipofectamina 2000. Las células fueron incubadas con esta mezcla durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, el medio fue cambiado por DMEM 10% FBS con 1% P/S y se procedió a los tratamientos.

2.10. Transfección estable de células de hepatocarcinoma humano

2.10.1. Vector de expresión de la MMP10

Para el estudio funcional de la MMP10 se generó un vector de expresión con el fin de sobre-expresar establemente la proteína en la línea de hepatocarcinoma humano Huh7. La región codificante de la MMP10 humana se clonó a partir de ADNc obtenido de células Huh7 y se amplificó por PCR mediante la utilización de los cebadores descritos en la tabla 3.

Para llevar a cabo la PCR se utilizó *Platinum[®]Taq DNA polymerase* (Invitrogen) y las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial:	94°C, 4 min	
Desnaturalización en cada ciclo:	94°C, 30 seg	} 45 ciclos
Hibridación:	60°C, 20 seg	
Extensión:	72°C, 1.5 min	
Extensión final:	72°C, 10 min	

Los productos de la PCR se cargaron en un gel de agarosa al 2% (Laboratorios Conda, Madrid), se visualizaron con el intercalante de ADN *SYBR[®] Safe DNA gel stain* (Invitrogen) y se purificaron mediante la utilización del kit de extracción *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la digestión con las enzimas de restricción KpnI y EcoRI (New England Biolabs) y el ADNc de la MMP10 purificado fue ligado directamente con el plásmido pcDNA6/V5-HisB (Invitrogen) digerido con las mismas enzimas, según las especificaciones del fabricante. La producción del plásmido en *E. coli* fue realizada de la misma forma que en el caso de las transfecciones transitorias.

2.10.2. Transfección y selección de células estables

Al igual que en la transfección transitoria, la transfección para generar líneas estables fue llevada a cabo mediante el sistema *Lipofectamine 2000*. Se sembraron 10^5 células Huh7 por pocillo de placa de 24 pocillos en DMEM 10% FBS sin antibióticos. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con la mezcla lípido y ADN que consistía en 1 μg de plásmido con la región codificante de la MMP10 o plásmido control (pcDNA6/V5-HisB vacío) en una relación 1:1,5 respecto a la Lipofectamina 2000, en Opti-MEM. Las células fueron incubadas con esta mezcla durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, el medio fue cambiado por DMEM 10% FBS con 1% P/S.

Para la selección de las células estables, se utilizó el antibiótico *Blasticidin S* (InvivoGen) cuyo gen de resistencia está presente en el plásmido. Se realizó, en primer lugar, una curva de dosis de blasticidina para establecer la dosis más baja que acaba con las células en ausencia de transfección. Una vez establecida la dosis (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), se transfectaron las células y se dejaron crecer en medio completo suplementado con los 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antibiótico. Las células se mantuvieron en cultivo hasta obtener colonias individuales (clones), cambiándoles el medio con blasticidina cada 2 días. Una vez seleccionados los clones se testaron para comprobar que expresaban el gen de la MMP10 mediante inmunodetección (western-blot para la proteína MMP10), tanto en el medio condicionado por las células, como en los lisados celulares.

2.11. Tratamientos *in vitro*

De manera general, los experimentos se realizaron en ausencia de suero. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento el medio condicionado fue recogido y guardado a -80°C . Para el análisis de ARNm y proteína, las células se lavaron con PBS y se recogieron con el reactivo *TriReagent* o la solución de homogeneización del *LEV Simply RNA Cells and Tissue kit* y con el tampón RIPA, respectivamente, utilizando raspadores *Cell Scrapers* (Sarstedt).

Las líneas celulares AML12, Huh7, NMC y Huh28 fueron tratadas con los ligandos del EGFR anfirregulina (AR) y epirregulina (EREG) a una concentración de 50 nM y

con el factor de crecimiento TGF β a 80 pM. Las células fueron recogidas a las 12 y 24 horas de tratamiento.

Las células Kupffer de ratón y la línea celular RAW 264.7 fueron tratadas con antagonistas del receptor de tipo TOLL 4 (TLR4). Las células de Kupffer fueron recogidas a las 3 horas de tratamiento con 100 ng/ml de LPS. Las células RAW 264.7, por su parte, fueron tratadas durante 2,5 y 5 horas con 100 ng/ml de LPS, 500 nM de dominio extra A (EDA) de la fibronectina y 500 nM de EDA tratado previamente, a 25°C durante 20 minutos, con 2,5 mg/ml de proteinasa K (Sigma). La proteína humana EDA de la fibronectina, cedida por el Dr. Juan José Lasarte, fue clonada, expresada en bacterias y purificada como se ha descrito anteriormente [87].

Las células Huh7 establemente transfectadas fueron tratadas con los antioxidantes N-acetilcisteína (NAC) a 10 mM e hidroxianisol butilado (BHA) a 75 μ M. En ambos casos, el tratamiento duró 48 horas.

El factor derivado de estroma 1 (SDF1) y el inhibidor de MEK UO129 fueron utilizados para tratar células Huh7 normales y transitoriamente transfectadas con el promotor de la MMP10 normal o mutante para el sitio AP-1 en condiciones de normoxia e hipoxia. En todos los casos, la concentración de SDF1 fue de 100 ng/ml y 10 μ M la de UO129. Los tratamientos se realizaron en DMEM 2% FBS y se pararon a las 48 horas.

2.12. Medida de la actividad luciferasa

La medida de la actividad luciferasa fue utilizada para analizar el nivel de actividad del promotor de la MMP10 en diferentes condiciones. Para ello, las células transfectadas transitoriamente con el promotor de la MMP10 normal o mutante para el sitio AP-1 y con el plásmido control Renilla fueron tratadas con SDF1 y UO129, tanto en normoxia como en hipoxia. Tras 48 horas, las células fueron lavadas con PBS y recogidas con el tampón de lisis del Kit *Dual-luciferase[®] Reporter Assay System* (Promega). La actividad luciferasa fue medida en un luminómetro de placa (Orion microplate luminometer, Berthold Detection Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal fue normalizada respecto a Renilla y proteína total del lisado celular, previamente cuantificada con el reactivo Bradford.

2.13. Ensayo de migración

Los ensayos de migración fueron llevados a cabo con las células Huh7 establemente transfectadas para expresar de manera constitutiva la MMP10 y sus controles con plásmido pcDNA6/V5-HisB vacío. Se utilizaron placas de 24 pocillos e insertos o *transwells ThinCert 24-well* de Greiner Bio-One (Frickenhausen, Alemania) que contenían una membrana de tereftalato de polietileno (PET) con poros de 8 μm . Se sembraron 2×10^5 células en 500 μl de medio DMEM sin suero en la cámara superior o inserto y 1 ml de DMEM con 10% FBS fue depositado en el pocillo o cámara inferior (figura 5). El suero añadido en la cámara inferior fue utilizado como quimioatrayente para favorecer la migración de las células. En los experimentos en los que fue utilizado algún compuesto, como el AMD-3100 (10 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma Aldrich), antagonista del receptor de quimioquinas 4 (CXCR4), o el plasminógeno (5 $\mu\text{g/ml}$) (Enzyme Research Laboratories), éste fue añadido a la cámara superior junto con las células.

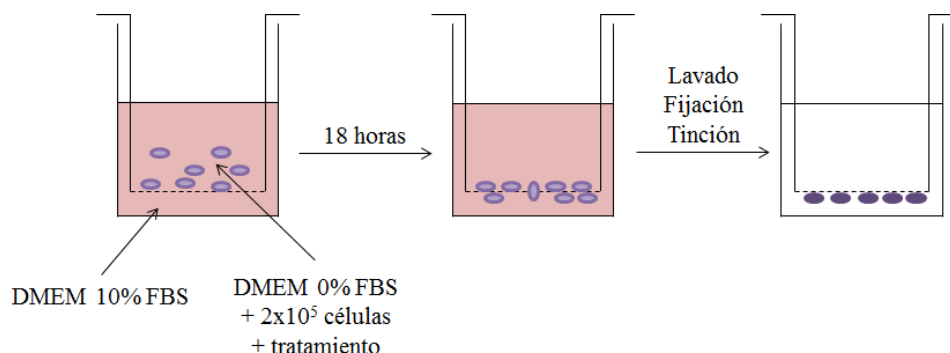


Figura 5. Representación gráfica del ensayo de migración. Se muestra una representación del inserto y de la cámara inferior, junto con las células y los medios utilizados en cada compartimento, a lo largo del ensayo de migración.

Las células permanecieron en las cámaras de migración durante 18 horas en el interior de un incubador con filtro Hepa a 37°C y en condiciones de normoxia. Tras este tiempo, la parte superior de la membrana del inserto fue rascada con un bastoncillo de algodón para eliminar las células que no habían migrado. Se realizaron lavados con DPBS y las células que habían sido capaces de migrar y permanecían al otro lado de la membrana (parte inferior del inserto) fueron fijadas con formaldehído al 4% durante 10 minutos. A continuación, se realizaron varios lavados con DPBS y se procedió a la

tinción de las células con 0,1% de cristal violeta en metanol al 2% durante 15 minutos. Tras varios lavados para eliminar el exceso de coloración, se pasó a la visualización y cuantificación de las células teñidas al microscopio óptico invertido. Se contaron 5 campos aleatorios a un aumento de 200X.

2.14. Ensayo de invasión

Al igual que los experimentos de migración, los ensayos de invasión fueron llevados a cabo con las células Huh7 establemente transfectadas para expresar de manera constitutiva la MMP10 y sus controles con plásmido pcDNA6/V5-HisB vacío. Se utilizó el set *BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber* que contenía insertos con membrana PET con poros de 8 µm y una fina capa de matriz Matrigel que impedía la migración de las células no invasivas.

Se sembraron 2×10^4 células en 500 µl de medio DMEM sin suero en el inserto o cámara superior y 1 ml de DMEM con 10% FBS fue añadido al pocillo o cámara inferior. Una vez más, el suero depositado en la cámara inferior fue utilizado como quimioatrayente para favorecer la migración celular. Las células permanecieron en las cámaras de invasión durante 18 horas en las mismas condiciones que en los ensayos de migración. Transcurrido el tiempo, las Huh7 que no habían sido capaces de invadir la matriz fueron eliminadas mediante el rascado de la superficie superior del inserto con un bastoncillo de algodón. Se realizaron varios lavados con DPBS y las células con capacidad invasiva que habían sido capaces de migrar al otro lado de la membrana fueron fijadas con metanol 100% durante 2 minutos. Se realizaron varios lavados con DPBS y se procedió a la tinción de las células con 0,25% de cristal violeta en metanol al 2% durante 15 minutos. Tras varios lavados para eliminar el exceso de tinción, se pasó a la visualización y cuantificación de las células teñidas al microscopio invertido. Del mismo modo que en el ensayo de migración, se contaron 5 campos aleatorios a un aumento de 200X.

2.15. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante el programa informático *GraphPad Prism* versión 6.01. Los datos fueron representados mediante la media \pm SEM (error estándar de la media). Los datos distribuidos normalmente se compararon mediante el

test estadístico t de Student, mientras que los no paramétricos (distribución no normal) se analizaron con el test U de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE LA MMP10 DURANTE EL DAÑO Y LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Tras la publicación del papel crítico de la MMP10 en la reparación normal de la piel y el tejido del colon [72, 73] y de la mención de su inducción en el hígado de rata tras el daño agudo [52], nos propusimos determinar el papel de este enzima en la regeneración hepática. Para ello analizamos la expresión de la MMP10 en diferentes modelos de daño y regeneración hepáticos.

1.1. Modelo de hepatectomía parcial (HP)

Para dilucidar el papel de la MMP10 en la regeneración del tejido hepático, comenzamos examinando su expresión durante la regeneración inducida tras una pérdida de masa hepática debida a una hepatectomía parcial del 70%. Tres de los cinco lóbulos del hígado de ratón (porción correspondiente a 2/3 de la masa hepática) fueron eliminados quirúrgicamente sin causar daño severo a los lóbulos remanentes.

Observamos una baja expresión génica de esta MMP en el tejido hepático de los ratones control “sham”. Sin embargo, tras la HP se produce un fuerte incremento de su expresión entre las 24 y 36 horas a nivel de ARNm (figura 6 A), con la correspondiente acumulación de la proteína MMP10, especialmente aparente a partir de las 48 horas tras la resección (figura 6 B).

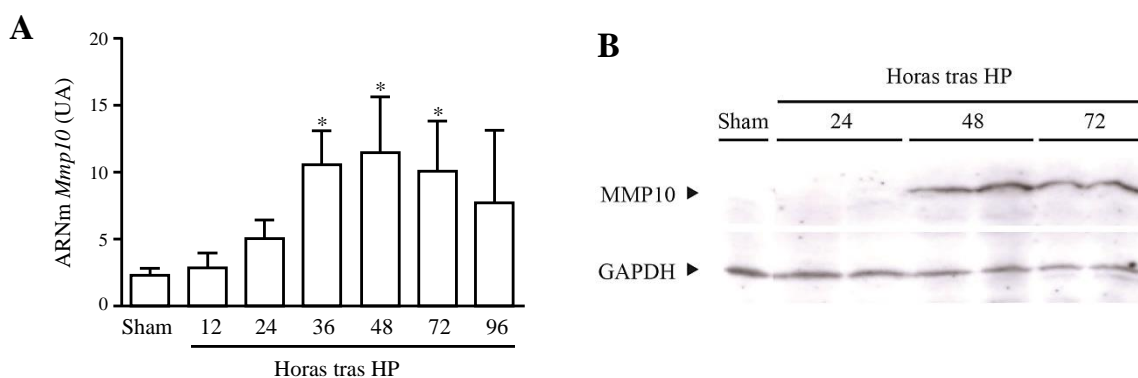


Figura 6. Expresión de la MMP10 durante la regeneración hepática en ratón tras hepatectomía parcial del 70%. A) Expresión del ARNm de la MMP10 analizado mediante PCR a tiempo real a los tiempos indicados tras la intervención (n = 5 ratones por punto). Los asteriscos indican $P < 0,05$ respecto a sham. UA: Unidades arbitrarias. B) Análisis de los niveles de la proteína MMP10 mediante western blot a los tiempos indicados tras la HP. Los valores de los sham corresponden a ratones sacrificados a las 48 horas de la intervención.

La inmunohistoquímica corrobora la baja expresión de la proteína MMP10 en el hígado sano de los ratones sham y nos permite detectar su expresión en hepatocitos y en células del epitelio biliar, así como en células inflamatorias (monocitos/macrófagos), tras la hepatectomía parcial. Durante la regeneración, la expresión de la proteína MMP10 parece seguir un patrón parcheado, incluyendo racimos de hepatocitos positivos, en el parénquima hepático (figura 7).

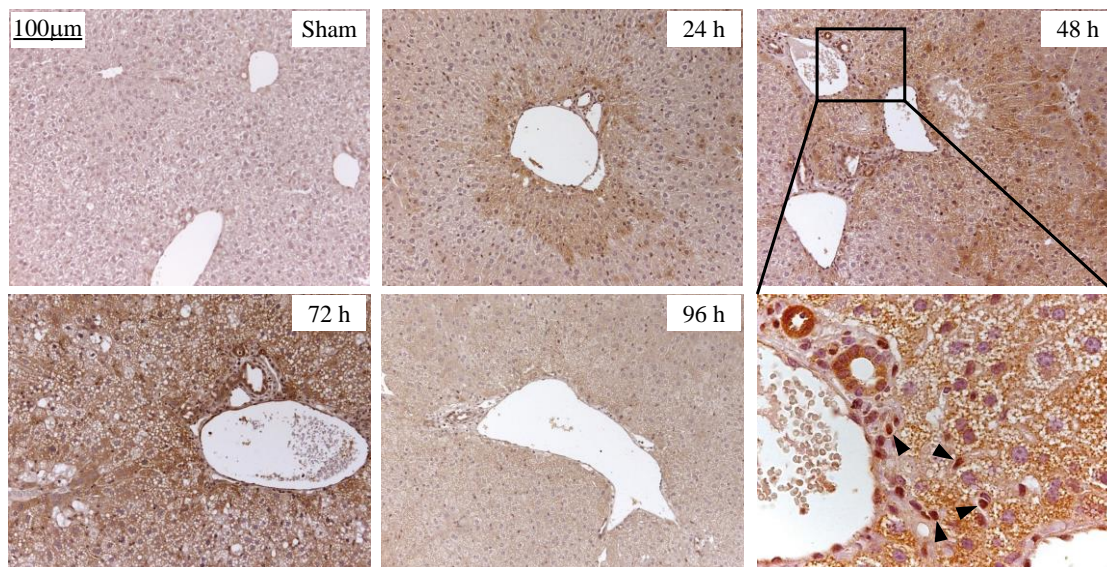


Figura 7. Detección de la MMP10 en el parénquima hepático durante la regeneración tras hepatectomía parcial del 70%. Se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica para la MMP10 en cortes de hígado de ratón a diferentes tiempos tras la HP (aumento a 100X). La imagen inferior derecha es una ampliación (400X) del área marcada de la imagen superior. Las flechas señalan los monocitos/macrófagos.

1.2. Modelo de daño colestásico: Ligadura del conducto biliar (BDL)

Con el objetivo de analizar el papel de la MMP10 en la respuesta hepática al daño, su expresión fue evaluada en el hígado de ratón tras la ligadura del conducto biliar (BDL), modelo prototípico de inflamación, daño hepatocelular y remodelación tisular. En este modelo se genera un daño colestásico debido a la obstrucción del sistema biliar, que se caracteriza por la acumulación de ácidos biliares hidrofóbicos tóxicos en los hepatocitos y los colangiocitos, causando muerte celular y daño hepático que progresivamente da lugar a la fibrosis del hígado [84].

De forma similar a lo observado en el modelo de HP, los bajos niveles de expresión del ARNm de la *Mmp10* de los hígados control aumentan de forma significativa a los 7 días tras el procedimiento de BDL y permanecen elevados hasta 2 semanas después de la intervención (Figura 8 A). Los niveles de la proteína MMP10, analizados por western blot, muestran un patrón de expresión similar, aumentando de forma marcada a los 7 días y permaneciendo altos hasta comenzar a descender a los 21 días tras la ligadura (Figura 8 B).

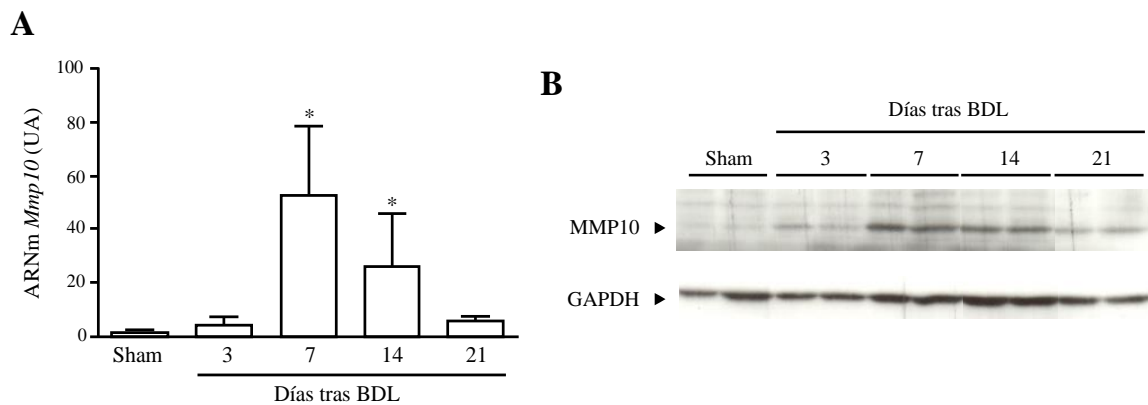


Figura 8. Expresión de la MMP10 en hígado de ratón tras ligadura del conducto biliar (BDL). A) Expresión del ARNm de la *Mmp10* analizado mediante PCR a tiempo real a los días indicados tras la BDL (n = 5 ratones por punto). Los asteriscos indican $P < 0,05$ respecto a sham. UA: Unidades arbitrarias. B) Análisis de los niveles de la proteína MMP10 mediante western blot a los tiempos indicados tras la intervención. Los valores de los sham corresponden a ratones sacrificados a los 7 días de la intervención.

La inmunodetección en tejido revela un creciente aumento de la expresión de la proteína MMP10 tras la BDL. La reactividad para la MMP10 se detecta en las células del epitelio biliar y en los hepatocitos, además de en células inflamatorias, alcanzando su máxima intensidad en torno a los 14 días (figura 9 A).

La expresión de la MMP10 por parte de las células hepáticas es similar en ambos modelos de daño y regeneración hepáticos, HP y BDL. Cabe destacar la detección de núcleos positivos para la MMP10 en algunos hepatocitos y células biliares, en adición a la señal detectada en el citoplasma de dichas células (figura 9 B).

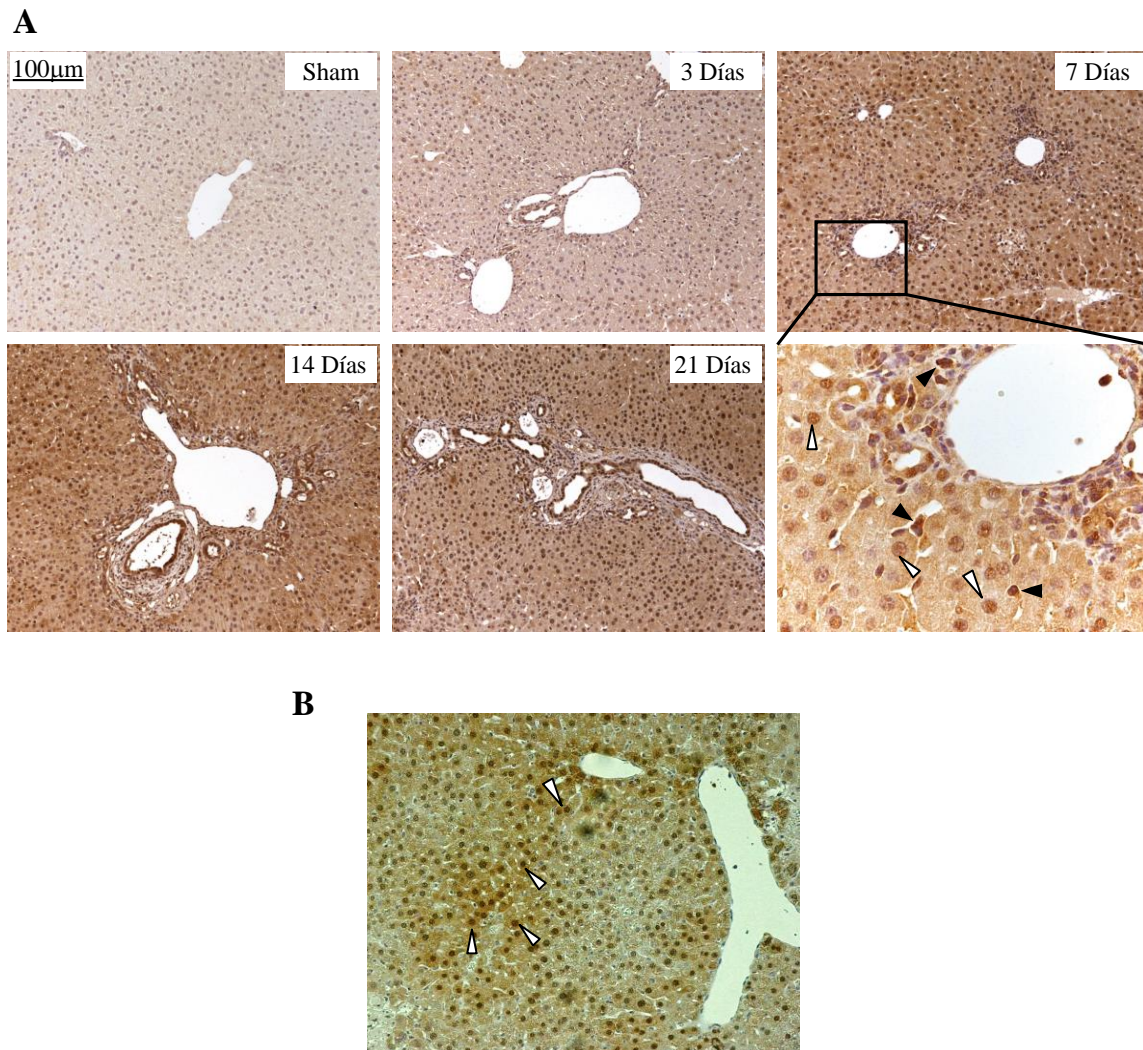


Figura 9. Detección de la MMP10 en el parénquima hepático durante la respuesta hepática a la BDL. A) Se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica para la MMP10 en cortes de hígado de ratón a diferentes días tras la BDL (100X). La imagen inferior derecha es una ampliación del área marcada de la imagen superior (400X). Las flechas negras señalan monocitos/macrófagos y las blancas hepatocitos. B) Imagen representativa de la inmunohistoquímica para la MMP10 a 7 días tras la BDL (x 200) en la que se observa una gran cantidad de hepatocitos con núcleos positivamente marcados, algunos de los cuales están señalados por flechas blancas.

1.3. Modelo de daño hepático agudo: Administración de CCl₄

La expresión de la MMP10 también fue analizada en un modelo de daño hepático agudo, que a su vez desencadena una respuesta regenerativa, como es la inyección intraperitoneal de tetracloruro de carbono (CCl₄). En este modelo se produce un daño hepático por estrés oxidativo en el que acontecen fenómenos de inflamación, necrosis y

fibrosis que preceden a una respuesta regeneradora que trata de restaurar la masa hepática dañada.

Al igual que en los modelos anteriores, se confirma la inducción de la expresión de la MMP10 durante el proceso de daño/regeneración desencadenado tras la administración aguda de CCl₄. Se produce un aumento significativo de los niveles de ARNm de la *Mmp10* en torno a las 24 horas de la inyección intraperitoneal del hepatotóxico (figura 10 A), que se corrobora con el aumento de los niveles proteicos que alcanzan su máximo sobre las 48 horas tras el insulto (figura 10 B).

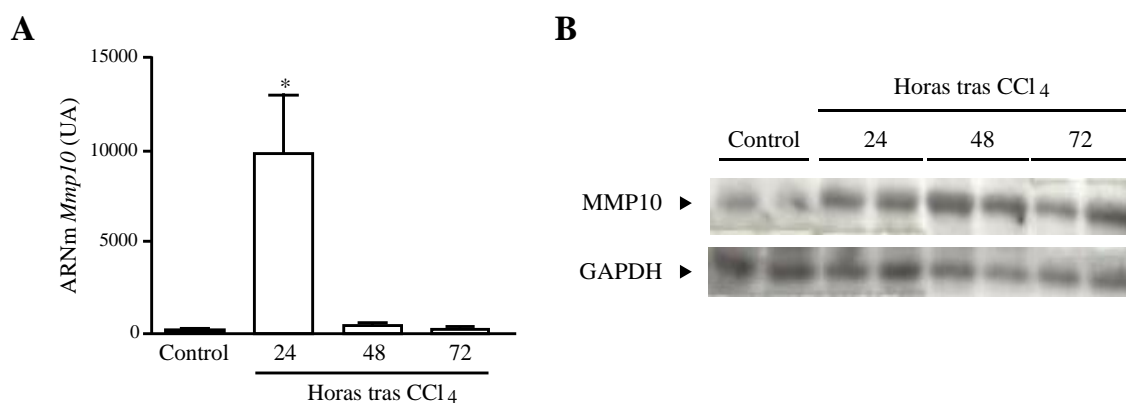


Figura 10. Expresión de la MMP10 en hígado de ratón durante la respuesta hepática al daño agudo por CCl₄. A) Expresión del ARNm de la *Mmp10* analizado mediante PCR a tiempo real a las horas indicadas tras la inyección del hepatotóxico (n = 3 ratones por punto). Los asteriscos indican P < 0,05 respecto a sham. UA: Unidades arbitrarias. B) Análisis de los niveles de la proteína MMP10 mediante western blot a los tiempos indicados tras la administración. Los valores de los controles corresponden a ratones sacrificados a las 48 horas de la inyección intraperitoneal del vehículo.

El análisis inmunohistoquímico de las secciones hepáticas confirmó los bajos niveles de expresión de esta MMP en los ratones control, que sólo recibieron el vehículo del CCl₄ (aceite), y la inducción de la misma tras el daño agudo causado por el tóxico. La reactividad para la MMP10, además de en células inflamatorias, endotelio y conducto biliar, se detecta de manera marcada en los hepatocitos que bordean zonas necróticas y áreas periportales, especialmente a las 24-48 horas tras la administración de CCl₄ (figura 11).

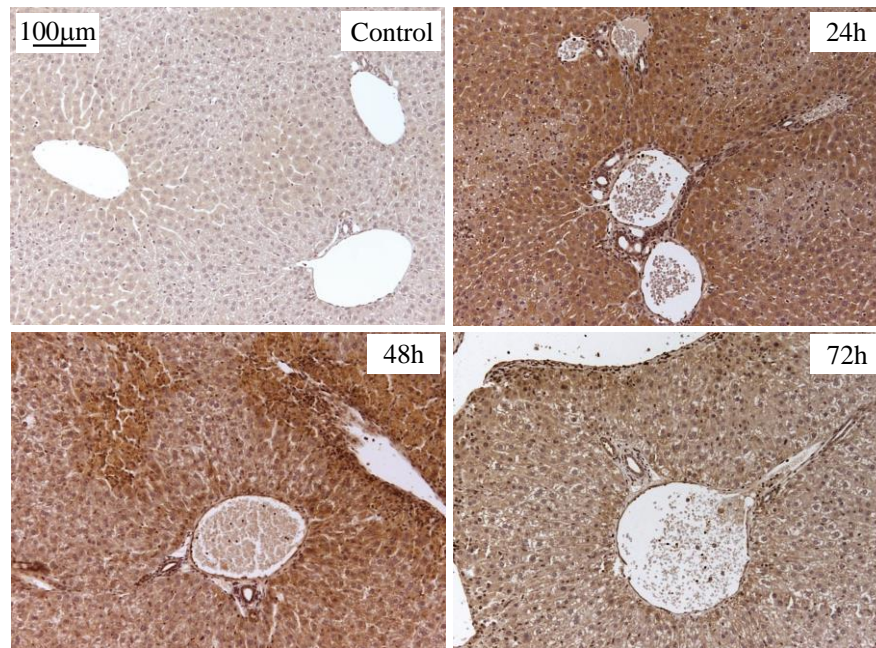


Figura 11. Detección de la MMP10 en el parénquima hepático durante la respuesta hepática al daño agudo por CCl_4 . Se muestran imágenes representativas de la detección de la MMP10 mediante inmunohistoquímica en el parénquima hepático de ratón a diferentes horas tras la administración del tóxico (100X). La muestra control es representativa de ratones sacrificados a las 48 horas de la inyección intraperitoneal del vehículo.

En los 3 modelos *in vivo* estudiados (HP, BDL y CCl_4) detectamos un incremento significativo de la expresión de la MMP10 en respuesta al proceso de daño/regeneración desencadenado en el hígado, sugiriendo un papel para esta enzima en la respuesta regenerativa de dicho órgano. El siguiente paso que nos planteamos, fue determinar las señales capaces de regular la expresión de la MMP10 durante este proceso.

2. IDENTIFICACIÓN DE LAS SEÑALES QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE LA MMP10 EN EL DAÑO HEPÁTICO

Varios trabajos, en diversas líneas celulares epiteliales y tumorales, han mostrado la inducción de la expresión génica de la MMP10 por factores de crecimiento como el TGF β 1 y el EGF [65, 78, 88]. Como es bien sabido, tanto el TGF β 1 como los ligandos del EGFR, HB-EGF, AR y EREG son inducidos en el hígado en respuesta al daño y la regeneración [4, 9, 89-91]. Con el objetivo de identificar las posibles señales implicadas en la regulación de la expresión de la MMP10 en el daño y la regeneración hepática,

decidimos confirmar la inducción de los factores mencionados en dichos trabajos en nuestro modelo de daño colestásico. Como se aprecia en la figura 12, los niveles de expresión de los ligandos del EGFR, *Ar*, *Ereg* y *HB-Egf* están significativamente incrementados durante el daño colestásico causado por la BDL, al igual que lo está la expresión de la *Mmp10*, cosa que no ocurre con los niveles del factor EGF.

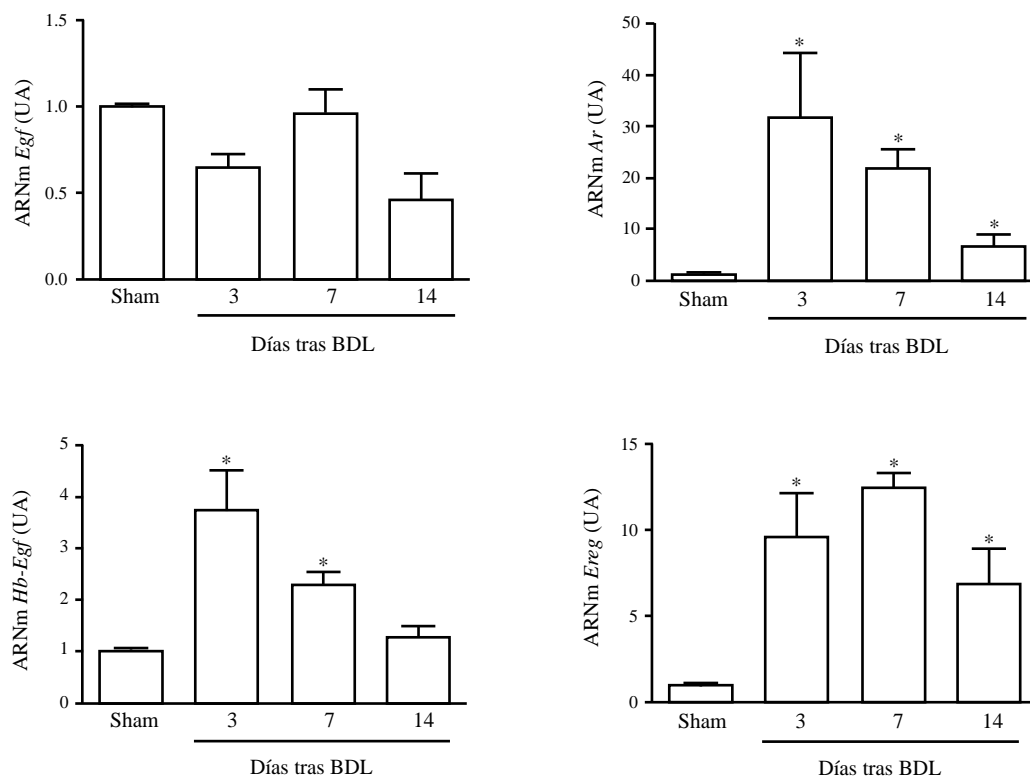


Figura 12. Expresión de ligandos del EGFR en hígado de ratón tras la BDL. La expresión del ARNm de *Egf*, *Ar*, *HB-Egf* y *Ereg* fue analizado mediante PCR a tiempo real a los días indicados tras la intervención (n = 5 ratones por punto). Los asteriscos indican P < 0,05 respecto a sham. Los valores de los sham corresponden a ratones sacrificados a los 7 días de la BDL. UA: Unidades arbitrarias.

Teniendo en cuenta dichos resultados, decidimos comprobar si los ligandos del EGFR, AR y EREG, solos y en combinación con TGF β 1, serían capaces de modular la expresión de la MMP10 en la línea celular de hepatocitos normales de ratón AML12 y en la línea celular de hepatocarcinoma humano Huh7. Efectivamente, estos factores de crecimiento inducen la expresión del ARNm de la *Mmp10* en las células hepáticas y además se produce un efecto aditivo cuando se combinan (figura 13 A). Resultados similares se obtienen con colangiocitos normales de ratón en cultivo (NMC) y con la línea celular de colangiocarcinoma humano Huh28 (figura 13 B). No obstante, en la línea Huh28 el TGF β 1 en solitario no parece inducir la expresión de la MMP10 a los

tiempos analizados. De manera complementaria, se confirma mediante western blot la acumulación de la proteína MMP10 en los medios condicionados de las líneas celulares humanas Huh7 y Huh28 como resultado de la estimulación de la expresión génica de la MMP10 por los factores de crecimiento (figura 13 A y B).

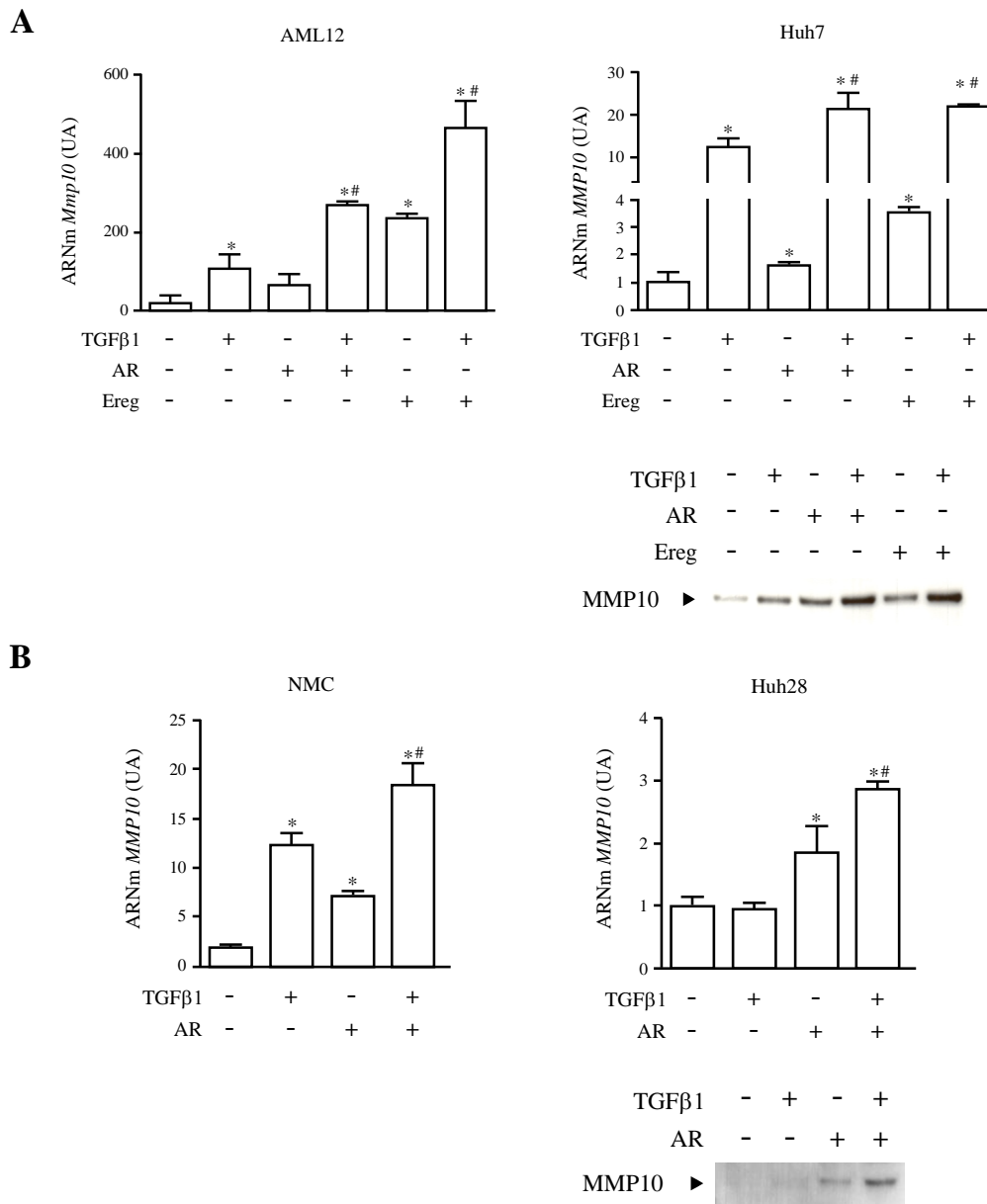


Figura 13. Expresión de la MMP10 en líneas celulares hepáticas de ratón y humano en respuesta a factores de crecimiento. La expresión del ARNm de la *MMP10* fue analizada mediante PCR a tiempo real en las líneas AML12 (24 horas de tratamiento) y Huh7 (12 horas de tratamiento) (A), en colangiocitos de ratón (NMC) (12 horas de tratamiento) y la línea Huh28 (24 horas de tratamiento) (B), estimuladas con TGFβ1 (80 pM), AR (50 nM) y EREG (50 nM). Los asteriscos indican $P < 0,05$ respecto a las células control y # $P < 0,05$ respecto a las células tratadas sólo con TGFβ1. Los western blots de los paneles A y B muestran la acumulación de la proteína MMP10 en el medio condicionado de las células Huh7 y Huh28 tras 24 horas de incubación con los factores de crecimiento. UA: Unidades arbitrarias.

Por otro lado, la activación de los macrófagos mediante el lipopolisacárido (LPS) bacteriano ha sido identificada como un factor determinante en la respuesta hepática a la colestasis experimental [92]. Además, recientemente, se ha descrito que la activación en macrófagos del receptor de tipo TOLL 4 (TLR4) por el LPS puede inducir la expresión de la MMP10 [93, 94]. Con el fin de comprobar estos datos, aislamos células de Kupffer de ratón y las estimulamos con LPS observando un aumento significativo de la expresión de la *Mmp10* en paralelo al incremento de los niveles del factor de necrosis tumoral α (*Tnfa*), el gen diana prototípico del sistema LPS/TLR4 (figura 14 A).

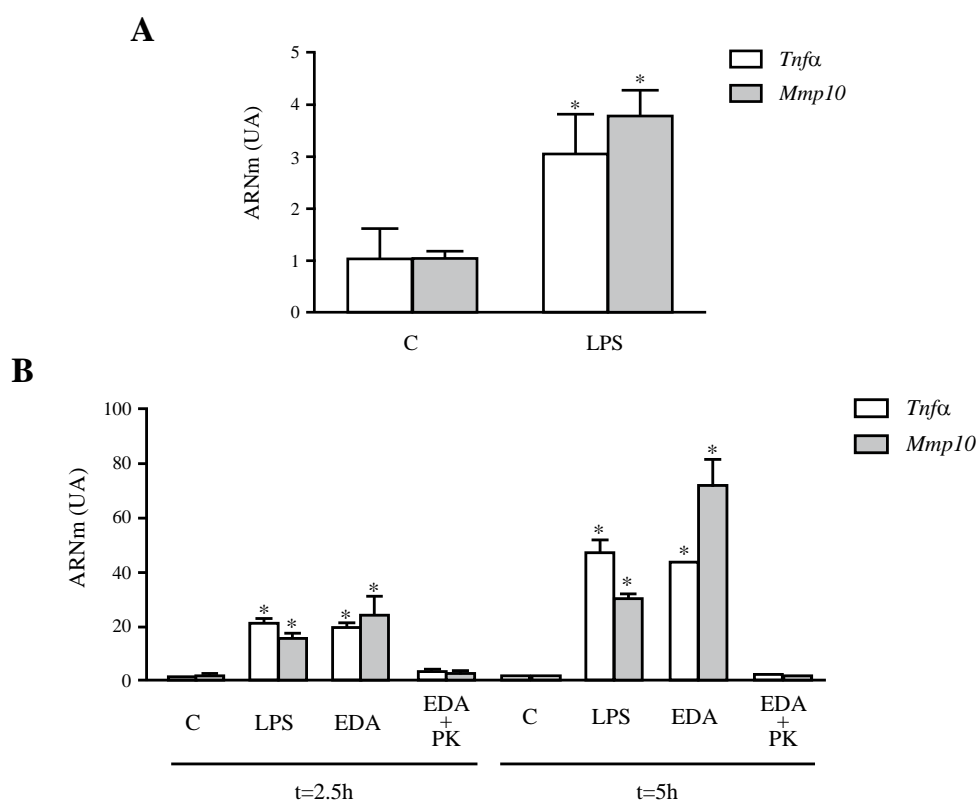


Figura 14. Expresión de la *Mmp10* en células de Kupffer de ratón y línea celular RAW 264.7 tratadas con agonistas del TLR4. Los niveles de expresión del ARNm de la *Mmp10* y del *Tnfa* fueron analizados mediante PCR a tiempo real en A) células de Kupffer tratadas con LPS (100 ng/ml) durante 3 horas, B) en la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 tratados con LPS (100 ng/ml), dominio de la fibronectina EDA recombinante (500 nM) o EDA recombinante previamente tratado con proteinasa K (PK) durante los tiempos indicados. Los asteriscos indican $P < 0,05$ respecto a las células control. UA: Unidades arbitrarias.

El TLR4, además de por LPS, puede ser activado por otros ligandos endógenos cuya expresión es inducida durante el daño hepático. Uno de estos agonistas del TLR4 es el

dominio extra A (EDA) de la fibronectina, que surge como una variante de *splicing* de la fibronectina en el daño colestásico [87, 95, 96]. Teniendo en cuenta que la fibronectina es considerada un potencial sustrato de la MMP10 [97], analizamos el posible efecto del EDA sobre la expresión de esta MMP en macrófagos. Como se aprecia en la figura 14 B, el EDA recombinante es capaz de inducir los niveles de expresión de la *Mmp10* y del *Tnfa* en la línea de macrófagos de ratón RAW 264.7, obteniendo un efecto similar al observado mediante la estimulación con LPS. Para asegurarnos de que el efecto era debido al EDA y no a restos bacterianos fruto de su producción en *E. coli*, añadimos a las células EDA recombinante previamente tratado con proteinasa K (PK) y, efectivamente, observamos la anulación del efecto sobre la expresión de la *Mmp10*.

Estos datos en su conjunto sugieren que la transcripción del gen de la *Mmp10* durante el daño y la reparación hepática responde a factores de crecimiento como son TGFβ1 y los ligandos del EGFR y a cambios moleculares en la composición de la matriz extracelular del hígado entre cuyos componentes se encuentra la fibronectina. La expresión de la *Mmp10*, es por tanto, capaz de ser inducida por factores del entorno celular.

3. PAPEL DE LA MMP10 EN EL DAÑO Y LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Para dilucidar el significado del aumento de la expresión de la *Mmp10* durante el proceso de reparación hepática, comparamos la respuesta de ratones de cepa salvaje (WT o MMP10^{+/+}) y ratones deficientes en MMP10 (MMP10^{-/-}) a los diferentes modelos de daño/regeneración mencionados anteriormente (hepatectomía parcial del 70%, daño colestásico por ligadura del conducto biliar y daño hepático agudo por administración intraperitoneal de CCl₄).

Uno de los primeros análisis fue determinar si existía una inducción compensatoria en el hígado de la expresión de otras MMPs en los ratones MMP10^{-/-}. Como se muestra en la figura 15 en ninguno de los modelos experimentales testados se detecta un incremento en los niveles de expresión de otras metaloproteasas, como la MMP3 y la MMP13, respecto a los valores observados en los ratones MMP10^{+/+}. Al contrario, en los ratones MMP10^{-/-} dichos valores parecen estar disminuidos en los diferentes

modelos. Por tanto, en estos ratones, la ausencia de la expresión de la MMP10 durante el daño y la regeneración hepática no parece desencadenar el aumento compensatorio de la expresión de otras MMPs que puedan suplir su función.

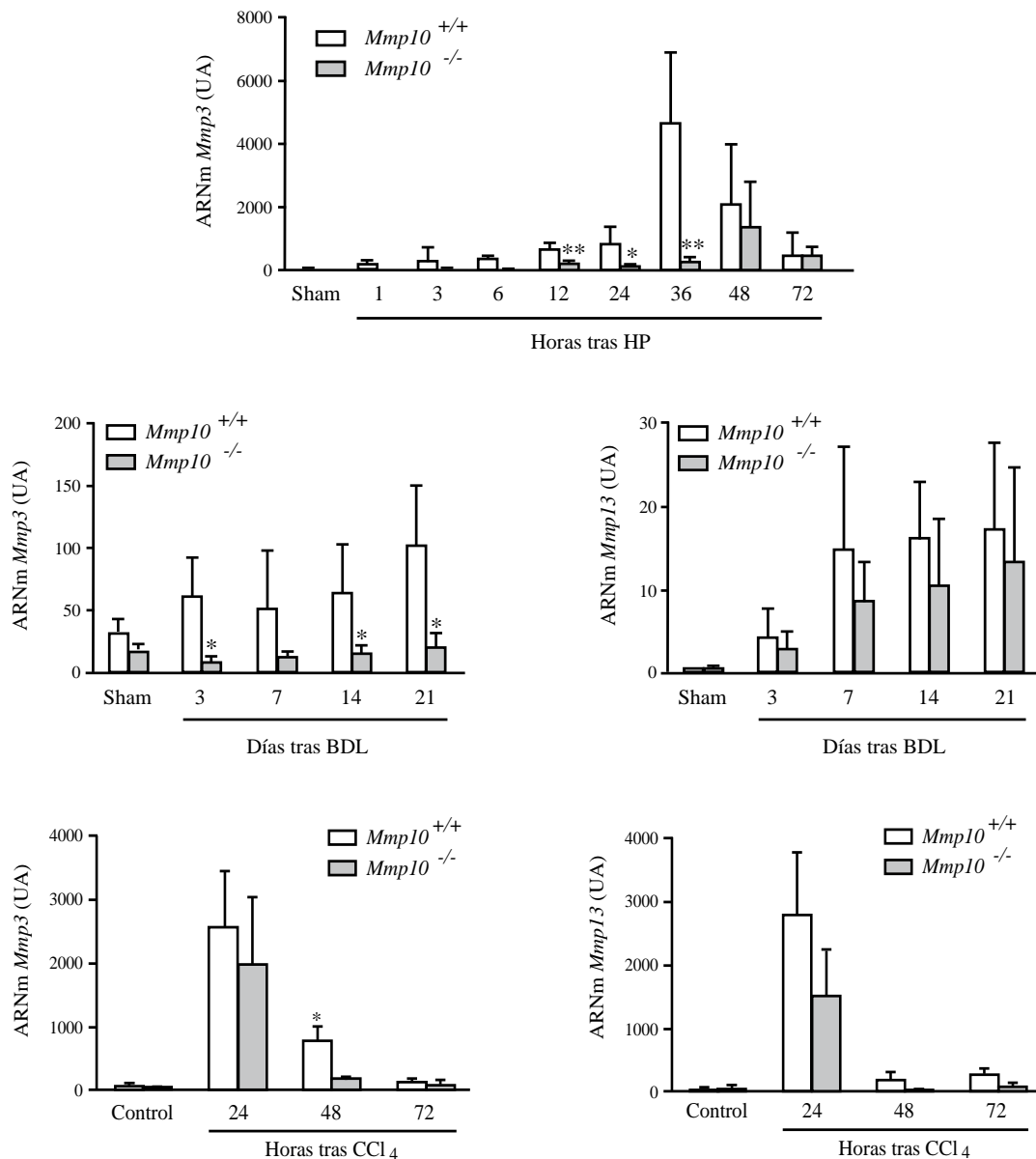


Figura 15. Expresión de la *Mmp3* y la *Mmp13* en los ratones *MMP10*^{+/+} y *MMP10*^{-/-} sometidos a diferentes modelos de daño y regeneración hepática. La expresión del ARNm de las MMPs fue analizada mediante PCR a tiempo real a los diferentes tiempos indicados tras los modelos experimentales de hepatectomía parcial (HP), daño colestásico (BDL) y daño agudo por CCl₄. Los asteriscos indican P < 0,05 respecto a los ratones *MMP10*^{+/+}. UA: Unidades arbitrarias.

3.1. Modelo de hepatectomía parcial (HP)

Llevamos a cabo un estudio comparativo empleando ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ sometidos a hepatectomía parcial del 70% con el fin de evaluar la relevancia de la MMP10 durante la regeneración hepática. Realizamos un seguimiento de la supervivencia y del crecimiento hepático hasta 7 días después de la intervención. No observamos diferencias significativas entre la supervivencia de nuestra colonia $MMP10^{+/+}$ tras la HP, que rondaba el 85% de supervivencia, y la de otras colonias $MMP10^{+/+}$ sometidas a dicho protocolo experimental [98, 99]. Sin embargo, la supervivencia de los ratones $MMP10^{-/-}$ tras la HP estaba significativamente disminuida (figura 16 A), tan solo un 36% de estos animales era capaz de sobrevivir hasta los 7 días. La recuperación de la masa hepática por parte del tejido hepático remanente en los ratones $MMP10^{-/-}$ estaba ligeramente retrasada entre las 72 y las 96 h post resección, aunque aquellos animales capaces de sobrevivir acababan recuperando los valores normales de peso hepático (figura 16 B).

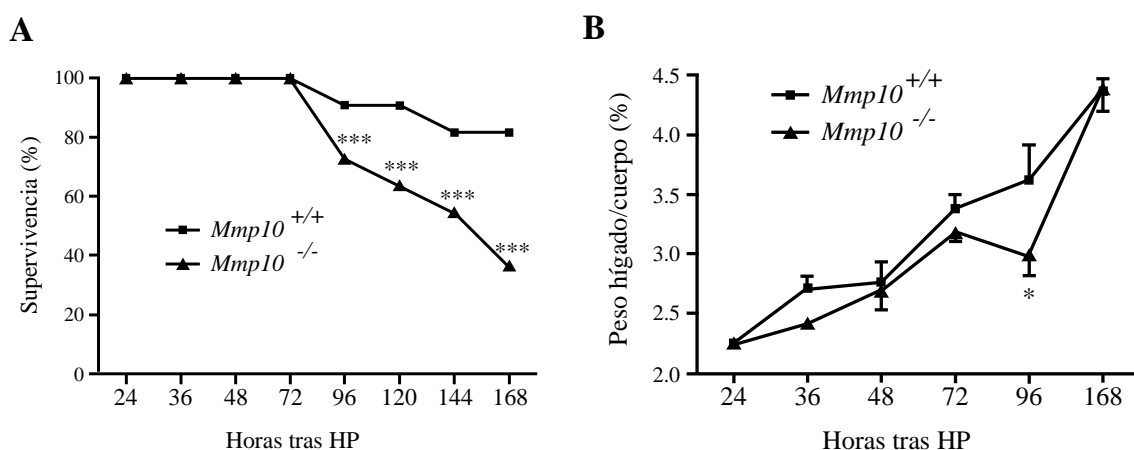


Figura 16. Supervivencia y crecimiento hepático de los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ sometidos a hepatectomía parcial del 70%. A) Monitorización de la supervivencia de los ratones (n = 15 por genotipo) hasta los 7 días tras la HP. Los asteriscos indican $P < 0,001$ respecto a $MMP10^{+/+}$. B) Regeneración hepática representada a las diferentes horas tras la HP como la relación entre el peso hepático y el corporal, que fueron medidos en el momento del sacrificio. El asterisco indica $P < 0,05$ respecto a $MMP10^{+/+}$.

Por otro lado y en concordancia con esta alteración en la supervivencia tras la HP, se observan extensas áreas de necrosis que se acumulan a diferentes tiempos en el parénquima hepático de los ratones $MMP10^{-/-}$, que, como puede apreciarse en las secciones hepáticas teñidas con hematoxilina y eosina de la figura 17 A, son

significativamente mayores a las detectadas en los $MMP10^{+/+}$. Del mismo modo, los niveles de transaminasas circulantes en sangre, utilizados como medida para evaluar el grado de lesión hepatocelular, también resultaron ser más altos en los ratones $MMP10^{-/-}$ a las 24 y 48 horas post-intervención, además permanecieron elevados a tiempos más tardíos que en los $MMP10^{+/+}$ (figura 17 B).

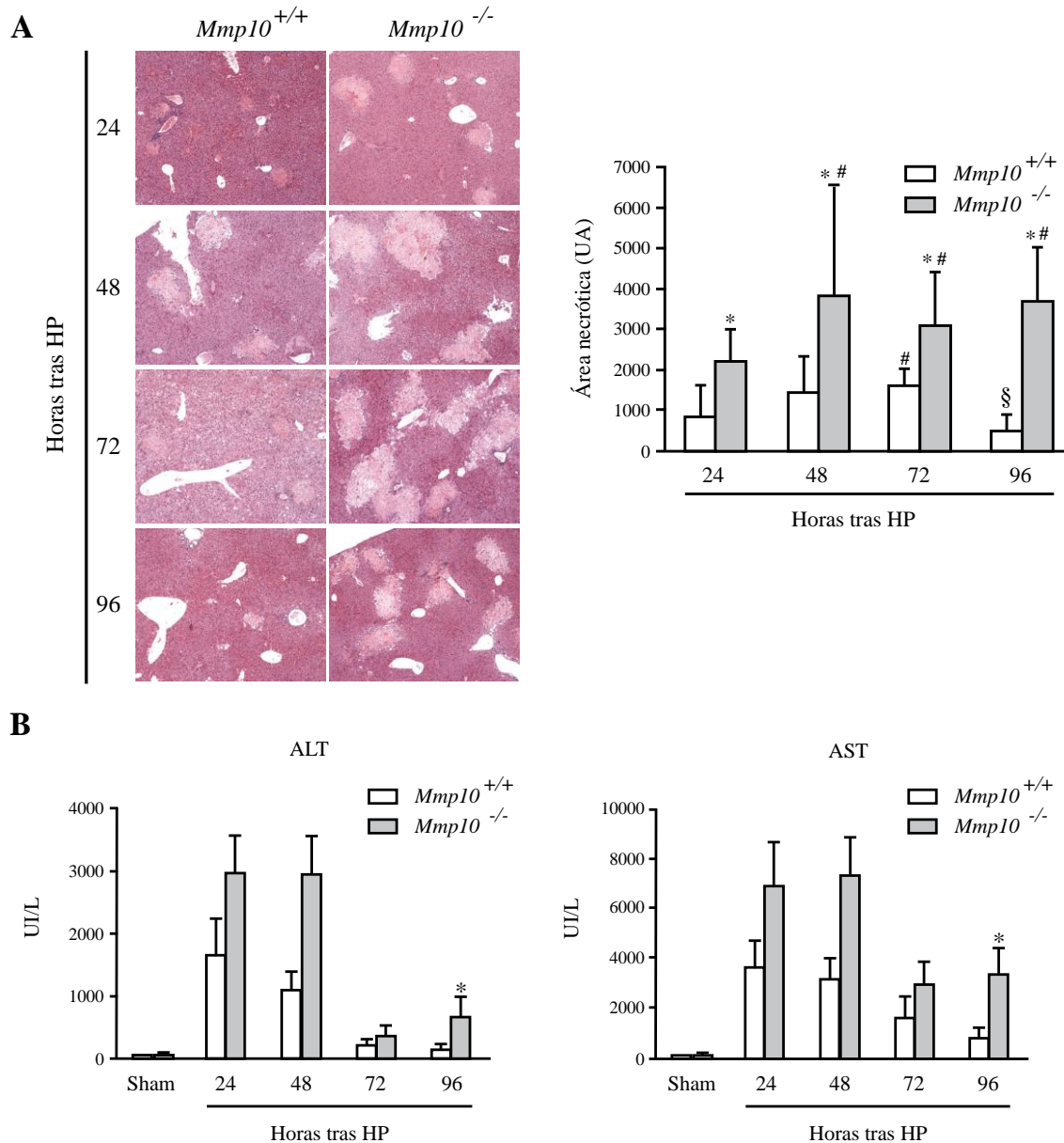


Figura 17. Análisis de las lesiones necróticas y de los niveles séricos de transaminasas en los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ sometidos a hepatectomía parcial del 70%. A) Imágenes representativas de secciones de tejido hepático teñidas con hematoxilina y eosina a diferentes horas tras la HP (aumento a 40X). La gráfica muestra el análisis cuantitativo de las lesiones necróticas. Los asteriscos indican $P < 0,05$ respecto a $MMP10^{+/+}$, # indica $P < 0,05$ respecto a los valores a 24 h y § indica $P < 0,05$ respecto a los valores a 48 y 72 h. UA: Unidades arbitrarias. B) Niveles de ALT y AST en muestras de suero tomadas a diferentes horas tras la HP. Los asteriscos indican $P < 0,05$ respecto a $MMP10^{+/+}$.

También, evaluamos la síntesis de ADN en las células parenquimales de los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ tras la hepatectomía. Para ello, se determinó mediante inmunohistoquímica la incorporación del nucleótido BrdU, previamente inyectado a los ratones, en el ADN de los hepatocitos en proliferación, lo que permite estimar la proporción de células en la fase S del ciclo celular. Como se aprecia en la figura 18, no detectamos diferencias significativas en la síntesis de ADN entre los dos genotipos de ratones durante la regeneración.

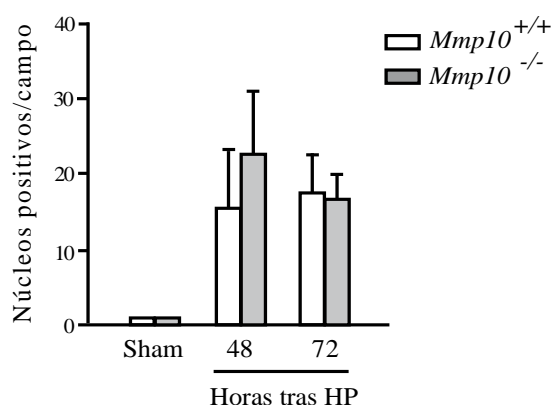


Figura 18. Evaluación de la síntesis de ADN en el hígado de los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ tras HP. Cuantificación de la incorporación del nucleótido BrdU en secciones de hígado de los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ a las 48 y 72 h tras la HP. Los hepatocitos marcados con BrdU se cuantificaron en 5 campos aleatorios con el objetivo 20X.

El conjunto de resultados obtenidos en el modelo de hepatectomía del 70% parecen indicar que la expresión de la MMP10 es necesaria para la regeneración hepática, participando, probablemente, en la restauración de la arquitectura parenquimal como respuesta a un insulto en el tejido.

3.2. Modelo de daño colestásico (BDL)

Con la intención de tener una visión más amplia sobre el papel de la MMP10 en el daño y la regeneración hepáticos, analizamos la respuesta de los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ al daño colestásico por ligadura del conducto biliar. El modelo experimental de BDL se caracteriza por presentar áreas prominentes de necrosis hepatocelular, conocidas como “infartos biliares”, acompañadas por respuesta inflamatoria y desarrollo de fibrosis [55, 91, 100, 101]. El análisis histológico de las secciones hepáticas de

nuestros ratones sometidos a BDL, muestra lesiones necróticas en desarrollo en ambos genotipos. No obstante, dichas lesiones son más prominentes en los ratones $MMP10^{-/-}$ a partir de los 7 días tras la BDL (figura 19), momento en el que la expresión de la MMP10 aumenta en los $MMP10^{+/+}$ (figura 9).

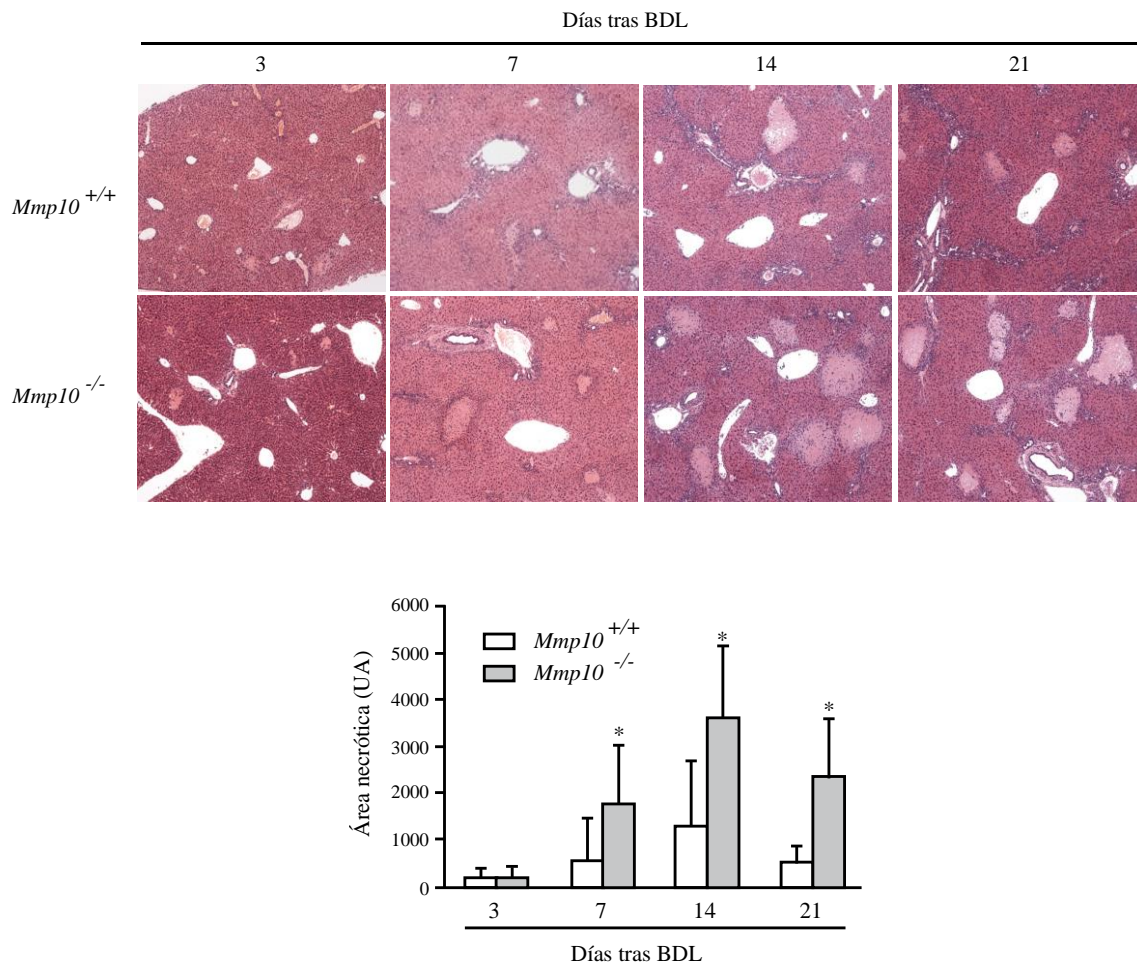


Figura 19. Lesiones necróticas en los hígados de los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ sometidos a ligadura del conducto biliar. Imágenes representativas de secciones de tejido hepático teñidas con hematoxilina y eosina a diferentes días tras la BDL (aumento 40X). La gráfica muestra el análisis cuantitativo de las lesiones necróticas. Los asteriscos indican $P < 0,05$ respecto a $MMP10^{+/+}$.

El análisis de los niveles de transaminasas circulantes en suero tras la BDL muestra un incremento similar en ambos genotipos de animales, pero en los ratones $MMP10^{-/-}$ los niveles de AST a tiempos tardíos resultaron ser significativamente más elevados que en los $MMP10^{+/+}$ (figura 20).

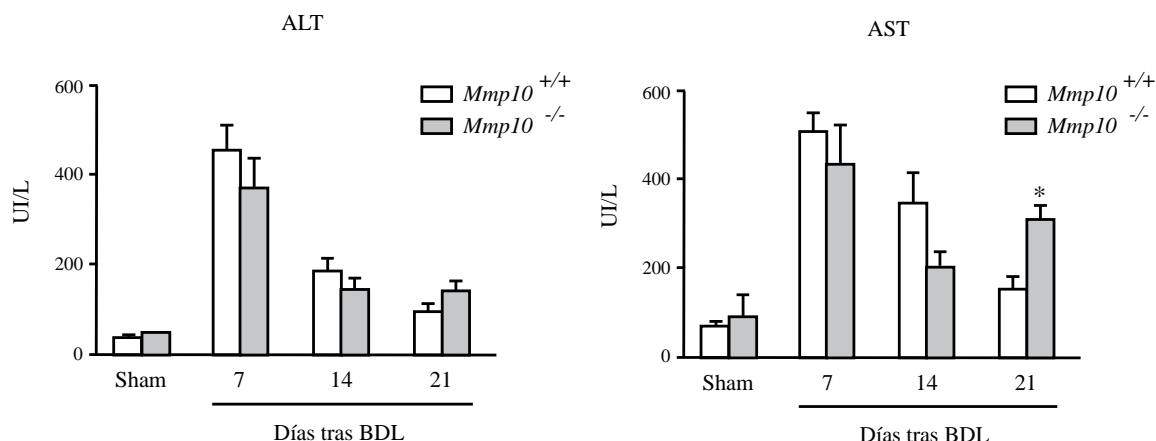


Figura 20. Análisis de los niveles séricos de transaminasas en ratones *MMP10*^{+/+} y *MMP10*^{-/-} sometidos a BDL. Niveles de ALT y AST en muestras de suero tomadas a diferentes días tras la ligadura. El asterisco indica $P < 0,05$ respecto a *MMP10*^{+/+}.

Al igual que ocurría en el modelo de HP, no vemos diferencias en la síntesis de ADN entre las dos cepas de ratones. En este caso la estimación se realizó mediante inmunohistoquímica para Ki67 y no se detectaron diferencias significativas entre los ratones *MMP10*^{+/+} y *MMP10*^{-/-} a ninguno de los tiempos analizados (figura 21).

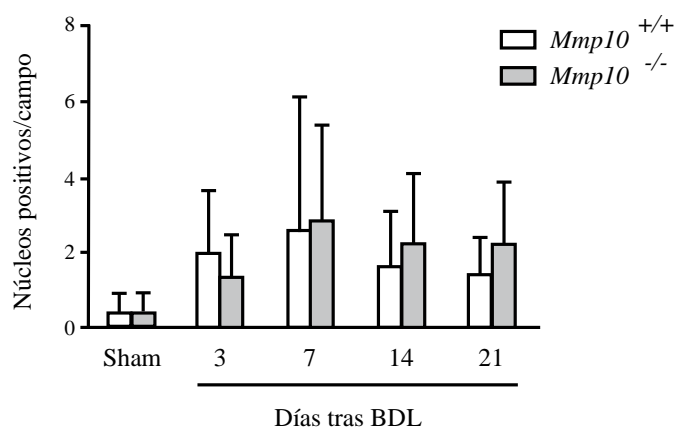


Figura 21. Evaluación de la síntesis de ADN en el hígado de los ratones *MMP10*^{+/+} y *MMP10*^{-/-} tras la BDL. Cuantificación de la inmunotinción de Ki67 en secciones de hígado de los ratones *MMP10*^{+/+} y *MMP10*^{-/-} a los diferentes días tras la BDL. Los hepatocitos marcados se cuantificaron en 5 campos aleatorios con el objetivo 20X.

Por otro lado, decidimos estudiar la fibrosis asociada a este modelo en los ratones *MMP10*^{+/+} y *MMP10*^{-/-}. Como puede apreciarse en la figura 22, el análisis morfométrico

de la tinción con Rojo Sirio de las secciones hepáticas muestra que los animales MMP10 deficientes presentan valores significativamente más elevados que los MMP10^{+/+} a los 7 y 14 días tras la BDL. Por tanto, parece que en estos ratones la exacerbación de la lesión necrótica viene acompañada por una mayor deposición de matriz extracelular (MEC).

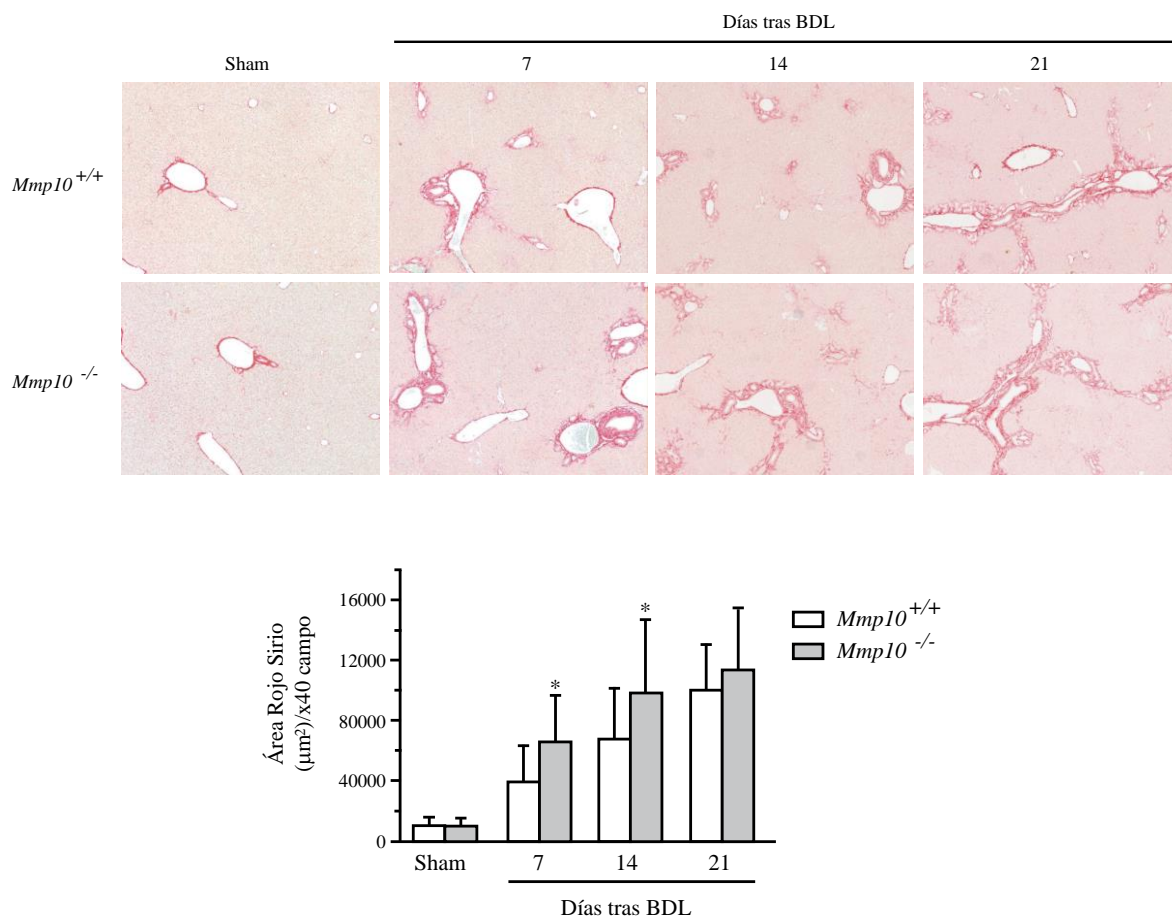


Figura 22. Fibrosis hepática en los ratones MMP10^{+/+} y MMP10^{-/-} sometidos a ligadura del conducto biliar. Imágenes representativas de secciones de tejido hepático teñidas con Rojo Sirio a diferentes días tras la BDL (aumento 40X). La gráfica muestra el análisis cuantitativo del área teñida. Se analizaron 5 campos aleatorios (40X) por muestra. Los asteriscos indican $P < 0,05$ respecto a MMP10^{+/+}.

Consecuentemente, la expresión de la α -actina del músculo liso (α SMA), que es un marcador de células productoras de MEC activadas [53], como la de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1), que está implicada en la fibrosis inducida por el daño colestásico asociado a BDL [91], está significativamente aumentada en los ratones MMP10^{-/-} (figuras 23 A y B).

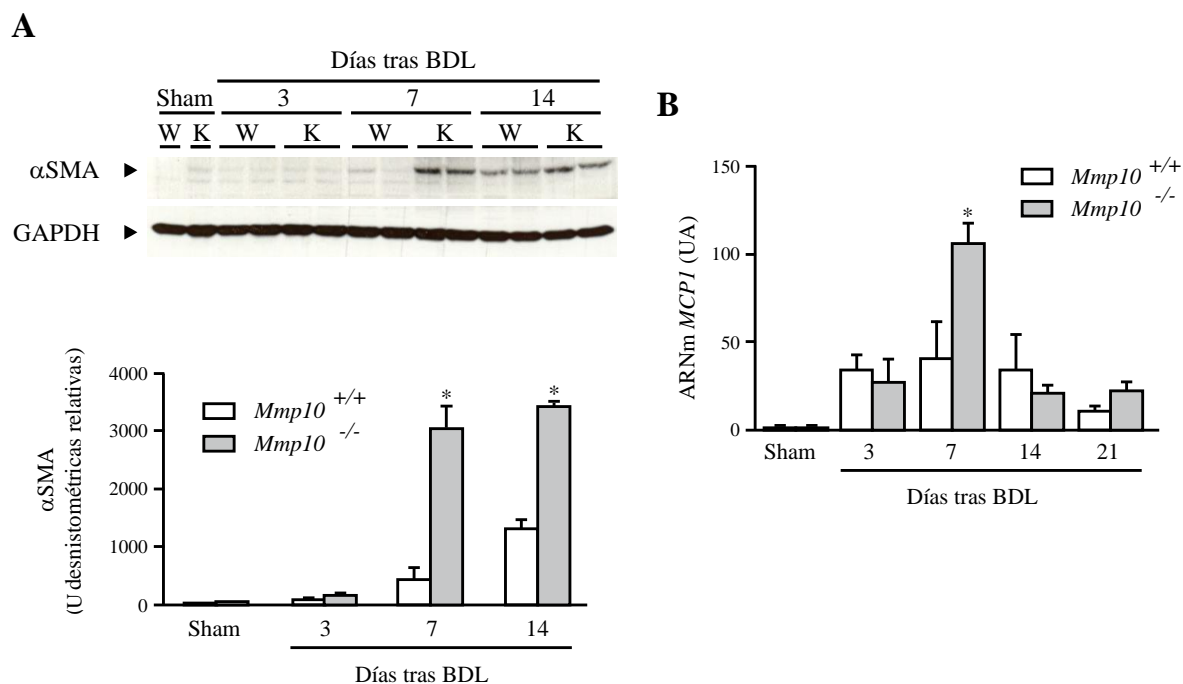


Figura 23. Expresión hepática de α SMA y *Mcp1* en los ratones *MMP10*^{+/+} (W) y *MMP10*^{-/-} (K) sometidos a BDL. A) Western blot de la proteína α SMA obtenida de extracto hepático a diferentes días tras la ligadura. La gráfica muestra en unidades densitométricas relativas la cuantificación de las bandas de α SMA. Los asteriscos indican $P < 0,05$ respecto a *MMP10*^{+/+}. B) Los niveles de *Mcp1* fueron medidos por PCR a tiempo real en muestras hepáticas de ratones sacrificados a diferentes días tras la BDL. El asterisco indica $P < 0,05$ respecto a *MMP10*^{+/+}.

Los resultados, en su conjunto, nos muestran que en ausencia de la MMP10 los ratones sometidos a daño colestásico por BDL presentan mayor daño y mayor fibrosis hepática que los *MMP10*^{+/+}, cuya expresión de la MMP10 es normalmente inducida en respuesta al insulto hepático y la regeneración.

3.3. Modelo de daño hepático agudo (CCl₄)

Para completar nuestro conocimiento acerca del papel de la MMP10 en la respuesta hepática al daño, analizamos los efectos de la administración aguda del hepatotóxico CCl₄ en los ratones *MMP10*^{+/+} y *MMP10*^{-/-}. En este modelo experimental se produce un daño hepático por estrés oxidativo en el que acontecen fenómenos de inflamación, necrosis y apoptosis que preceden a una respuesta regeneradora que trata de restaurar la masa hepática perdida [102]. El análisis histológico de las secciones hepáticas de los ratones inyectados intraperitonealmente con CCl₄, muestra lesiones necróticas en ambos

genotipos (figura 24). Sin embargo, como ocurría en los anteriores modelos de HP y BDL, dichas lesiones son significativamente más extensas en los ratones $MMP10^{-/-}$ a todos los tiempos analizados (figura 24).

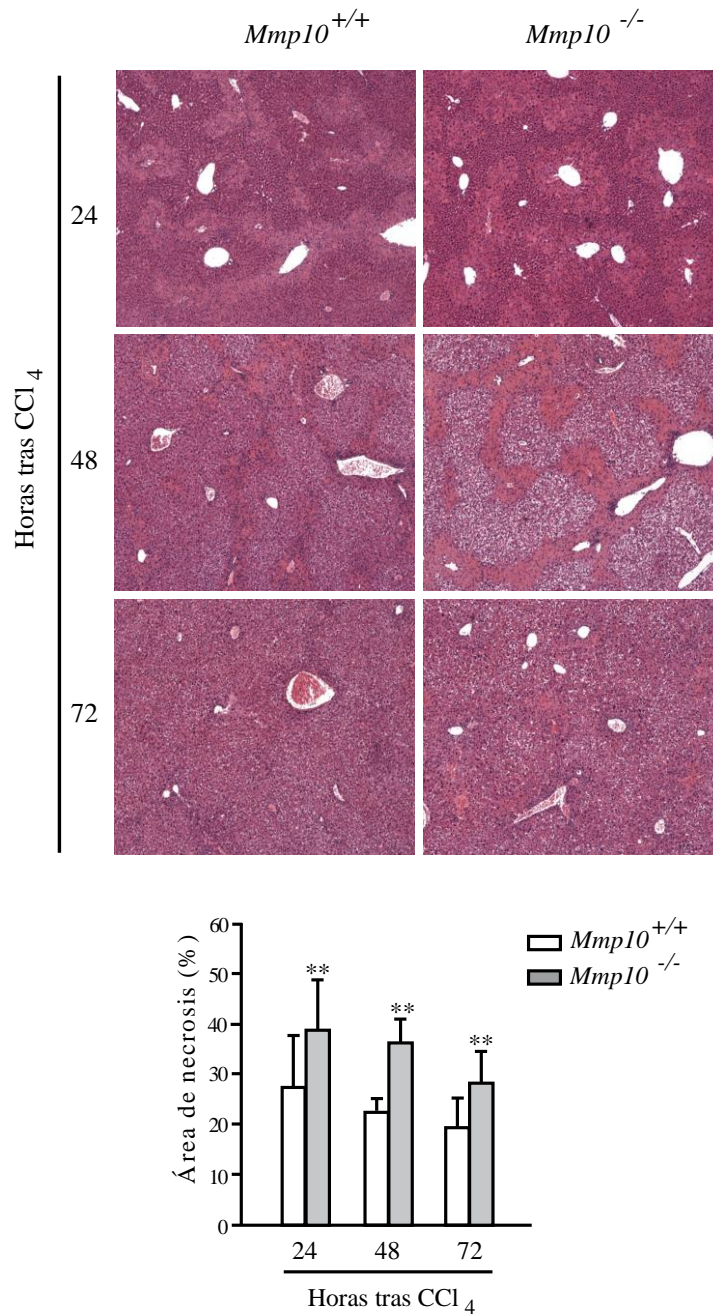


Figura 24. Lesiones necróticas en los hígados de los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ sometidos a daño agudo por tetracloruro de carbono. Imágenes representativas de secciones de tejido hepático teñidas con hematoxilina y eosina a diferentes horas tras la inyección de CCl₄ (aumento 40X). La gráfica muestra el análisis cuantitativo de las lesiones necróticas. Los asteriscos indican $P < 0,01$ respecto a los ratones $MMP10^{+/+}$.

Para completar la valoración del grado de lesión hepatocelular inducido por el hepatotóxico, se analizaron los niveles de transaminasas circulantes en suero a diferentes horas tras la inyección con CCl_4 . Como se aprecia en la figura 25, en ambos genotipos se produce un marcado incremento de las transaminasas a las 24 y 48 h tras la administración del compuesto químico, pero en los ratones $\text{MMP10}^{-/-}$ el aumento de los niveles de ALT resultó ser, a ambos tiempos, significativamente superior al detectado en los $\text{MMP10}^{+/+}$.

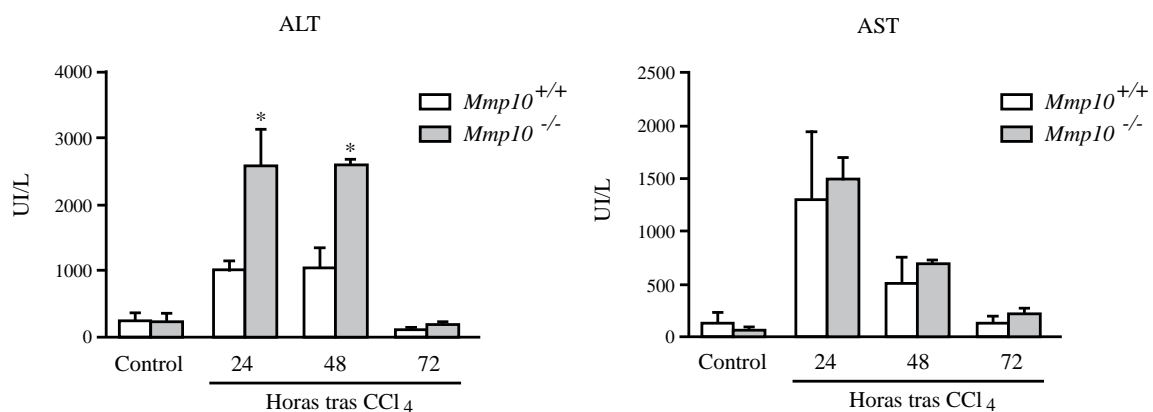


Figura 25. Análisis de los niveles séricos de transaminasas en ratones $\text{MMP10}^{+/+}$ y $\text{MMP10}^{-/-}$ inyectados con CCl_4 . Niveles de ALT y AST en muestras de suero tomadas a diferentes horas tras la administración de CCl_4 . Los asteriscos indican $P < 0,05$ respecto a $\text{MMP10}^{+/+}$.

Como veíamos en el modelo de BDL, los niveles de expresión de la αSma , marcador de células productoras de MEC activadas, están aumentados en los ratones $\text{MMP10}^{-/-}$, especialmente a las 48 horas tras la administración del CCl_4 (figura 26).

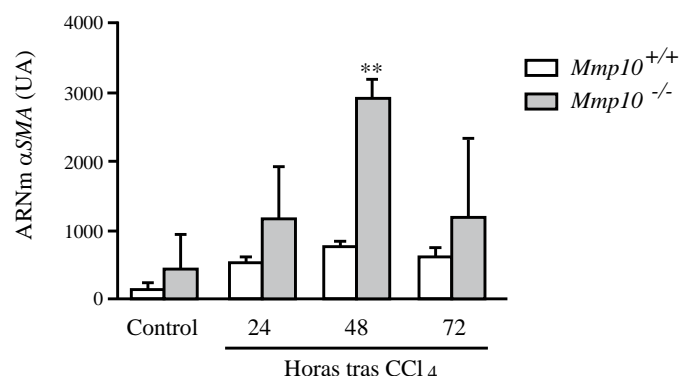


Figura 26. Expresión hepática de αSma en los ratones $\text{MMP10}^{+/+}$ y $\text{MMP10}^{-/-}$ tratados con CCl_4 . Los niveles de expresión del ARNm de la αSma fueron medidos por PCR a tiempo real en muestras hepáticas de ratones sacrificados a diferentes horas tras la inyección de CCl_4 . Los asteriscos indican $P < 0,01$ respecto a $\text{MMP10}^{+/+}$. UA: Unidades arbitrarias.

Por lo tanto, vemos como en respuesta a un insulto hepatotóxico la inducción de la expresión de la MMP10 parece tener un papel protector en hígado, ya que los ratones MMP10 deficientes muestran un mayor daño hepatocelular con áreas necróticas más extensas y mayor activación de células productoras de matriz.

4. MECANISMOS POR LOS QUE LA MMP10 PUEDE CONTRIBUIR A LA REPARACIÓN TISULAR HEPÁTICA

Tras determinar que la expresión de la MMP10 es necesaria para la regeneración y reparación del tejido hepático, nos preguntamos cuáles serían los mecanismos relevantes de su función protectora. Se han identificado múltiples sustratos posibles para la MMP10, pero pocos han sido bien caracterizados *in vivo*. En este contexto, la recientemente descrita actividad profibrinolítica de la MMP10 [42] podría ser funcionalmente significativa dada la importancia del adecuado recambio de la MEC provisional, rica en fibrinógeno, formada durante el daño y la reparación hepática [28, 30, 76, 103-105]. Por consiguiente, decidimos determinar los niveles intrahepáticos de fibrinógeno en la fracción de proteínas insolubles [106] procedentes de los hígados de los ratones sometidos a los modelos de HP, BDL y daño agudo por CCl₄. Como se observó en estudios anteriores [30, 105], detectamos un incremento significativo de la banda de 100 kDa correspondiente a dímeros de fibrinógeno γ insolubles formados en el proceso de daño hepático (figura 27). Curiosamente, los ratones MMP10^{-/-} mostraban una mayor acumulación hepática de dímeros de fibrinógeno γ insolubles que los animales MMP10^{+/+} tras someterlos a HP, BDL y administración aguda de CCl₄ (figura 27).

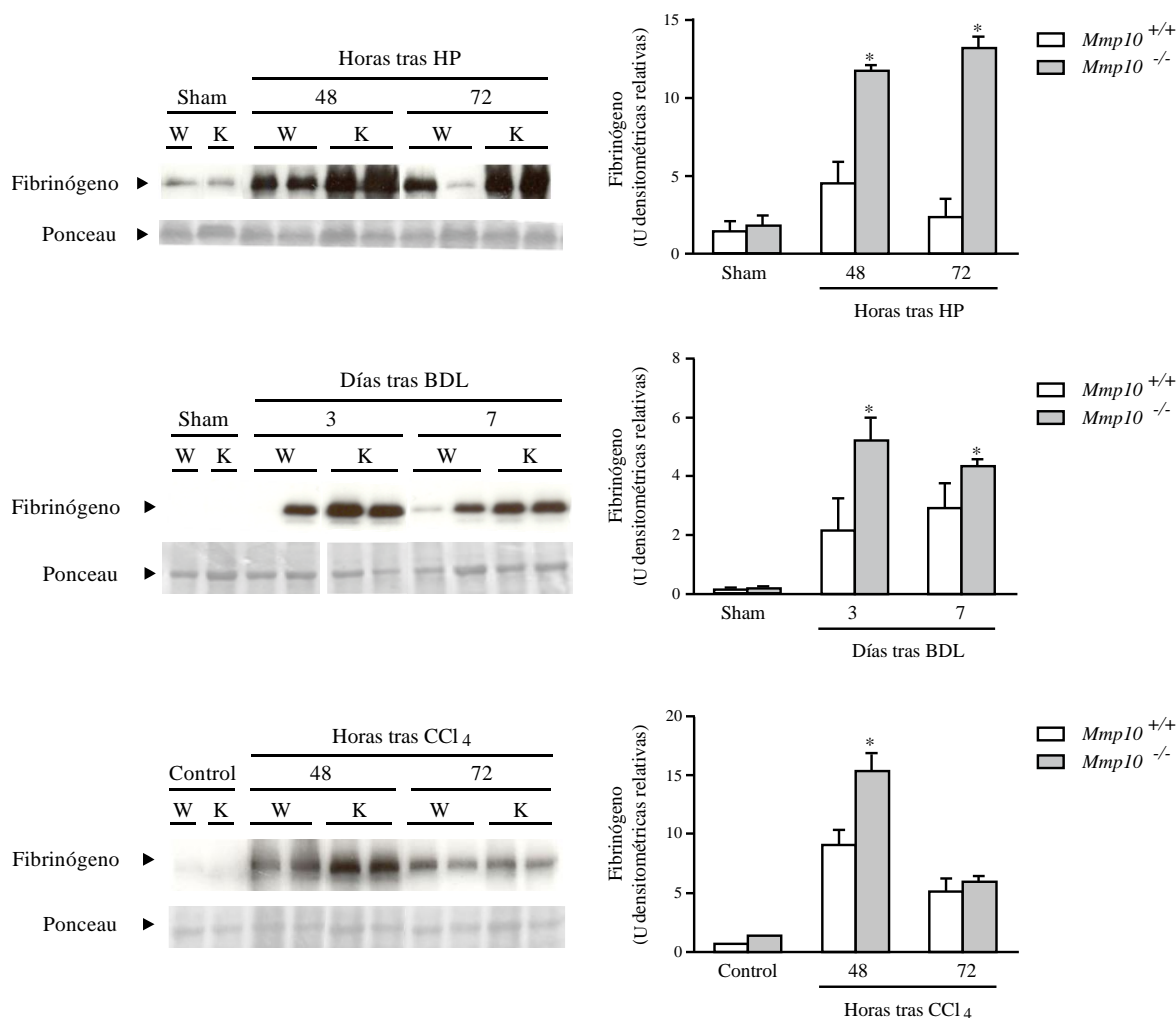


Figura 27. Análisis de los niveles de fibrinógeno en la fracción proteica insoluble del hígado de ratones $MMP10^{+/+}$ (W) y $MMP10^{-/-}$ (K) sometidos a modelos de daño/regeneración. Western blot representativo de los dímeros de fibrinógeno γ presentes en la fracción insoluble a los diferentes tiempos tras HP, BDL y CCl_4 . Una banda representativa teñida con ponceau es utilizada como control de carga. Las gráficas muestran, en unidades densitométricas relativas, la cuantificación de la banda de fibrinógeno. Los asteriscos indican $P < 0,05$ respecto a $MMP10^{+/+}$.

Como dato complementario, también realizamos inmunohistoquímica de fibrinógeno en las secciones de tejido hepático del modelo de daño agudo por CCl_4 . Al igual que en la figura 27, se aprecia una mayor deposición de fibrinógeno en el parénquima hepático de los ratones $MMP10^{-/-}$, especialmente a las 48 horas tras la administración del hepatotóxico (figura 28).

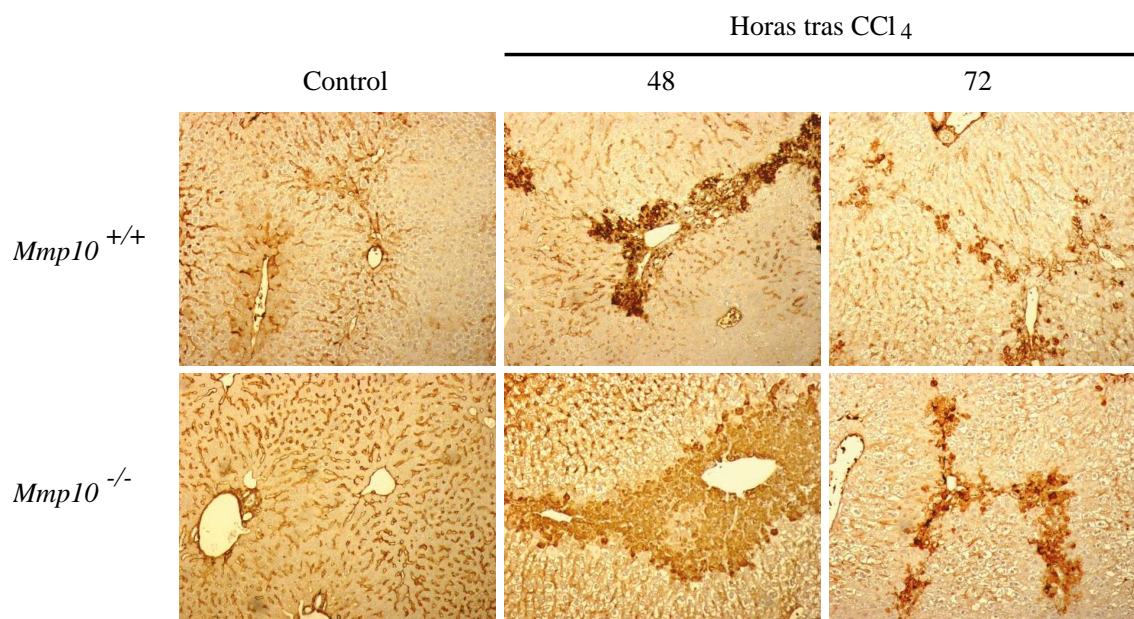


Figura 28. Análisis de los depósitos de fibrinógeno en los hígados de ratones *MMP10*^{+/+} y *MMP10*^{-/-} sometidos a daño agudo por CCl₄. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica para fibrinógeno en secciones de tejido hepático a diferentes horas tras la administración de CCl₄ (aumento 40X).

Otro de los componentes importantes de la MEC provisional formada durante la reparación hepática es la fibronectina [30, 107]. Además de los monómeros de fibronectina de 250 kDa, durante el daño y la reparación del tejido hepático, en la fracción proteica insoluble, se pueden encontrar complejos entrecruzados de mayor peso molecular [30]. De acuerdo con esto, detectamos un aumento en los niveles de fibronectina de 250 kDa y de los complejos de mayor peso molecular en la fracción de proteínas insolubles de los hígados de los ratones sacrificados a diferentes tiempos tras la BDL, y la abundancia de dichos complejos resultó ser superior en los ratones *MMP10*^{-/-} (figura 29 A). Resultados similares se obtuvieron de la inmunohistoquímica de fibronectina realizada en las secciones hepáticas de los ratones sometidos al modelo de daño agudo por inyección de CCl₄, donde se aprecia una mayor acumulación de fibronectina en los animales *MMP10*^{-/-}, especialmente a las 48 horas tras la administración (figura 29 B).

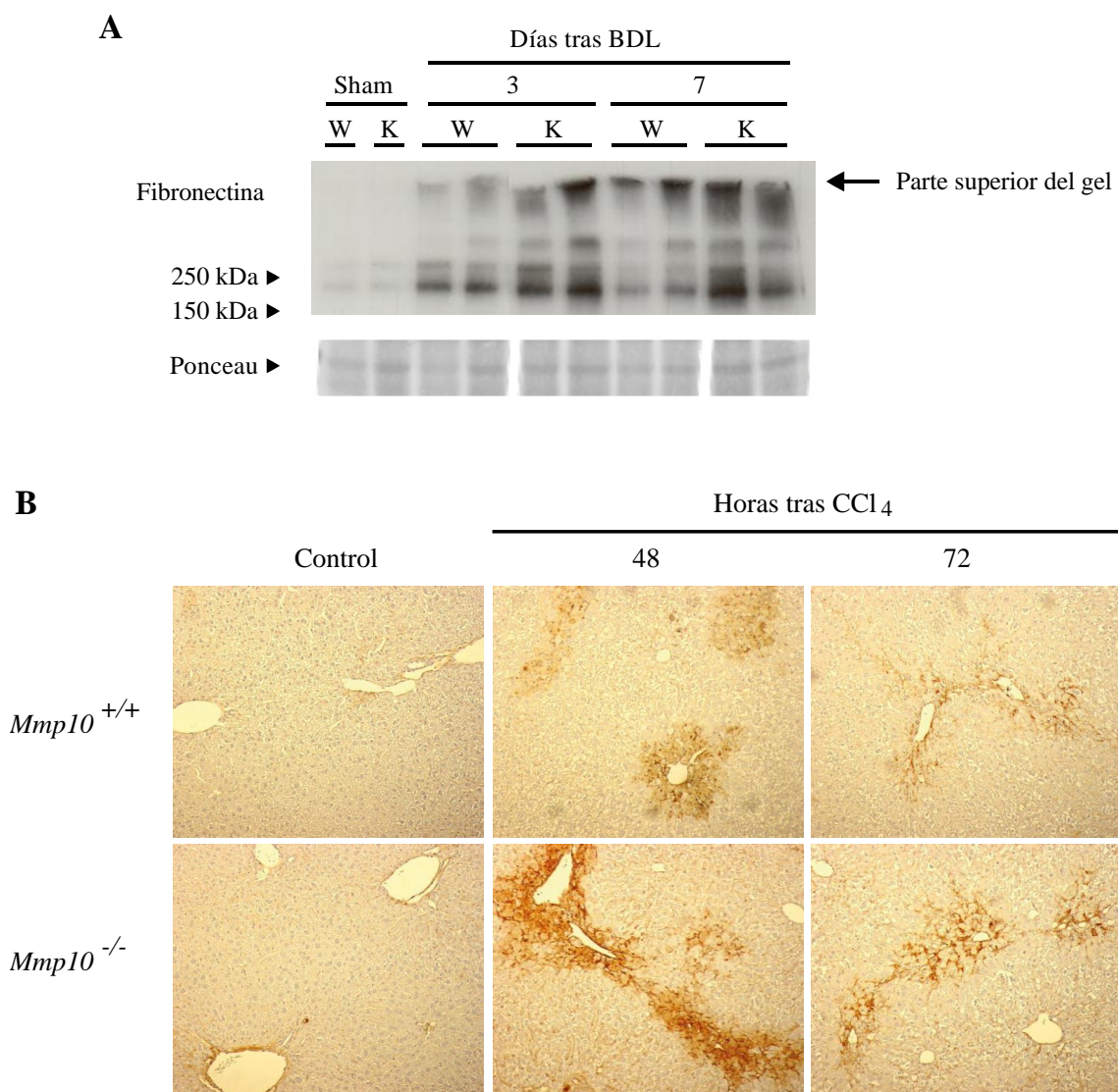


Figura 29. Análisis de los niveles de fibronectina en la fracción proteica insoluble y sus depósitos en el hígado de ratones MMP10^{+/+} (W) y MMP10^{-/-} (K) sometidos a modelos de daño/regeneración. A) Western blot representativo de fibronectina (250 kDa) y de complejos de mayor peso molecular presentes en la fracción insoluble a los 3 y 7 días tras BDL. Una banda teñida con ponceau es utilizada como control de carga. B) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica para fibronectina en secciones de tejido hepático a diferentes horas tras la administración de CCl₄ (aumento 40X).

Para determinar si la expresión de la MMP10 podría influir en el procesamiento de la fibronectina y sus complejos, analizamos los niveles de los fragmentos proteolíticos de la fibronectina previamente identificados *in vivo* y en células en cultivo [108, 109]. Como se observa en la figura 30, detectamos un claro aumento en la cantidad de fragmentos de fibronectina (en torno a 50 kDa) en los extractos de proteínas solubles procedentes de los hígados de los ratones MMP10^{+/+} tras la BDL y la administración de CCl₄. Estos fragmentos resultan ser mucho menos abundantes en los extractos

procedentes de los ratones $MMP10^{-/-}$, sugiriendo un posible papel de la MMP10 en el aclaramiento de los depósitos de fibronectina durante la reparación del tejido hepático.

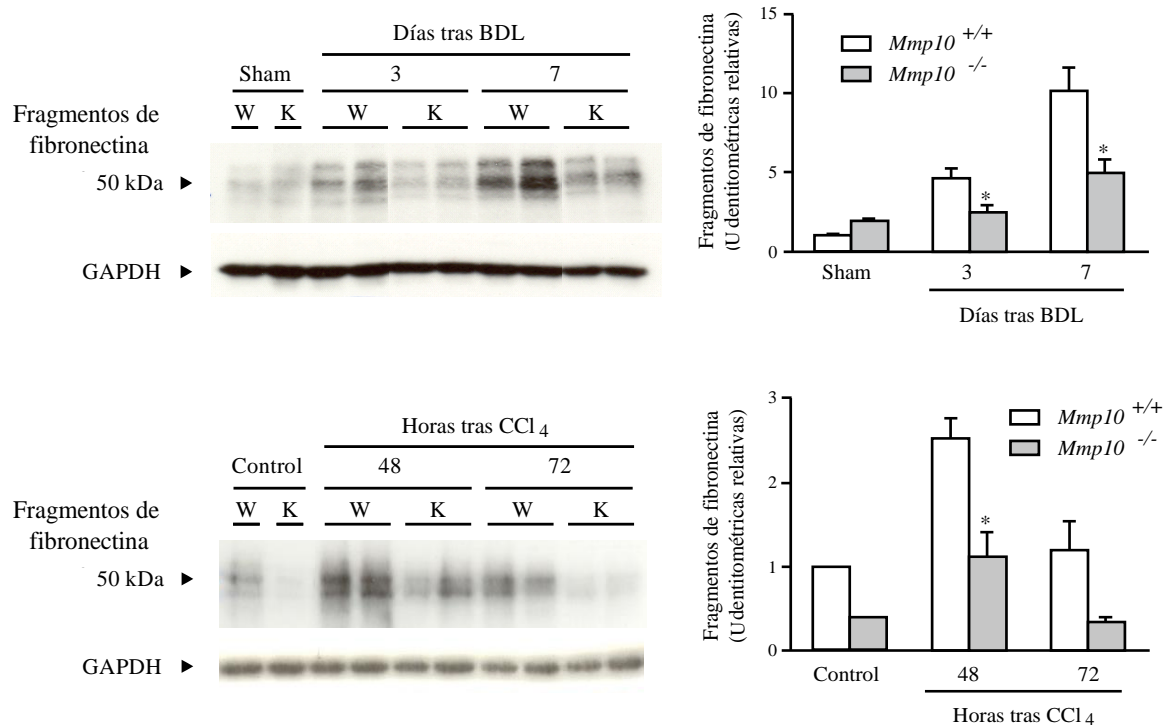


Figura 30. Análisis de los fragmentos de fibronectina en la fracción proteica soluble de los hígados de ratones $MMP10^{+/+}$ (W) y $MMP10^{-/-}$ (K) sometidos a modelos de daño/regeneración. Western blot representativos de los fragmentos de fibronectina presentes en la fracción soluble a los diferentes tiempos tras BDL y CCl₄. Las gráficas muestran, en unidades densitométricas relativas, la cuantificación de la banda de 50 kDa correspondiente a los fragmentos de fibronectina. Los asteriscos indican $P < 0,05$ respecto a $MMP10^{+/+}$.

Por tanto, la expresión de la MMP10 durante la respuesta hepática al daño y la regeneración parece estar implicada en la resolución de la matriz provisional, formada entre otros por fibrinógeno y fibronectina, cuyo aclaramiento es crucial para la restauración de la arquitectura hepática normal.

5. EXPRESIÓN DE LA MMP10 EN TEJIDO HEPÁTICO HUMANO NORMAL Y ENFERMO

Tras determinar la importancia de la MMP10 en el proceso de daño y regeneración del tejido hepático en modelos animales y teniendo en cuenta el creciente reconocimiento de las MMPs como moduladores del microambiente tumoral [51], decidimos estudiar su presencia en muestras humanas de tejido hepático enfermo. Para ello, analizamos la expresión de esta metaloproteasa en muestras de tejido hepático de individuos control, pacientes con cirrosis y tejido procedente de HCC. A pesar de que los niveles del ARN mensajero de la *MMP10* eran relativamente bajos en las muestras de hígado normal, su expresión estaba significativamente inducida en los hígados cirróticos y muestras de tejido tumoral (figura 31).

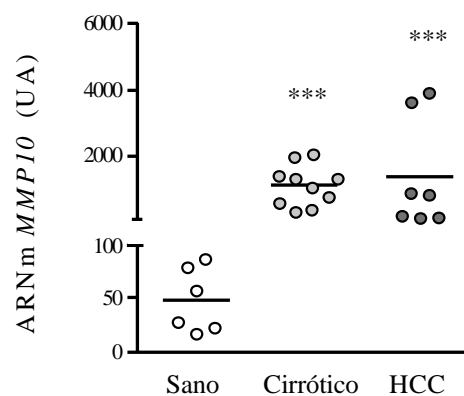


Figura 31. Expresión de la *MMP10* en muestras humanas de hígado normal y enfermo. La expresión del ARNm de la *MMP10* fue analizada mediante PCR a tiempo real en muestras de tejido hepático de pacientes sanos y cirróticos y de tejido de carcinoma hepatocelular (HCC). Los asteriscos indican $P < 0,001$ respecto al tejido hepático sano. UA: Unidades arbitrarias.

El análisis inmunohistoquímico de las muestras desveló que, en el hígado normal, la proteína MMP10 está principalmente localizada en los macrófagos o células de Kupffer y en menor proporción en algunas células biliares y hepatocitos (figura 32 A). Sin embargo en el hígado cirrótico, además de en macrófagos y células biliares, se aprecia una clara positividad para la MMP10 en racimos de hepatocitos, ya sea formando pequeños nódulos rodeados por tejido fibroso o agrupados en el lóbulo y rodeados por hepatocitos no marcados para la MMP10 (figuras 32 A y B). En las muestras de HCC,

la detección de la MMP10 en las células neoplásicas es incluso significativamente mayor que la observada en los hepatocitos del tejido cirrótico (figuras 32 A y B).

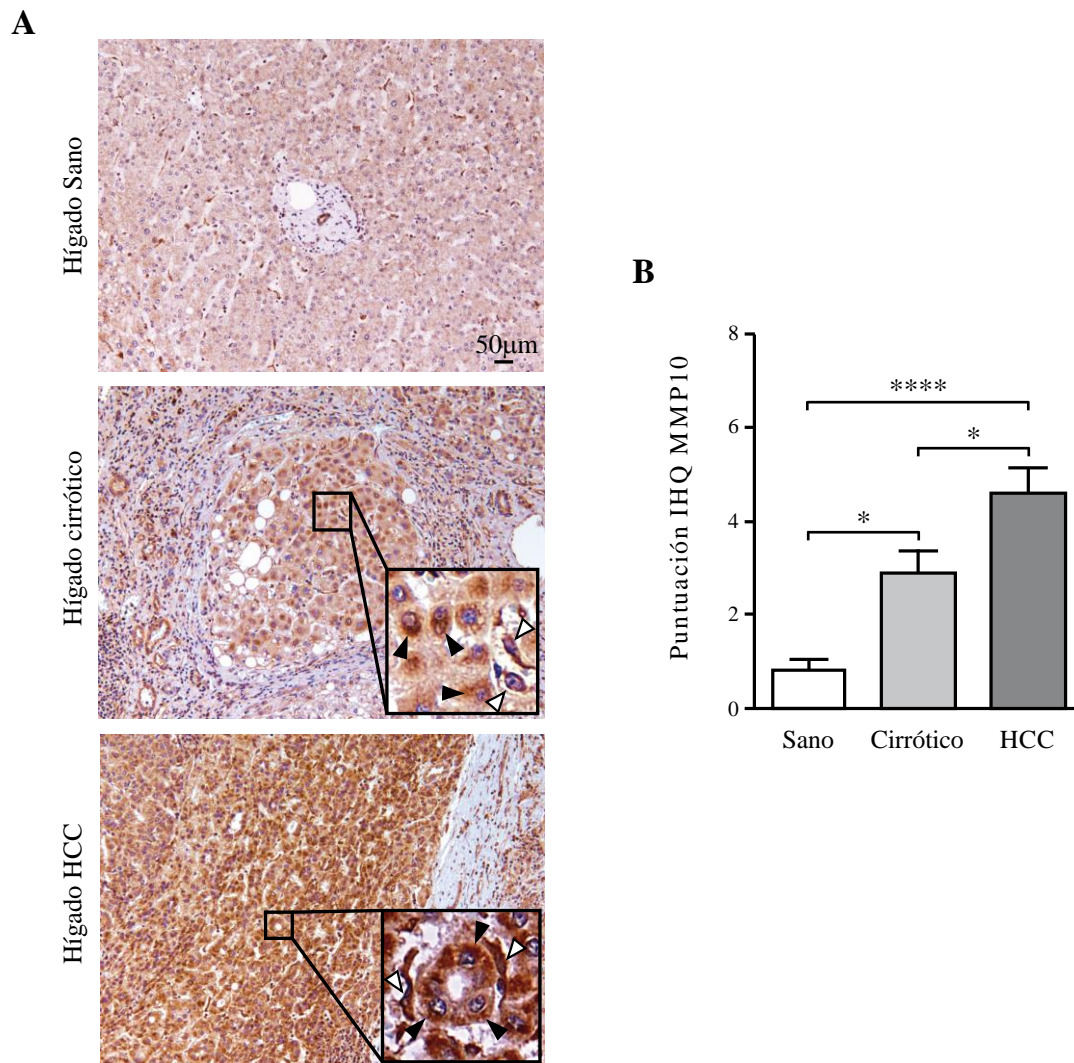


Figura 32. Detección de la MMP10 en muestras humanas de hígado normal y enfermo. A) Imágenes representativas de la detección de la proteína MMP10 por inmunohistoquímica (IHQ) en las secciones de tejido procedente de los hígados sanos (n=9), cirróticos (n=25) y con HCC (n=24) (aumento a 100X). En los recuadros con aumento (400X), las flechas negras señalan a los hepatocitos (en el caso del cirrótico) o a las células del acino tumoral (en HCC) positivas para la MMP10 y la blancas indican los macrófagos. B) Puntuación de la IHQ en base a la extensión de la señal positiva y su intensidad. Los asteriscos indican: * = $P < 0,05$ y **** = $P < 0,0001$.

La expresión de la MMP10 está significativamente inducida en los estados preneoplásicos de la enfermedad hepática, como se aprecia en las muestras de pacientes cirróticos, y sus valores están marcadamente elevados en las muestras de HCC, lo que podría sugerir la implicación de esta metaloproteasa en el desarrollo tumoral hepático.

6. EXPRESIÓN DE LA MMP10 EN UN MODELO DE CARCINOGENÉISIS HEPÁTICA EXPERIMENTAL (DEN)

Tras comprobar que la expresión de la MMP10 estaba significativamente inducida en las muestras humanas de HCC, decidimos realizar un modelo experimental de carcinogénesis hepática para analizar el papel de esta proteasa en el desarrollo tumoral en el hígado. Para ello, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con dietilnitrosamina (DEN) a los 14 días de edad. Tras la administración del carcinógeno, el desarrollo tumoral siguió su curso durante varios meses, antes de proceder al sacrificio y análisis de los ratones, que a los 5 meses ya presentaban tumores hepáticos. El primer paso fue analizar la expresión de la MMP10 en el hígado de dichos ratones. En la figura 33 puede apreciarse cómo los niveles de ARNm y proteína de esta MMP aumentan significativamente en el tejido hepático de los ratones tratados con DEN.

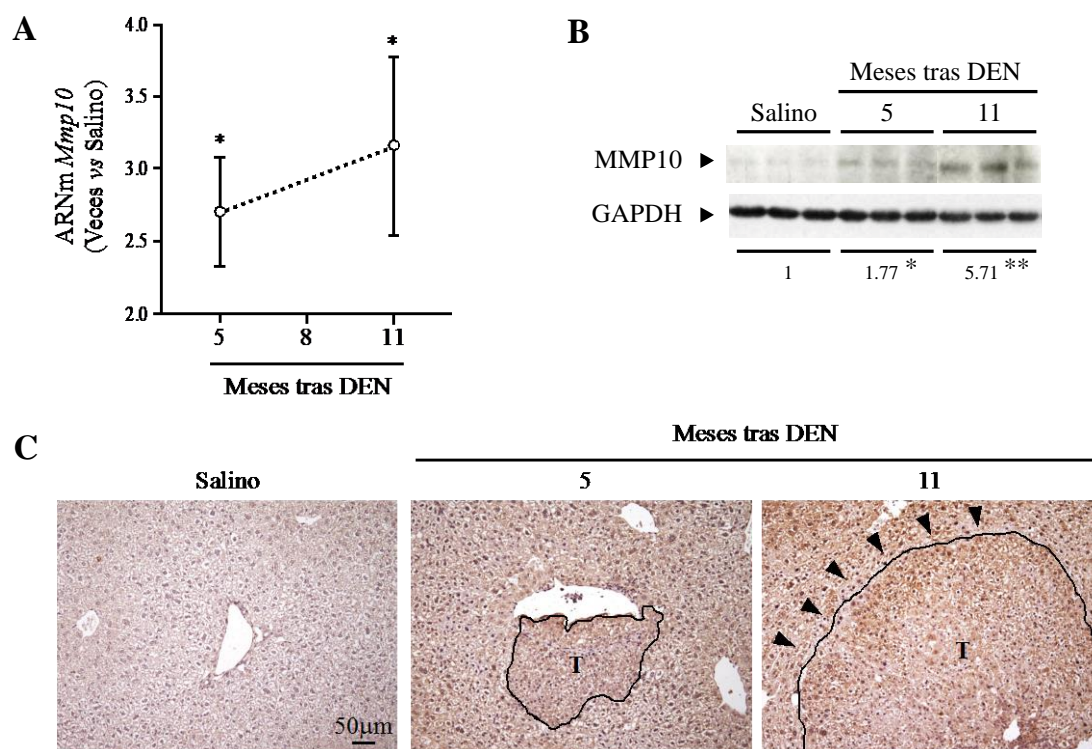


Figura 33. Expresión de la MMP10 en el HCC inducido por DEN. A) La expresión del ARNm de la *Mmp10* analizada mediante PCR a tiempo real en el hígado de los ratones a los 5 y 11 meses tras la inyección con DEN. Se representan los datos respecto a los valores obtenidos en los controles inyectados con solución salina. B) Análisis de la proteína MMP10 mediante western blot. C) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica para la MMP10 en las secciones hepáticas de los ratones. Las lesiones tumorales aparecen delimitadas por una línea y las flechas señalan la inmunotinción correspondiente a la MMP10 en el borde de un tumor (aumento a 100 X). Los asteriscos indican: * = $P < 0,05$ y ** = $P < 0,01$ respecto al control salino.

Además, observamos que la expresión de la MMP10 se incrementa con el desarrollo tumoral, obteniendo valores más elevados a los 11 meses de la administración (figura 33 A y B), tiempo en el que detectamos múltiples tumores de tamaño macroscópico en el tejido hepático. El análisis inmunohistoquímico muestra un aumento de la señal de la MMP10 en las lesiones tumorales del hígado de estos ratones (figura 33 C), confirmando las observaciones realizadas en las muestras de HCC humanas. Curiosamente, la señal correspondiente a la MMP10 muestra mayor intensidad en los bordes de los tumores de gran tamaño presentes a los 11 meses de la administración del carcinógeno (figura 33 C).

7. PAPEL DE LA MMP10 EN LA HEPATOCARCINOGENESIS

Con la intención de caracterizar el papel de la MMP10 en el desarrollo del HCC, decidimos comparar la respuesta de los ratones MMP10^{+/+} y MMP10^{-/-} durante la carcinogénesis hepática inducida por DEN. En base a los parámetros analizados macroscópicamente, detectamos que los ratones MMP10^{+/+} presentan una mayor incidencia tumoral (representada como porcentaje de ratones con lesiones tumorales macroscópicas) que los MMP10 deficientes a los 5 y 8 meses tras la administración del carcinógeno (figura 34 A). A los 11 meses, tiempo en el que todos los ratones presentan tumores independientemente del genotipo, el número de tumores de gran tamaño (> de 5 mm de diámetro) también resultó ser más elevado en los ratones MMP10^{+/+} (figura 34 A). El análisis histológico de las secciones hepáticas teñidas con hematoxilina y eosina muestra lesiones neoplásicas de menor diámetro en los hígados de los ratones MMP10^{-/-}, diferencia que alcanza valores estadísticos a los 11 meses, cuando ya apreciamos un claro desarrollo de HCC en los animales MMP10^{+/+} (figura 34 B).

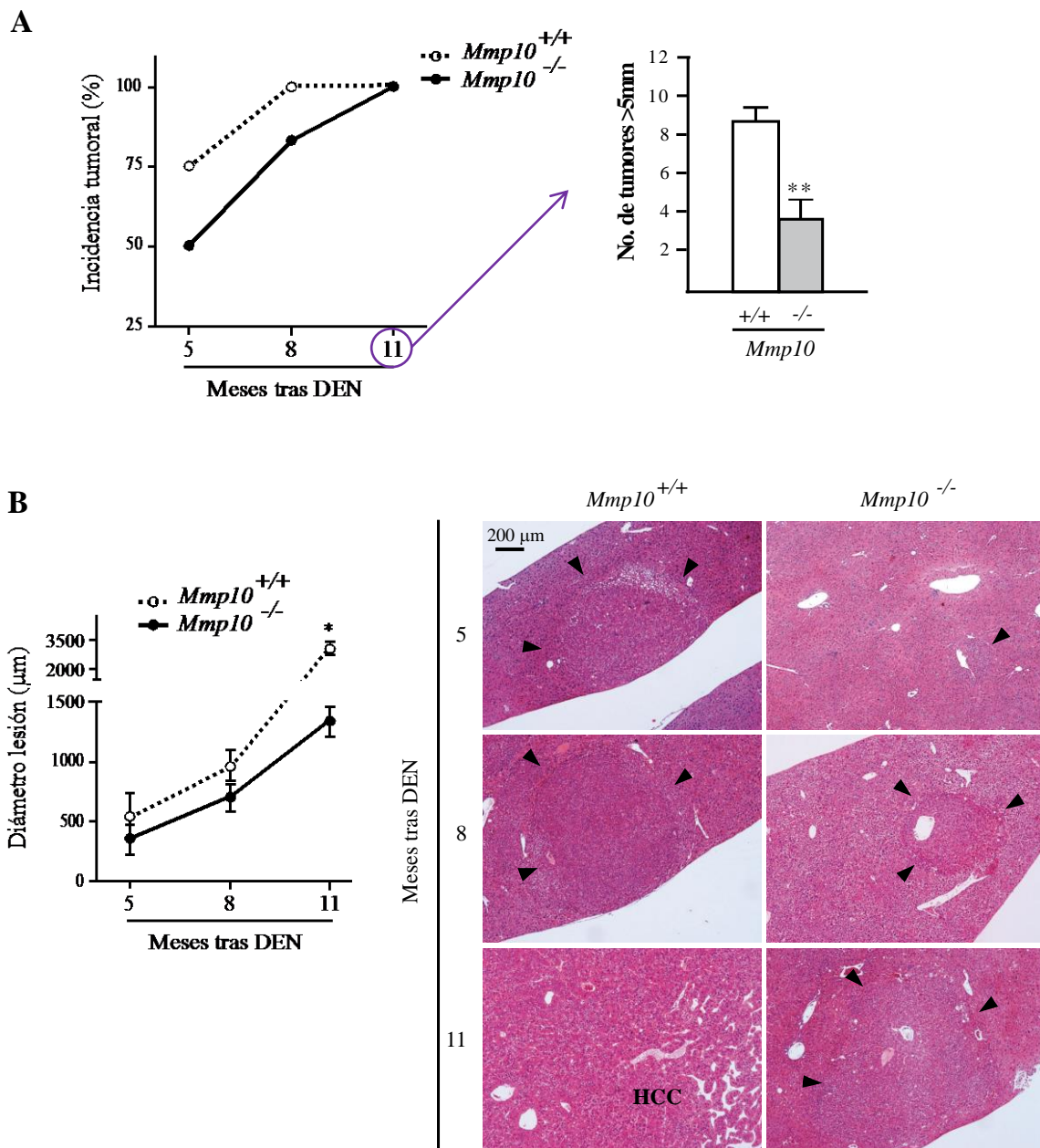


Figura 34. Análisis de la carcinogénesis hepática inducida por DEN en los ratones *MMP10*^{+/+} y *MMP10*^{-/-}. A) Incidencia tumoral representada como el porcentaje de ratones con lesiones tumorales macroscópicas a los diferentes meses tras la administración del DEN. La gráfica insertada a los 11 meses indica el número de grandes tumores (>5 mm de diámetro) a dicho tiempo. Los asteriscos indican $P < 0,01$ respecto a *MMP10*^{+/+}. B) Imágenes representativas de secciones de tejido hepático teñidas con hematoxilina y eosina a los diferentes meses tras la administración del carcinógeno. La gráfica muestra el diámetro medio de las lesiones neoplásicas. El asterisco indica $P < 0,05$ respecto a *MMP10*^{-/-}.

También evaluamos la proliferación hepatocelular en las áreas tumorales, que resultó ser significativamente más elevada en los ratones *MMP10*^{+/+} a los 8 y 11 meses tras la inyección del DEN (figura 35).

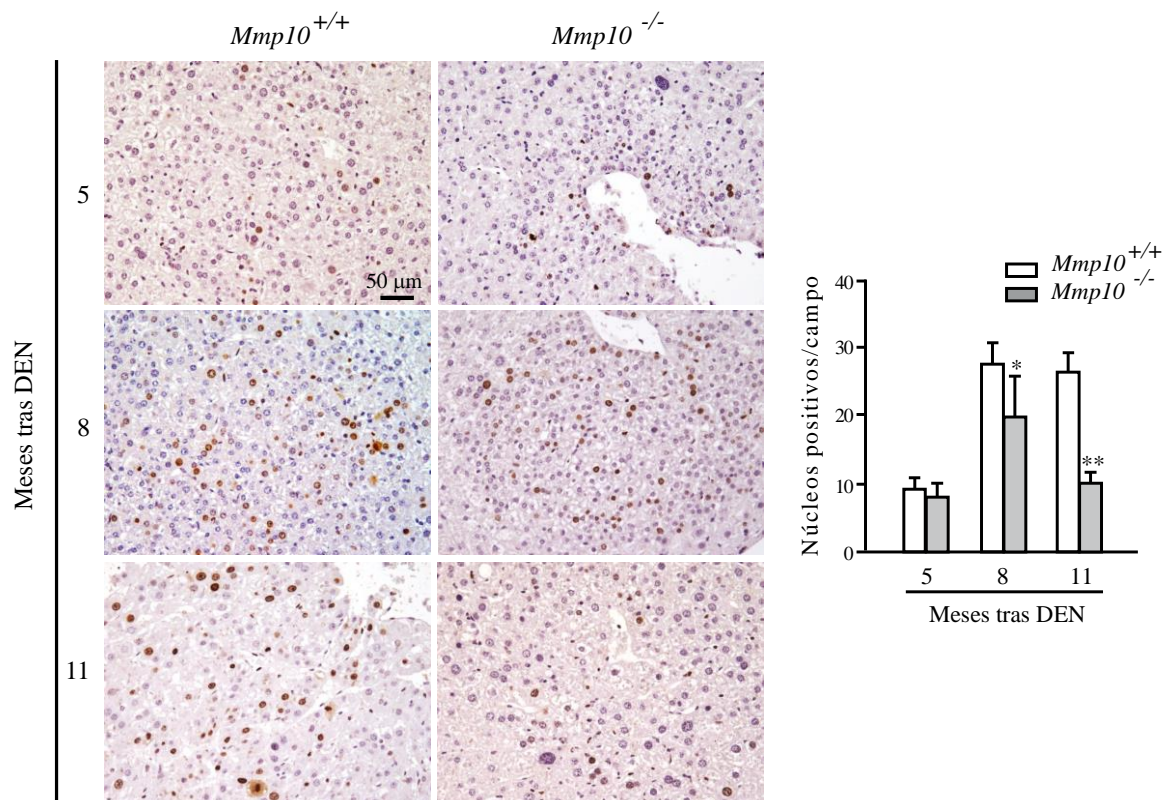


Figura 35. Evaluación de la síntesis de ADN en el hígado de los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ en la carcinogénesis inducida por DEN. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica para Ki67 en las secciones hepáticas a diferentes meses tras la inyección con DEN (aumento 200X). La gráfica muestra la cuantificación de los núcleos positivos para Ki67 en las lesiones tumorales de los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ a los tiempos indicados. Cuantificación de 5 campos aleatorios con el objetivo 20X. Los asteriscos indican: * = $P < 0,05$ y ** = $P < 0,01$ respecto a $MMP10^{+/+}$.

Por tanto, la MMP10 podría estar contribuyendo al crecimiento del HCC experimental, ya que su expresión parece favorecer la incidencia y el crecimiento tumoral.

Por otro lado, el HCC es un tipo de tumor altamente vascularizado y el proceso de angiogénesis está presente en la carcinogénesis hepática desde los estadios iniciales [18, 26]. Así mismo, la MMP10 ha sido implicada en la remodelación vascular y en la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular [50, 110]. Con esto en mente, decidimos examinar la densidad microvascular del tejido tumoral en nuestro modelo de carcinogénesis experimental. Como se muestra en la figura 36, la densidad microvascular de los tumores presentes en los ratones $MMP10^{-/-}$ es menor a la observada en los $MMP10^{+/+}$, especialmente a los 8 y 11 meses tras la administración del DEN, que es cuando se detectan tumores de gran tamaño.

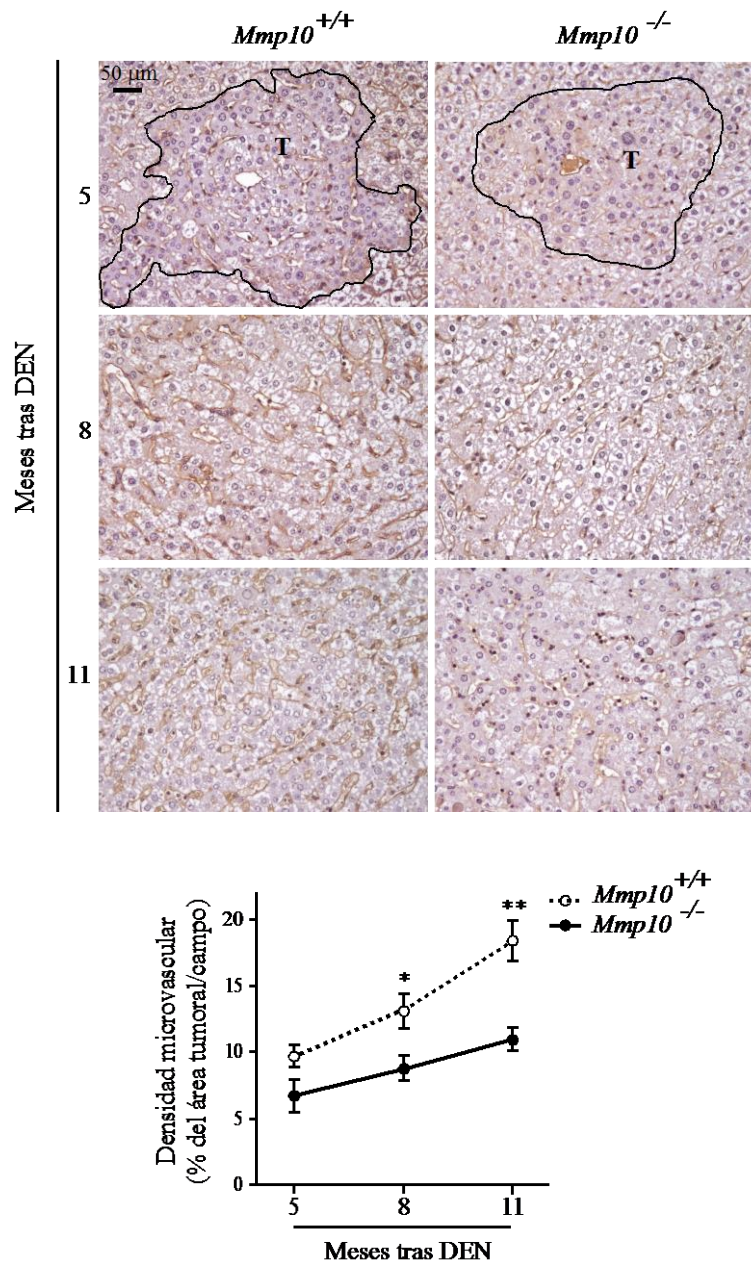


Figura 36. Densidad microvascular de las lesiones tumorales de los ratones *MMP10*^{+/+} y *MMP10*^{-/-}. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica para el CD31 en las lesiones tumorales de las secciones hepáticas de los ratones a los diferentes meses tras la administración del DEN (aumento 200X). Las lesiones tumorales (T) a los 5 meses aparecen delimitadas por una línea y los campos correspondientes a 8 y 11 meses son lesiones tumorales. La gráfica muestra la cuantificación de la densidad microvascular representada como el área vascular CD31 positiva relativa al área total a los tiempos indicados. Los asteriscos indican: * = $P < 0,05$ y ** = $P < 0,01$ respecto a *MMP10*^{-/-}.

La angiogénesis tumoral está íntimamente relacionada con el proceso de metástasis y el remodelado de la MEC por las MMPs facilita la invasión celular del estroma y de los vasos sanguíneos [18, 111], por lo que el siguiente paso fue examinar los pulmones

de los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ inyectados con DEN. El análisis de las secciones del tejido pulmonar de los ratones a los 11 meses tras la administración del carcinógeno reveló una incidencia de metástasis del 40% en los $MMP10^{+/+}$, mientras que en los ratones $MMP10$ deficientes no se detectó ninguna lesión (figura 37 A y B). Como evidencia extra de la presencia de células de HCC en los pulmones de estos ratones, observamos altos niveles del ARNm de la alfa fetoproteína (*Afp*), que es un marcador de células de HCC, en los extractos de tejido pulmonar de los animales $MMP10^{+/+}$ a los 11 meses tras la inyección con DEN (figura 37 C).

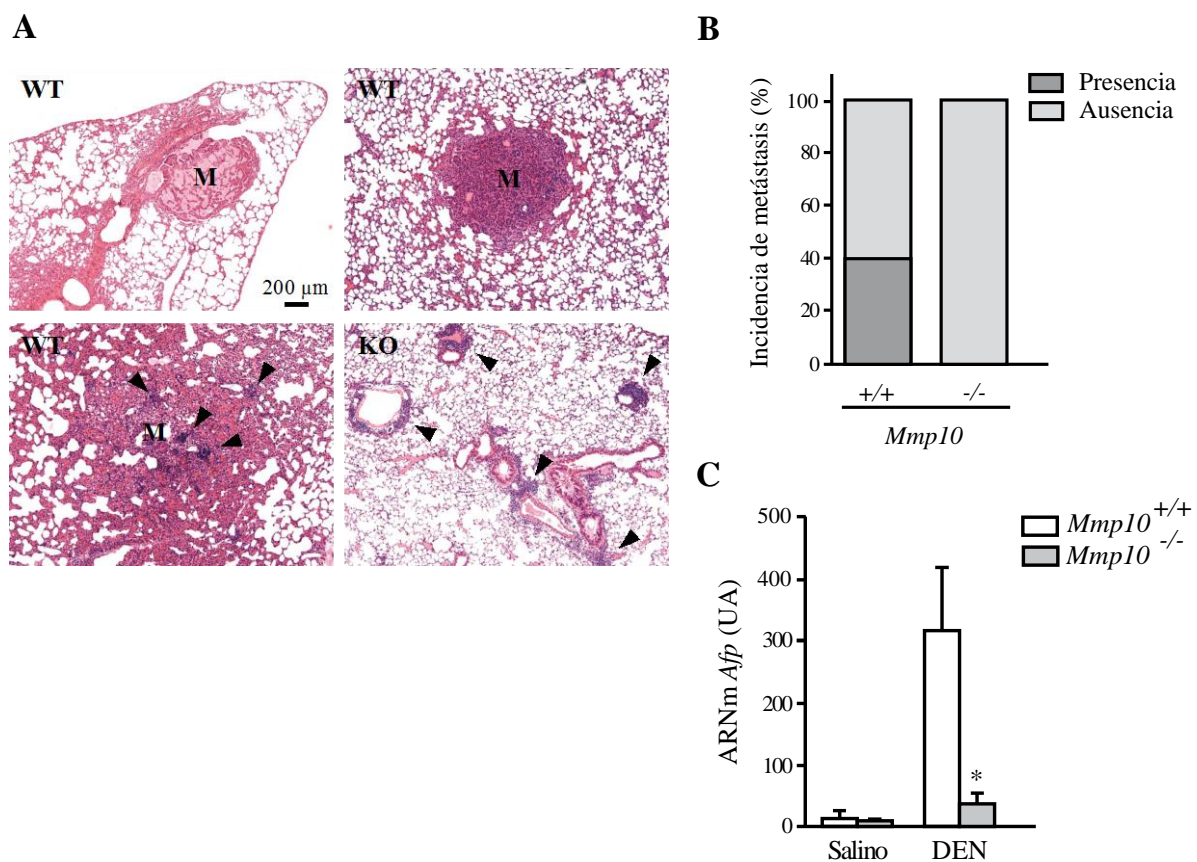


Figura 37. Presencia de metástasis en los pulmones de los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ a los 11 meses de la inyección con DEN. A) Imágenes representativas de secciones de tejido pulmonar de los ratones $MMP10^{+/+}$ (WT) y $MMP10^{-/-}$ (KO) teñidas con hematoxilina y eosina (aumento 40X). Las lesiones metastásicas (M) se observaron sólo en $MMP10^{+/+}$. Las flechas indican infiltrado inflamatorio. B) La gráfica muestra el porcentaje de incidencia de lesiones metastásicas en los pulmones de los ratones. C) La expresión del ARNm de la alfa fetoproteína (*Afp*) fue analizada mediante PCR a tiempo real en los pulmones de los ratones $MMP10^{+/+}$ y $MMP10^{-/-}$ control (inyección de solución salina) e inyectados con DEN 11 meses atrás. El asterisco indica $P < 0,05$ respecto a $MMP10^{+/+}$. UA: Unidades arbitrarias.

En su conjunto, los resultados sugieren la implicación de la MMP10 en el desarrollo de los tumores hepáticos, ya que se observa una mayor incidencia tumoral y metastásica, tumores de mayor tamaño y mayor vascularización tumoral en los ratones MMP10^{+/+}, cuya expresión de esta MMP es inducida durante la carcinogénesis experimental.

8. INTERACCIÓN DE LA MMP10 CON EL EJE SDF1/CXCR4 EN LA CARCINOGENÉISIS HEPÁTICA

Además de mediante la degradación de componentes de la MEC, las MMPs pueden contribuir al desarrollo tumoral de múltiples maneras, incluyendo la activación de diferentes vías de señalización [51]. Por ejemplo, un estudio reciente demostró que la MMP10 era necesaria para la correcta expresión del receptor de quimioquinas, CXCR4, durante la reparación del tejido muscular. En dicho trabajo, los ratones MMP10^{-/-} presentaban una expresión reducida del CXCR4 y su ligando, SDF1, en el tejido muscular en comparación con los MMP10^{+/+} [112]. Este dato nos resultó interesante, ya que el eje SDF1/CXCR4 está emergiendo como un importante promotor del crecimiento y la migración de las células de HCC [113]. Además, recientemente, se observó que la expresión hepática del CXCR4 se induce en ratones durante la carcinogénesis hepática iniciada por DEN [114]. Por consiguiente, decidimos comprobar dicha inducción en nuestros ratones tratados con DEN.

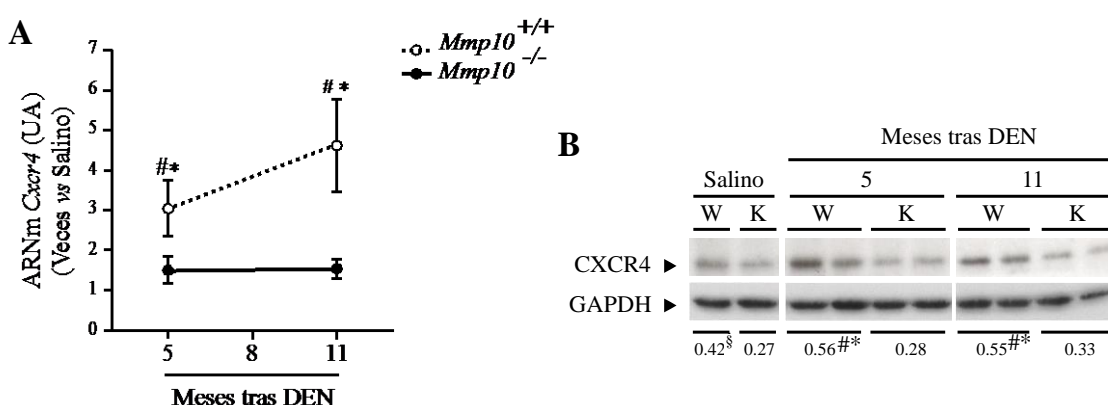


Figura 38. Expresión del CXCR4 en los ratones MMP10^{+/+} (W) y MMP10^{-/-} (K) tratados con DEN. A) La expresión del ARNm del *Cxcr4* analizada mediante PCR a tiempo real en el hígado de los ratones a los 5 y 11 meses tras la inyección con DEN. Se representan los datos respecto a los valores obtenidos en los controles inyectados con solución salina. B) Análisis de la proteína CXCR4 mediante western blot. Los símbolos indican: * = P < 0,05 y § = P < 0,01 respecto a MMP10^{-/-} y # = P < 0,05 respecto a los controles inyectados con salino.

Como se observa en la figura 38, confirmamos la inducción del CXCR4 en el hígado de los ratones MMP10^{+/+} a los 5 y 11 meses tras la administración del carcinógeno. Sin embargo, en los ratones MMP10^{-/-} no apreciamos un aumento de su expresión, además de presentar niveles más bajos de la proteína CXCR4 en los extractos hepáticos, tanto a nivel basal como a los 5 y 11 meses tras la inyección con DEN (figuras 38 A y B).

En concordancia con estudios previos [114], detectamos un incremento de la inmunotinción para el CXCR4 en los tumores hepáticos inducidos por DEN en los ratones y en las muestras humanas de HCC, además, al igual que ocurría con la MMP10, la tinción aumenta en los bordes de los tumores (figuras 39 A y B).

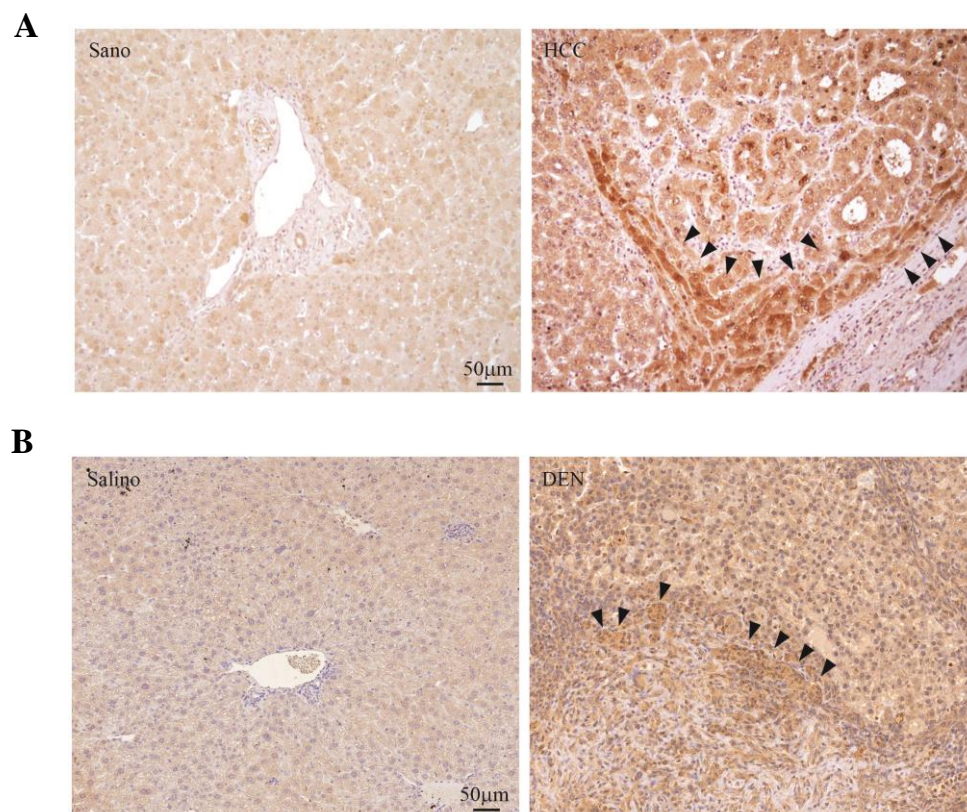


Figura 39. Detección del CXCR4 en tejidos hepáticos control y en HCC. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica (aumento 100X) para el CXCR4 en A) muestras humanas de tejido hepático sano y HCC, y B) tejido hepático de ratón control inyectado con salino y HCC inducido por DEN (11 meses tras la administración). Las flechas señalan el borde tumoral, donde la inmunotinción del CXCR4 es más intensa.

Para evaluar de manera directa si la MMP10 era capaz de influir en la expresión del CXCR4, generamos células transfectantes en la línea de hepatocarcinoma humano Huh7

capaces de sobre-expresar establemente la proteína MMP10 (figura 40 A). En la figura 40 se aprecia que las células que expresan MMP10 de manera estable presentan una clara inducción de los niveles de CXCR4, tanto a nivel de ARNm como de proteína. La expresión del CXCR4 puede ser inducida mediante diferentes mecanismos, incluyendo la señalización por factores de crecimiento, la hipoxia y el estrés oxidativo [114, 115]. Curiosamente, la MMP3 (estromelisina 1), que es una metaloproteasa muy relacionada con la MMP10, es capaz de influir en la expresión génica y en el comportamiento celular provocando la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) [116]. Basándonos en esta información, tratamos la células Huh7 que sobre-expresan MMP10 con los antioxidantes N-acetilcisteína (NAC) y butilhidroxianisol (BHA), detectando una atenuación significativa de la expresión del CXCR4 (figura 40 C).

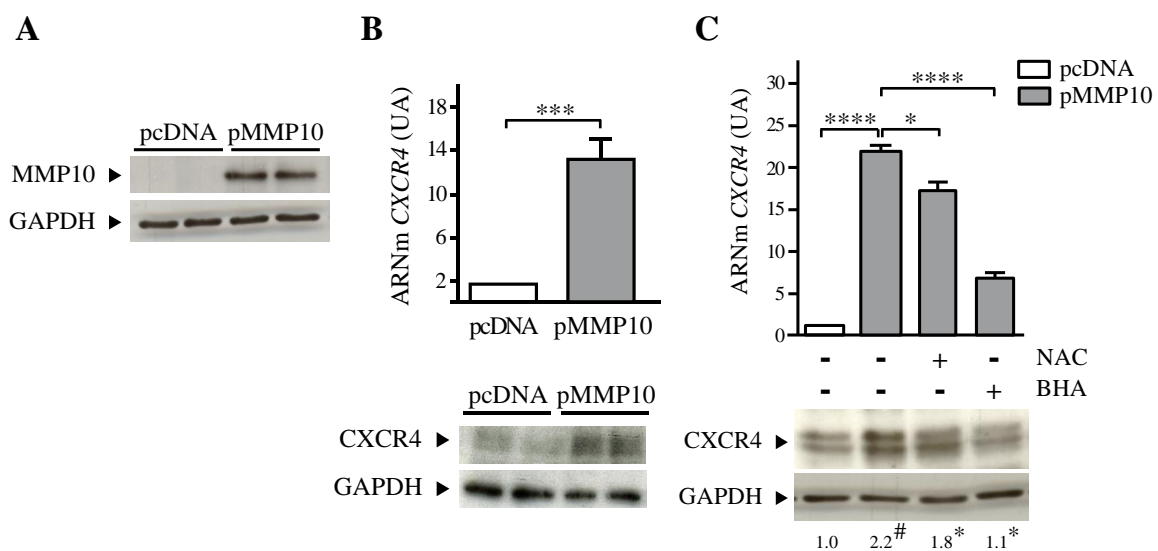


Figura 40. Expresión del CXCR4 en células Huh7 establemente transfectadas. A) Validación de la expresión de la proteína MMP10 en las células Huh7 establemente transfectadas con el plásmido vacío (pcDNA) o con el vector de expresión de la MMP10 (pMMP10). B) Análisis de la expresión del CXCR4 en las células Huh7 transfectadas. El panel superior muestra el ARNm del *CXCR4* analizado mediante PCR a tiempo real y en el panel inferior se muestra la proteína mediante western blot. C) Atenuación de la expresión del CXCR4 inducida por MMP10 en presencia de antioxidantes (NAC = 10 mM y BHA = 75 μ M) durante 48 horas. El panel superior muestra el ARNm del *CXCR4* analizado mediante PCR a tiempo real y en el panel inferior se muestra la proteína mediante western blot, junto con la cuantificación de las bandas. Los asteriscos de las gráficas indican: * = $P < 0,05$, *** = $P < 0,001$ y **** = $P < 0,0001$. UA: Unidades arbitrarias. Los símbolos del western blot indican: # = $P < 0,01$ respecto a pcDNA y * = $P < 0,05$ respecto a pMMP10 no tratadas con antioxidantes.

Estos resultados se vieron reforzados al observar que los niveles de expresión de genes sensibles a ROS, como son la hemo oxigenasa-1 (HO-1) y la superóxido dismutasa 2 (SOD2), estaban significativamente aumentados en las células Huh7 que sobre-expresan la MMP10 de manera estable (Huh7-pMMP10) (figura 41). Por lo tanto, parece que la MMP10 es capaz de estimular la producción de ROS y que éstos, a su vez, serían responsables, en parte, de la inducción de la expresión de CXCR4 que observábamos en la figura 40.

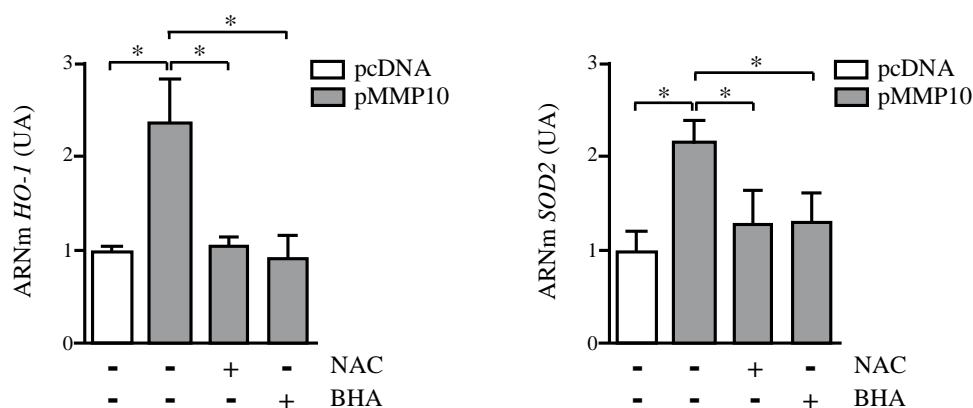


Figura 41. Expresión de genes sensibles a ROS en las células Huh7 establemente transfectadas. La expresión del ARNm de la hemo oxigenasa-1 (*HO-1*) y la superóxido dismutasa 2 (*SOD2*) analizada mediante PCR a tiempo real en las células Huh7 establemente transfectadas con el plásmido vacío (pcDNA) o con el vector de expresión de la MMP10 (pMMP10) en presencia o ausencia de antioxidantes (NAC = 10 mM y BHA = 75 μ M) durante 48 horas. Los asteriscos indican $P < 0,05$. UA: Unidades arbitrarias.

Por otro lado, la inducción de la MMP10 en respuesta a factores de crecimiento ha demostrado promover el potencial invasivo de los queratinocitos transformados, respuesta que se ve favorecida por la activación de la MMP10 dependiente de plasminógeno/plasmina [65]. Al analizar la capacidad de migración de las células Huh7 transfectantes, vemos como, en efecto, las células que sobre-expresan MMP10 de manera estable migran más y que la adición exógena de plasminógeno potencia esta respuesta (figura 42 A). Es más, la expresión de la MMP10 también favorece la capacidad invasiva de estas células de HCC a través de una membrana basal de Matrigel (figura 42 B). Cabe destacar que las células Huh7 expresan y secretan SDF1, ligando del CXCR4, en condiciones basales y que, como hemos mencionado anteriormente, la activación del CXCR4 promueve la capacidad migratoria de las células de HCC [113,

117]. Teniendo en cuenta la influencia de la MMP10 en la expresión del CXCR4, analizamos el efecto de la inhibición de este receptor de quimioquinas en la migración de las células Huh7. Mientras que en presencia del antagonista específico del CXCR4, AMD-3100 [118], la migración de las células Huh7 control (pcDNA) se reduce de forma ligera, la migración de las Huh7-pMMP10 cae de manera muy significativa (figura 42 C).

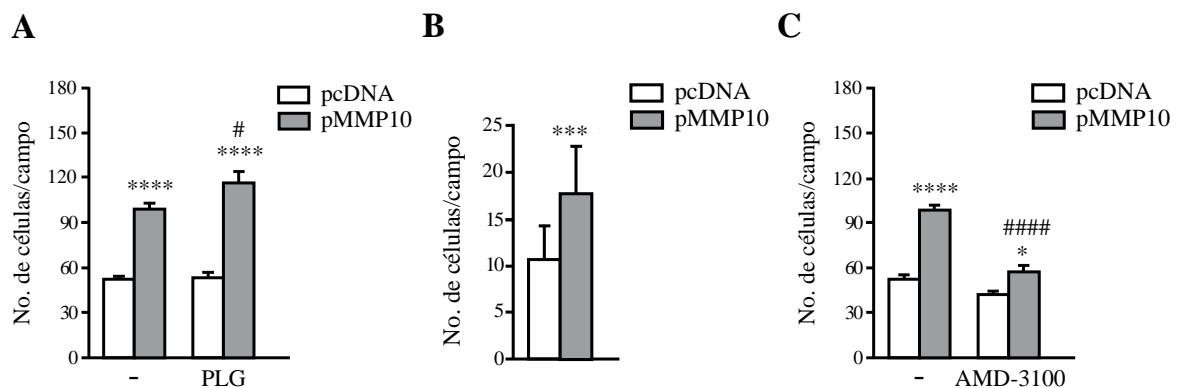


Figura 42. Efecto de la MMP10 en la migración e invasión de las células de HCC. A) Migración de las células Huh7 control (pcDNA) y Huh7-pMMP10 en presencia y ausencia de plasminógeno (PLG). B) Invasión de las células Huh7 control (pcDNA) y Huh7-pMMP10. C) Atenuación de la migración inducida por la MMP10 en las células Huh7 tras la inhibición del CXCR4 por AMD-3100. Los símbolos indican: * = $P < 0,05$, *** = $P < 0,001$ y **** = $P < 0,0001$ respecto a pcDNA y # = $P < 0,05$ y ##### = $P < 0,0001$ respecto a pMMP10 sin tratar.

Estos resultados sugieren que la MMP10 promueve la expresión hepática del CXCR4 en las células de HCC, y que, a su vez, el sistema SDF1/CXCR4 participa en la migración celular suscitada por la MMP10.

9. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA MMP10 POR HIPOXIA Y SDF1 EN CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC)

La hipoxia es un factor importante en la evolución del HCC, ya que contribuye a los procesos de angiogénesis y metástasis [26, 111]. Además, el sistema del SDF1/CXCR4 se activa en condiciones de hipoxia [115, 119]. Esta información nos llevó a evaluar en las células de HCC la posible influencia de la hipoxia y el SDF1 en la expresión de la MMP10. El tratamiento de las células Huh7 con SDF1 no tuvo efectos significativos en los niveles de expresión de nuestra metaloproteasa. Por el contrario, como se muestra en

la figura 43, en condiciones de hipoxia la expresión de la MMP10 se induce de forma marcada, y este efecto se ve potenciado cuando las células se tratan conjuntamente con SDF1. Es probable que la potente inducción que experimenta la expresión del CXCR4 en las células que han sido sometidas a una baja tensión de oxígeno (figura 43 B) sea la responsable de que el gen de la MMP10 responda al SDF1 en situación de hipoxia. Siguiendo esta línea, la hipoxia y la activación del CXCR4 son capaces de desencadenar la vía de señalización de la proteína quinasa regulada por señales extracelulares mitogénicas/proteína quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (MEK/ERK1/2) [113, 120, 121], que es además una potente activadora de la expresión de la MMP10 [79]. Observamos que el efecto estimulador de la hipoxia y la hipoxia junto con SDF1 sobre la expresión de la MMP10 se ve suprimido al incubar las células con el inhibidor de MEK, UO-129 (figura 43 A).

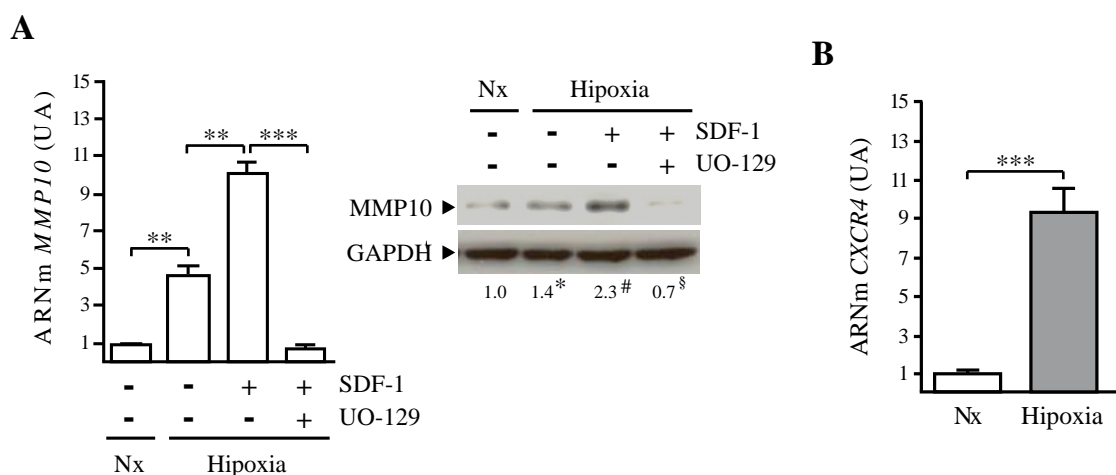


Figura 43. Expresión de la MMP10 y del CXCR4 en células de HCC en condiciones de hipoxia. A) Análisis de la expresión del ARNm de la *MMP10* analizado mediante PCR a tiempo real y de la proteína mediante western blot en células Huh7 incubadas en normoxia o hipoxia durante 48 horas en presencia o ausencia de SDF1 o del inhibidor de MEK, UO-129. B) Expresión del ARNm del *CXCR4* analizado mediante PCR a tiempo real en células Huh7 incubadas en normoxia (Nx) o hipoxia durante 48 horas. Los símbolos indican: * = $P < 0,05$ respecto a normoxia, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$, # = $P < 0,05$ respecto a hipoxia y § = $P < 0,05$ respecto a hipoxia + SDF1.

Para evaluar si la inducción de la expresión de la MMP10 en condiciones de hipoxia y en respuesta a SDF1 ocurría a nivel transcripcional, transfectamos las células Huh7 con un vector que contenía un fragmento de 2 kb de la región promotora del gen de la MMP10 y luciferasa como gen reportero. La actividad luciferasa inducida por el promotor de la MMP10 resultó estar significativamente aumentada en respuesta a la

hipoxia. Este efecto se potenciaba en presencia del SDF1 y era suprimido al tratar las células con el inhibidor UO-129 (figura 44). Estudios previos han descrito el papel clave del factor de transcripción proteína activadora 1 (AP-1), activado por la ruta de señalización MEK/ERK1/2, en la regulación de la expresión génica de la MMP10 [122]. En este contexto, vieron que el elemento de respuesta a AP-1 localizado en el promotor de la MMP10 (posición del -67 a -61) era esencial para la transactivación de éste por estímulos extracelulares como la trombina [79]. Modificamos este elemento de respuesta a AP-1 en el vector que contenía el fragmento de 2 kb del promotor de la MMP10 mediante mutagénesis dirigida y vimos que, efectivamente, no se observaba un incremento de la actividad luciferasa en respuesta a la hipoxia y al SDF1 en las células Huh7 AP-1 mutantes (figura 44).

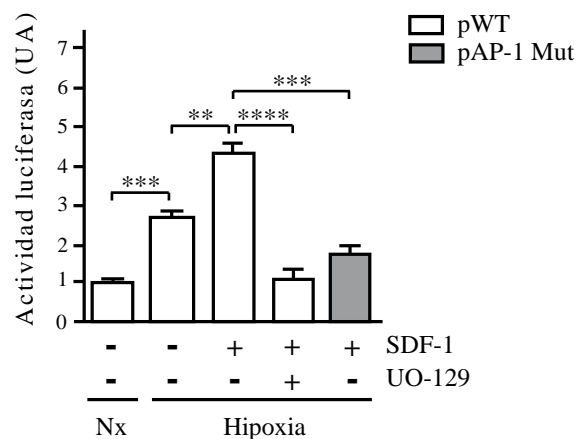


Figura 44. Transactivación del promotor de la MMP10 en células de HCC en condiciones de hipoxia. Análisis de la actividad luciferasa en células Huh7 transfectadas con un plásmido que contiene el promotor de la MMP10 y el gen reportero de la luciferasa (pWT), incubadas en normoxia (Nx) o hipoxia durante 48 horas en presencia o ausencia de SDF1 o del inhibidor de MEK, UO-129. También se muestra la respuesta a la hipoxia + SDF1 de células Huh7 transfectadas con un plásmido que contiene el promotor de la MMP10 con el sitio AP-1 mutado (posición -67/-61) y el gen luciferasa (pAP-1 Mut). Los asteriscos indican: ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$ y **** = $P < 0,0001$. UA: Unidades arbitrarias.

Por tanto, la capacidad de la hipoxia y del SDF1 para transactivar la expresión del gen de la MMP10, que parece ocurrir a través de la vía de señalización MEK/ERK1/2, depende significativamente de este elemento de respuesta a AP-1 situado en el promotor proximal de la MMP10.

Con el fin de profundizar en la implicación del factor de transcripción AP-1 en la regulación de la expresión de la MMP10, las células Huh7 cultivadas en condiciones de

hipoxia y normoxia fueron sometidas a una inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando un anticuerpo frente a c-JUN. Como componente del complejo heterodimérico AP-1, el c-JUN es un potente inductor de la transcripción de diversas MMPs como la MMP1, la MMP3 y la MMP13 [46, 47, 123], por lo que analizamos la unión de c-JUN al sitio AP-1 del promotor de la MMP10. El ChIP confirmó el incremento de la unión del c-JUN al promotor de la MMP10 en condiciones de hipoxia (figura 45), reforzando la implicación del elemento de respuesta a AP-1 en la inducción de la expresión de esta metaloproteasa en hipoxia.

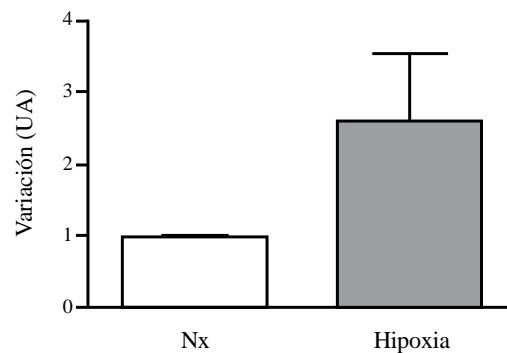


Figura 45. Unión del c-JUN al promotor de la MMP10 en células de HCC en condiciones de hipoxia. Análisis, mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), de la unión de c-JUN al sitio AP-1 del promotor de la MMP10 en células Huh7 incubadas en hipoxia o normoxia (Nx) durante 36 horas. UA: Unidades arbitrarias.

10. INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE TUMORAL SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA MMP10 EN CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC)

La expresión de la MMP10 no está constitutivamente inducida en las líneas de HCC, como hemos podido constatar en la línea celular Huh7 en condiciones basales (normoxia), pero se activa ante estímulos propios del entorno tumoral, incluyendo la hipoxia, los factores de crecimiento (AR, TGF β y EREG) y el sistema SDF1/CXCR4. Esto sugiere la importancia de elementos del microambiente tumoral que se desarrolla *in vivo* en la activación de la expresión de esta metaloproteasa en los tumores hepáticos. Para constatar el efecto del microambiente tumoral sobre la expresión de esta enzima realizamos un experimento de xenoinjerto en el que inyectamos subcutáneamente células tumorales humanas (Huh7) en ratones inmunodeprimidos. Los tumores

generados fueron extirpados y la expresión de la MMP10 humana fue analizada en los mismos. Como se aprecia en la figura 46, la expresión de la MMP10 por la línea celular de HCC es significativamente inducida en el tumor, confirmando que la inducción de esta MMP es muy dependiente del microambiente tumoral.

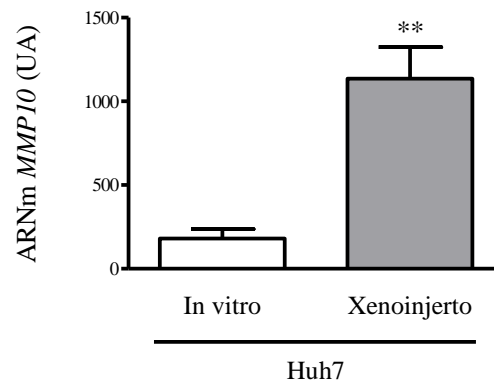


Figura 46. Inducción de la MMP10 en células de HCC en el microambiente tumoral. Análisis de la expresión del ARNm de la *MMP10* analizado mediante PCR a tiempo real en células de Huh7 en cultivo y en los tumores generados por xenoinjerto tras un mes de su inyección subcutánea. Los asteriscos indican $P < 0,01$ respecto a las células en cultivo. UA: Unidades arbitrarias.

DISCUSIÓN

En este estudio hemos analizado el papel de la MMP10 en modelos de daño hepático agudo y crónico y en la hepatocarcinogénesis, ofreciendo una nueva visión sobre la relevancia de la implicación de esta metaloproteasa en la regeneración del hígado y en la progresión tumoral del mismo.

En la primera parte de este trabajo hemos identificado un, hasta ahora no reconocido, papel para la MMP10 en la reparación del tejido hepático. Encontramos que la expresión de la MMP10 es rápidamente inducida tras el daño hepático en diferentes tipos celulares incluyendo hepatocitos, epitelio biliar y células inflamatorias. Esta respuesta es consistente con observaciones previas sobre la expresión de la MMP10 en otros tipos celulares y tejidos inflamados o dañados. Diversos estudios han mostrado la expresión de esta MMP en queratinocitos durante la cicatrización cutánea, en células epiteliales de la tráquea tras una infección por *Pseudomonas aeruginosa*, en el endotelio vascular en respuesta a la proteína C reactiva (cuyos niveles circulantes aumentan durante los procesos inflamatorios) y en células inflamatorias y epiteliales del colon en el intestino inflamado [72, 73, 124-126].

Con el objetivo de dilucidar el papel de la MMP10 en el tejido hepático en respuesta a diferentes insultos, analizamos su expresión en tres modelos experimentales de daño y regeneración hepática como son la HP, el daño agudo por inyección intraperitoneal de CCl_4 y el daño colestásico por BDL. En todos ellos observamos un patrón transitorio de expresión de la MMP10, cuya inducción coincide con la respuesta inflamatoria temprana desencadenada en el hígado durante el daño y la regeneración [1, 2, 4, 9, 97]. Como otros han demostrado, la expresión de la MMP10 es promovida por factores de crecimiento y citoquinas como el EGF, el $\text{TGF}\beta$ y el $\text{TNF}\alpha$ en diferentes tipos de células epiteliales [65, 77, 78]. A su vez, es promovida por mediadores inflamatorios como la proteína C reactiva en las células del endotelio vascular o por el LPS bacteriano en los macrófagos [93, 94, 125]. Como parte de la respuesta reparativa endógena al daño, la inducción de la expresión del $\text{TGF}\beta$ y de los ligandos del EGFR ocurre de forma temprana durante el daño hepático y la regeneración, fenómeno que tiene lugar en estrecha interacción con las señales inflamatorias [1, 3, 4, 9, 14, 89, 127]. En este estudio, también hemos advertido un marcado aumento de la expresión de los ligandos del EGFR AR, HB-EGF y EREG en el hígado de los ratones sometidos al modelo de BDL. Estos resultados, junto con las observaciones realizadas *in vitro* sobre el efecto aditivo del $\text{TGF}\beta$ y los ligandos del EGFR en la expresión de la MMP10 en células

biliares y parenquimales, sugieren que la actividad combinada de estos factores de crecimiento es importante en la inducción hepática de la expresión de la MMP10 durante la respuesta al daño.

Mediante el análisis inmunohistoquímico de los diferentes modelos experimentales estudiados, la MMP10 fue también detectada en las células inflamatorias del hígado. El LPS bacteriano proveniente del sistema digestivo juega un papel destacado en la regeneración hepática tras la HP, así como en la enfermedad colestásica experimental, siendo los monocitos/macrófagos las principales células diana para esta endotoxina [92, 98]. Hemos demostrado *in vitro* que el LPS es capaz de inducir la expresión de la MMP10 en los macrófagos residentes del hígado (células de Kupffer). Es más, hemos aportado datos sobre la expresión de esta MMP en los macrófagos de ratón en respuesta al dominio EDA de la fibronectina, un ligando endógeno del TLR4 producido durante el daño hepático [95, 96]. Este descubrimiento sugiere que la transcripción del gen de la MMP10 en el hígado también responde a cambios moleculares de la composición de la MEC, lo que va en paralelo con la recientemente observada activación transcripcional de la MMP10 debida al colágeno tipo I en los fibroblastos humanos [128].

Tras la resección hepática experimental, la BDL y la administración del hepatotóxico CCl₄, los ratones genéticamente modificados deficientes para la MMP10 presentaron un daño parenquimal persistente, caracterizado por áreas de necrosis más extensas y niveles más elevados de transaminasas circulantes. La falta de la MMP10 fue asociada con una mortalidad significativamente mayor tras la HP y con un incremento en la fibrosis hepática en el modelo de daño colestásico. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la MMP10 podría participar en la resolución del daño en el tejido hepático más que en la progresión de la enfermedad. Podemos decir que esta proteasa tiene una actividad hepatoprotectora en los modelos experimentales analizados. Resultados similares fueron observados en modelos de daño e inflamación en colon y pulmón, en los que los ratones MMP10^{-/-} mostraban mayor daño y una reparación tisular defectiva [73, 124]. La restauración de la arquitectura del tejido hepático no solo implica la proliferación de las células parenquimales, sino que requiere de la correcta eliminación de los restos necróticos y de la matriz transitoria establecida durante la resolución del daño. No hemos encontrado diferencias en la proliferación hepatocelular entre los ratones normales y los MMP10 deficientes en ninguno de nuestros tres modelos de daño y regeneración hepática, sugiriendo que la MMP10 puede no ser

esencial para la disponibilidad de factores de crecimiento como ocurre con otras proteasas [12]. No obstante, el daño hepático resultó estar exacerbado y la resolución de las áreas necróticas dificultada en ausencia de la MMP10.

El fenotipo observado en nuestros ratones deficientes para esta MMP es parejo al presente en ratones deficientes para el plasminógeno o el activador del plasminógeno [28, 34, 76], y justamente contrario al de los ratones deficientes para el inhibidor 1 del activador del plasminógeno, que parecen estar protegidos frente al daño hepático causado por la colestasis [129]. Las funciones críticas realizadas por esta proteasa en relación al efecto beneficioso que presenta en la respuesta hepática al daño no están completamente aclaradas. Estas actividades pueden ir desde el correcto remodelado de los componentes de la MEC asociados al daño y la eliminación de los restos celulares necróticos [28, 34, 76], hasta la activación de factores de crecimiento con efectos hepatoprotectores [12, 75].

Recientemente se ha prestado gran atención al papel de la cascada de coagulación en el daño hepático [104, 105]. Por ejemplo, los ratones deficientes en fibrina/fibrinógeno sometidos a modelos de colestasis muestran menor daño que sus controles con niveles de expresión normales [106, 130]. A este respecto, se ha documentado la acumulación de depósitos de complejos de fibrina de baja solubilidad en diferentes modelos hepáticos de daño agudo [105]. En base a dichos estudios se ha propuesto que el exceso de depósitos de fibrina insoluble, así como la acumulación de matriz rica en fibronectina, puede llevar al establecimiento de una situación patológica en la que la perfusión defectuosa del tejido hepático, el daño hepatocelular y la activación de las células fibrogénicas perduren [34, 105]. En la línea de estas observaciones, se ha visto que la actuación farmacológica frente al proceso de coagulación da lugar a la atenuación de la fibrosis en el tejido hepático [105, 131]. Nuestros experimentos muestran que el recambio dinámico del fibrinógeno y la fibronectina durante la respuesta hepática al daño está desregulado en ausencia de la MMP10, ya que su falta deriva en un aumento de la acumulación intrahepática de agregados insolubles de estas proteínas. Estos resultados están en consonancia con la reciente actividad promotora de la fibrinólisis adjudicada a la MMP10 [42]. Parece que la influencia de la MMP10 en la resolución de los coágulos de fibrina podría explicar gran parte de la relevancia de su papel durante la respuesta reparadora en el hígado. Sin embargo, no tenemos datos suficientes como para

descartar la capacidad de la MMP10 para liberar factores de supervivencia anclados a la matriz hepática durante este proceso.

Por otro lado, es importante resaltar que hemos sido capaces de detectar la presencia de la proteína MMP10 en el núcleo de hepatocitos y células biliares de los ratones sometidos al modelo de colestásis. Aunque la existencia de señales de localización nuclear en la secuencia de la MMP10 ha sido propuesta previamente [132], hasta la fecha no se había documentado su presencia en núcleo. Curiosamente, la MMP3, estromelina con la que la MMP10 guarda gran homología, ha sido identificada en el núcleo de hepatocitos, de células de hepatocarcinoma y de condrocitos, donde se cree que puede estar implicada en procesos de apoptosis y de regulación de la expresión génica [132, 133]. La localización nuclear de la MMP10 en las células hepáticas sugiere la existencia de funciones biológicas adicionales a las aquí descritas para esta enzima.

En la segunda parte de este estudio, hemos demostrado la importancia de la actividad pro-tumorigénica de la MMP10 en el desarrollo del cáncer en el hígado. Múltiples evidencias apoyan la noción de que las MMPs están involucradas en muchos de los cambios microambientales que tienen lugar durante la progresión tumoral [25, 51], y este podría ser también el caso del HCC. El análisis de muestras clínicas de tejido hepático con HCC ha revelado altos niveles de expresión de diversas MMPs como la MMP2, la MMP3 y la MMP9, cuya expresión ha sido asociada a la progresión de la enfermedad [57, 59, 134]. En este trabajo hemos mostrado que la expresión de la MMP10 está inducida en hepatocitos y en células no parenquimales de muestras humanas de tejido hepático crónicamente dañado, como es el caso de los pacientes con cirrosis, y en muestras de HCC, corroborando observaciones previas realizadas por otros investigadores en muestras humanas de tumores hepáticos [82]. Confirmamos también el incremento de la expresión de la MMP10 en los hígados de los ratones sometidos al modelo experimental de hepatocarcinogénesis inducida por DEN y en las muestras de HCC obtenidas de dichos ratones.

Por otra parte, así como la rápida inducción de los niveles de expresión de la MMP10 tras el daño hepático agudo favorecían la reparación del tejido, la expresión de esta proteasa en el hígado cirrótico, que es considerado como un estado pretumoral [22], y en el HCC, parece sugerir la implicación de la MMP10 en la conversión neoplásica del órgano y en la progresión tumoral del HCC. Con todo, para otorgar dicho papel a esta MMP era importante analizar directamente su posible contribución al desarrollo del

HCC *in vivo*, ya que otros estudios han descrito funciones supresoras frente al desarrollo tumoral para otras MMPs, como es el caso de la MMP8 [51, 135]. Teniendo todo lo descrito en cuenta, evaluamos la respuesta de los ratones normales y de los deficientes para la MMP10 al modelo de hepatocarcinogénesis inducida por DEN. Descubrimos que en los ratones capaces de expresar MMP10 los tumores hepáticos detectables a nivel macroscópico eran evidentes a tiempos más tempranos tras la administración del DEN que en los MMP10 deficientes y que, además, al final del estudio (11 meses) mostraban una mayor abundancia de tumores de gran tamaño. Estas observaciones macroscópicas fueron reforzadas a nivel histológico por la presencia de lesiones neoplásicas más extensas y por una mayor actividad proliferativa en los ratones con expresión normal de la MMP10. En su conjunto, los resultados sugieren que, efectivamente, la MMP10 podría estar contribuyendo al desarrollo de tumores en el hígado. La desregulación de la expresión de algunas MMPs se ha relacionado con la progresión tumoral y, en un artículo reciente, se ha descrito que la hepatocarcinogénesis hepática esta favorecida en ratones transgénicos en los que se sobre-expresa la MMP9 [136]. Sin embargo, aparentemente este es el primer estudio en el que se analiza el papel en la hepatocarcinogénesis experimental de una MMP determinada en su correspondiente ratón genéticamente deficiente.

Las MMPs pueden influir en el crecimiento tumoral de muchas maneras [25]. La capacidad de esta familia de metaloproteasas para degradar múltiples componentes de la MEC y su implicación en la formación de nuevos vasos sanguíneos, fenómenos estrechamente ligados al proceso metastásico, están entre los mecanismos más destacados al respecto [25, 51]. Estudios previos, en su mayoría llevados a cabo *in vitro*, han demostrado que la MMP10 presenta actividad colagenolítica y proangiogénica y que su expresión puede afectar al potencial metastásico de diferentes líneas celulares tumorales [50, 65, 80, 110, 137, 138]. Es más, en un trabajo reciente se muestra que la expresión de una forma pro-tumorigénica truncada de la proteína X del virus B de la hepatitis, es capaz de estimular la actividad invasiva de las células de HCC de manera dependiente de la MMP10 [21]. Nuestras observaciones también parecen reforzar la idea de que la MMP10 participa en la vascularización y la metástasis del HCC, ya que los ratones normales para esta proteasa muestran mayor densidad microvascular del tejido tumoral y una incidencia de metástasis a pulmón más elevada que los animales MMP10 deficientes.

El mecanismo vertebrador responsable de los efectos procarcinogénicos de las MMPs puede ser multifactorial [25, 51]. En este proyecto hemos descubierto una nueva interacción funcional entre la MMP10 y el eje SDF1/CXCR4, relación de gran importancia, debido a que el sistema de señalización SDF1/CXCR4 está emergiendo como un importante promotor de la malignización celular. La implicación de este eje en el crecimiento, supervivencia, invasión, angiogénesis y metástasis del HCC ha sido previamente descrita [120] y nuestros resultados *in vivo* han mostrado que la MMP10 es clave en la inducción de la expresión del CXCR4 durante hepatocarcinogénesis en el hígado. Asimismo, también hemos podido observar la capacidad de la MMP10 para incrementar los niveles de expresión del CXCR4 en células humanas de HCC.

Por otra parte, la expresión génica del CXCR4 puede ser regulada mediante una gran variedad de señales ambientales, entre las que se encuentran factores de crecimiento como el TGF β , la hipoxia y el estrés oxidativo [114, 115, 119]. La hipoxia es considerada uno de los principales inductores de la expresión del CXCR4, tal y como hemos podido comprobar en nuestros experimentos *in vitro*, e incluso su gen forma parte de las dianas directas del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α) [115, 139]. Curiosamente, el HIF1 α puede ser activado por la presencia de ROS [140] y la estabilización de este factor mediada por ROS ha sido propuesta como un posible mecanismo inductor de la expresión del CXCR4 [115]. En este contexto, hemos observado que al bloquear el estrés oxidativo mediante agentes antioxidantes se produce la atenuación de la inducción de la expresión del CXCR4 por la MMP10. Desde una perspectiva mecanística, estos resultados parecen sugerir que la MMP10 es capaz de promover la generación de ROS y que estos a su vez son capaces de mediar, en parte, la inducción del CXCR4 en las células de HCC. Análogamente y siguiendo esta línea de sucesos, ha sido descrito que la MMP3 ejerce potentes efectos pro-tumorigénicos en las células a través de la generación de ROS [116]. No obstante, se requiere de análisis más exhaustivos para dilucidar completamente los mecanismos responsables del efecto de la MMP10 sobre la expresión del CXCR4.

Otro papel de la MMP10 que hemos observado, es su habilidad para potenciar la capacidad de migración e invasión de las células de HCC. Esta importante actividad biológica de la MMP10 ha sido demostrada en la motilidad de otros tipos de células cancerosas, como es el caso de las células de cáncer de pulmón y de carcinoma escamoso de cabeza y cuello [80, 137], y en células no tumorales como los macrófagos

[94]. Es importante señalar que en presencia del plasminógeno el efecto de la MMP10 sobre la migración celular se vio potenciado. Es decir, la activación de la MMP10 por la acción del plasminógeno/plasmina [65] parece favorecer la migración celular. Esta interacción es especialmente relevante durante la hepatocarcinogénesis, dado que la expresión del activador del plasminógeno tipo uroquinasa está incrementada en las muestras humanas de tejido tumoral hepático y se correlaciona con un mal pronóstico para los pacientes [141]. Lo más interesante es que descubrimos que la inducción de la migración celular mediada por la MMP10 dependía ampliamente de la activación del CXCR4, ya que la inhibición de este receptor de quimioquinas reducía de forma marcada dicha migración. En resumen, nuestras observaciones indican que la MMP10 promueve la expresión génica del CXCR4 y que la vía de señalización del CXCR4, a su vez, media gran parte del efecto promigratorio de la MMP10 en las células de HCC. Ahora bien, la interacción entre el sistema del SDF1/CXCR4 y la MMP10 en las células de HCC ha demostrado ser más compleja, puesto que el SDF1 ha resultado ser capaz de inducir la expresión de la MMP10 en hipoxia. En condiciones de baja tensión de oxígeno, vimos que el SDF1 desencadenaba la transcripción de la MMP10 a través de la vía de señalización de MEK/ERK1/2, vía frecuentemente activada en las células de HCC [142]. Además, confirmamos la implicación del elemento de respuesta a AP-1 presente en la región proximal del promotor de la MMP10 en esta inducción [79].

Como se ha comentado en la primera parte de este proyecto, los factores de crecimiento como el TGF β y los ligandos del EGFR inducen la expresión de la MMP10 en los hepatocitos y en las células de HCC, así como también lo hacen la hipoxia y el SDF1. Estas observaciones nos sugieren que el gen *Mmp10* es muy sensible a diversos componentes del entorno tumoral, hecho que se ve reforzado al apreciar que las células de HCC no expresan la MMP10 de manera constitutiva en condiciones basales. Otros estudios han mostrado que la expresión de la MMP10 es baja en algunas líneas celulares tumorales cultivadas en monocapa y que su expresión se induce en matrices de cultivo en 3D o en modelos de xenoinjerto [143]. De forma análoga, hemos comprobado que la expresión de la MMP10 por las células de HCC se eleva significativamente en los tumores generados por xenoinjerto en ratones inmunodeprimidos, confirmando el potente efecto del microambiente tumoral sobre la transcripción de esta MMP *in vivo*.

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren, como se muestra en la figura 47, que existe una compleja interacción entre el eje del SDF1/CXCR4 y la MMP10, la cual

puede contribuir significativamente al microambiente tumoral en el HCC, promoviendo su progresión. Una interacción recíproca similar ha sido descrita recientemente entre la MMP1 y el CXCR4 en células madre mesenquimales. Al igual que en nuestro caso, la activación del CXCR4 en estas células era necesaria para la migración celular mediada por la MMP1 y, a su vez, la señalización a través de CXCR4 inducía la expresión de la MMP1 [144]. Sin embargo, la sobre-expresión de la MMP10 en el HCC, así como en otros tumores, puede ser particularmente importante desde un punto de vista patológico, dada la habilidad de esta proteasa para favorecer la actividad catalítica de otras MMPs, incluyendo a la MMP1 [64, 65].

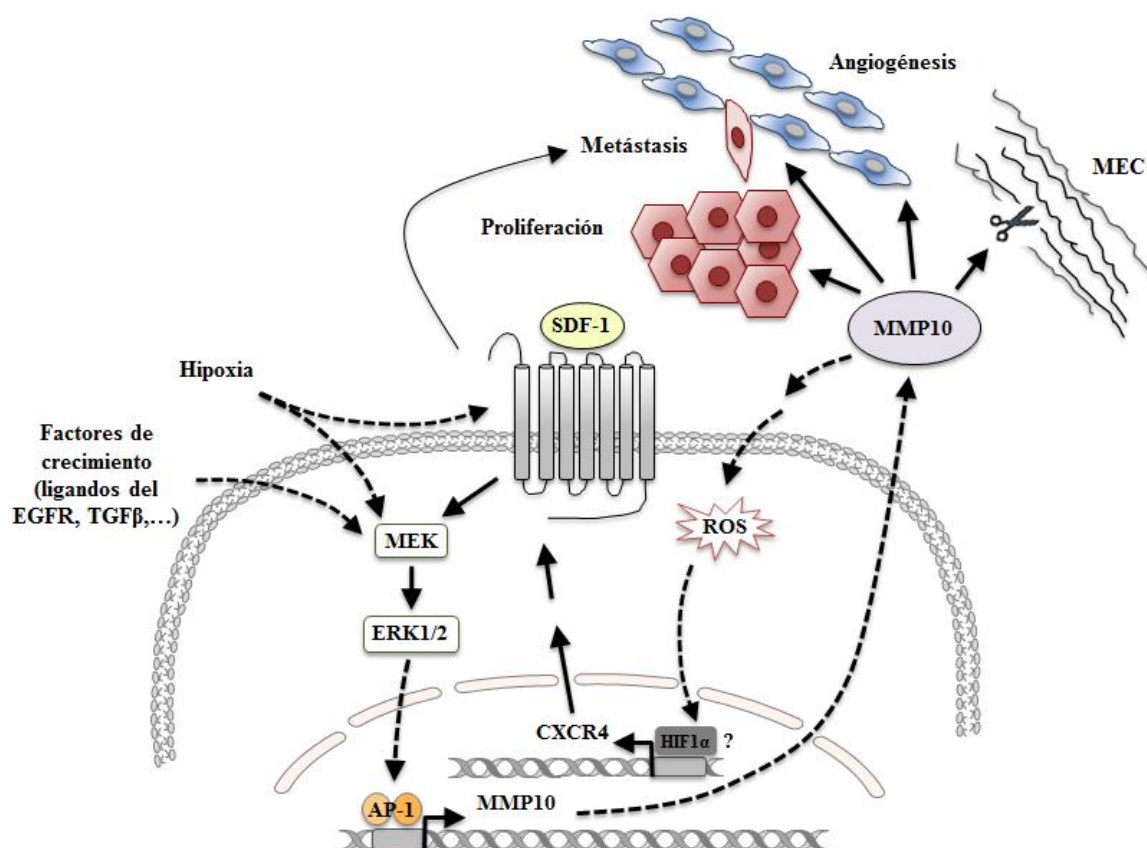


Figura 47. Esquema del papel de la MMP10 en la progresión tumoral y su interacción con el eje SDF1/CXCR4. Se muestra cómo la expresión de la MMP10 en el hígado de ratón estimula la proliferación, la angiogénesis y la metástasis del HCC y cómo su inducción puede deberse a factores de crecimiento, hipoxia y SDF1, a través de la vía MEK/ERK1/2 y el elemento AP-1 presente en el promotor. Por otro lado, se ilustra el efecto de la MMP10 en la estimulación del CXCR4 mediante la generación de ROS y la actividad del CXCR4 en la promoción de la metástasis al favorecer la migración celular. Adaptado de García-Irigoyen y cols. 2015 [145].

Resumiendo, en este estudio hemos identificado la actividad de la MMP10 como parte crucial de la respuesta hepática al daño agudo y crónico, destacando su efecto beneficioso en la restauración de la arquitectura hepática durante el proceso de reparación/regeneración. Por añadidura, también hemos descubierto la importancia de la implicación de la MMP10 en el desarrollo del cáncer y su potencial valor como una nueva diana terapéutica en el HCC debido a sus marcados efectos pro-tumorigénicos. En pocas palabras, ha quedado patente que la asociación MMPs y desarrollo de la enfermedad no es tan directa como podría pensarse. Las MMPs regulan una gran variedad de vías de señalización y la función específica de cada MMP, incluyendo a la MMP10, no se conoce con exactitud. El bloqueo de las MMPs mediante inhibidores de amplio espectro ha resultado ser ineficaz en la terapia al cáncer, e incluso ha dado lugar a efectos secundarios nocivos [62]. En este sentido, el papel dual de la MMP10 demuestra que la inhibición de la actividad de las MMPs puede resultar dañina en determinados procesos patológicos, como es el caso de la respuesta al daño y la regeneración en el hígado, en el que la MMP10 presenta un papel hepatoprotector. En cambio, el descubrimiento de la fuerte interacción entre la MMP10 y el eje SDF1/CXCR4 sugiere que la inhibición combinada de ambos podría ser útil para frenar el crecimiento y la invasión del HCC. Son necesarios un mayor conocimiento del papel de las MMPs de manera individual en diferentes enfermedades y estadios de las mismas y el desarrollo de inhibidores más específicos, o incluso promotores de la actividad MMP, para ayudar a superar las limitaciones de los ensayos clínicos llevados a cabo hasta la fecha utilizando a las MMPs como dianas farmacológicas.

CONCLUSIONES

1. La expresión de la MMP10 es baja en el hígado sano, pero es rápidamente inducida tras el daño hepático en diferentes tipos celulares incluyendo hepatocitos, epitelio biliar y células inflamatorias. La inducción de su expresión en modelos experimentales de daño y regeneración hepática, en hígados cirróticos y en el HCC, señala su implicación en dichos procesos.
2. Los cambios en la composición de la MEC y la actividad combinada de diferentes factores de crecimiento como el TGF β y los ligandos del EGFR, son importantes en la regulación de la expresión hepática de la MMP10 durante la respuesta al daño.
3. La MMP10 desempeña un papel hepatoprotector en los modelos experimentales de daño y regeneración, participando en la resolución de las lesiones necróticas y de los coágulos intrahepáticos de agregados insolubles de fibrina y fibronectina.
4. La MMP10 está implicada en la transformación neoplásica del hígado y en la progresión tumoral del HCC, como sugiere su sobre-expresión en los hígados cirróticos, en las muestras de HCC y en el modelo de hepatocarcinogénesis experimental. La expresión de esta MMP contribuye a la vascularización de las lesiones neoplásicas, el crecimiento tumoral y la actividad metastática de las células de HCC.
5. La interacción de la MMP10 con la vía de señalización SDF1/CXCR4 media, al menos en parte, el efecto pro-tumorigénico de esta proteasa, ya que la promoción de la migración de las células de HCC mediada por la MMP10 depende en gran medida de la señalización vía CXCR4.
6. La hipoxia y el SDF1 inducen la transcripción de la MMP10 a través de la vía de señalización MEK/ERK1/2 y un elemento de respuesta a AP-1 de la región proximal del promotor de la proteasa. La MMP10, a su vez, estimula la expresión del CXCR4, en parte mediante la generación de ROS.
7. En conjunto estos datos indican que la MMP10 es una metaloproteasa cuya expresión responde potentemente al microambiente tumoral del HCC, y que a su vez contribuye a modificarlo facilitando la progresión tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Taub, R., *Liver regeneration: from myth to mechanism*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 836-47.
2. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 286-300.
3. Kang, L.I., W.M. Mars, and G.K. Michalopoulos, *Signals and cells involved in regulating liver regeneration*. Cells, 2012. **1**(4): p. 1261-92.
4. Bohm, F., et al., *Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(8): p. 294-305.
5. Viebahn, C.S. and G.C. Yeoh, *What fires prometheus? The link between inflammation and regeneration following chronic liver injury*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(5): p. 855-73.
6. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 209-18.
7. Libbrecht, L., V. Desmet, and T. Roskams, *Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis*. Liver Int, 2005. **25**(1): p. 16-27.
8. Park, E.J., et al., *Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression*. Cell, 2010. **140**(2): p. 197-208.
9. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas*. Am J Pathol, 2010. **176**(1): p. 2-13.
10. Uriarte, I., et al., *Identification of fibroblast growth factor 15 as a novel mediator of liver regeneration and its application in the prevention of post-resection liver failure in mice*. Gut, 2013. **62**(6): p. 899-910.
11. Higgins, G.M. and R.M. Anderson, *Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver white rat following partial surgical removal*. Arch Pathol, 1931. **12**: p. 186-202.
12. Mohammed, F.F. and R. Khokha, *Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(10): p. 555-63.
13. Fan, M., et al., *Bile acid signaling and liver regeneration*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1849**(2): p. 196-200.
14. Berasain, C., et al., *Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice*. Gastroenterology, 2005. **128**(2): p. 424-32.
15. Fausto, N., J.S. Campbell, and K.J. Riehle, *Liver regeneration*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S45-53.
16. Bruix, J., G.J. Gores, and V. Mazzaferro, *Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives*. Gut, 2014. **63**(5): p. 844-55.

17. Llovet, J.M. and V. Hernandez-Gea, *Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(8): p. 2072-9.
18. Hernandez-Gea, V., et al., *Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2013. **144**(3): p. 512-27.
19. Coleman, W.B., *Mechanisms of human hepatocarcinogenesis*. Curr Mol Med, 2003. **3**(6): p. 573-88.
20. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
21. Sze, K.M., et al., *C-terminal truncated hepatitis B virus x protein is associated with metastasis and enhances invasiveness by C-Jun/matrix metalloproteinase protein 10 activation in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2013. **57**(1): p. 131-9.
22. Berasain, C., et al., *Inflammation and liver cancer: new molecular links*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1155**: p. 206-21.
23. Castillo, J., et al., *Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells*. Cancer Res, 2006. **66**(12): p. 6129-38.
24. Villanueva, A. and J.M. Llovet, *Liver cancer in 2013: Mutational landscape of HCC--the end of the beginning*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(2): p. 73-4.
25. Gialeli, C., A.D. Theocharis, and N.K. Karamanos, *Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting*. FEBS J, 2011. **278**(1): p. 16-27.
26. Rosmorduc, O. and C. Housset, *Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease*. Semin Liver Dis, 2010. **30**(3): p. 258-70.
27. Kim, T.H., et al., *Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat*. Hepatology, 1997. **26**(4): p. 896-904.
28. Bezerra, J.A., et al., *Plasminogen deficiency leads to impaired remodeling after a toxic injury to the liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15143-8.
29. Olle, E.W., et al., *Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice*. Hepatology, 2006. **44**(3): p. 540-9.
30. Tsujimoto, I., et al., *Critical role of factor XIII in the initial stages of carbon tetrachloride-induced adult liver remodeling*. Am J Pathol, 2011. **179**(6): p. 3011-9.
31. Friedman, S.L., *Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies*. N Engl J Med, 1993. **328**(25): p. 1828-35.

32. Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2247-50.
33. Roselli, H.T., et al., *Liver regeneration is transiently impaired in urokinase-deficient mice*. Am J Physiol, 1998. **275**(6 Pt 1): p. G1472-9.
34. Ng, V.L., et al., *Plasminogen deficiency results in poor clearance of non-fibrin matrix and persistent activation of hepatic stellate cells after an acute injury*. J Hepatol, 2001. **35**(6): p. 781-9.
35. Wu, S.D., et al., *Role of the microenvironment in hepatocellular carcinoma development and progression*. Cancer Treat Rev, 2012. **38**(3): p. 218-25.
36. Rani, B., et al., *Role of the tissue microenvironment as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(15): p. 4128-40.
37. Gross, J. and C.M. Lapiere, *Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. **48**: p. 1014-22.
38. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.
39. Chakraborti, S., et al., *Regulation of matrix metalloproteinases: an overview*. Mol Cell Biochem, 2003. **253**(1-2): p. 269-85.
40. Yan, C., L. Zhou, and Y.P. Han, *Contribution of hepatic stellate cells and matrix metalloproteinase 9 in acute liver failure*. Liver Int, 2008. **28**(7): p. 959-71.
41. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. Circ Res, 2003. **92**(8): p. 827-39.
42. Orbe, J., et al., *Matrix metalloproteinase-10 effectively reduces infarct size in experimental stroke by enhancing fibrinolysis via a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-mediated mechanism*. Circulation, 2011. **124**(25): p. 2909-19.
43. Hemmann, S., et al., *Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies*. J Hepatol, 2007. **46**(5): p. 955-75.
44. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-74.
45. Kim, T.H., et al., *Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration*. Hepatology, 2000. **31**(1): p. 75-82.
46. Westermarck, J. and V.M. Kahari, *Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion*. FASEB J, 1999. **13**(8): p. 781-92.
47. Benbow, U. and C.E. Brinckerhoff, *The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?* Matrix Biol, 1997. **15**(8-9): p. 519-26.

48. Clark, I.M., et al., *The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1362-78.
49. Couillard, J., et al., *The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **342**(4): p. 1233-9.
50. Ha, C.H., et al., *VEGF stimulates HDAC7 phosphorylation and cytoplasmic accumulation modulating matrix metalloproteinase expression and angiogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(10): p. 1782-8.
51. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.
52. Knittel, T., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat*. Histochem Cell Biol, 2000. **113**(6): p. 443-53.
53. Perugorria, M.J., et al., *The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis*. Hepatology, 2008. **48**(4): p. 1251-61.
54. Iredale, J.P., *Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments*. BMJ, 2003. **327**(7407): p. 143-7.
55. Uchinami, H., et al., *Loss of MMP 13 attenuates murine hepatic injury and fibrosis during cholestasis*. Hepatology, 2006. **44**(2): p. 420-9.
56. Fallowfield, J.A., et al., *Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 5288-95.
57. Giannelli, G., et al., *Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer, 2002. **97**(4): p. 425-31.
58. Okazaki, I. and Y. Inagaki, *Novel strategies for hepatocellular carcinoma based on MMPs science*. Anticancer Agents Med Chem, 2012. **12**(7): p. 753-63.
59. Monvoisin, A., et al., *Involvement of matrix metalloproteinase type-3 in hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatocellular carcinoma cells*. Int J Cancer, 2002. **97**(2): p. 157-62.
60. Chen, J.S., et al., *Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in liver cancer*. Carcinogenesis, 2013. **34**(1): p. 10-9.
61. Berasain, C. and M.A. Avila, *The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis*. J Gastroenterol, 2014. **49**(1): p. 9-23.
62. Vandenbroucke, R.E. and C. Libert, *Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition?* Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(12): p. 904-27.

63. Rodriguez, J.A., et al., *Metalloproteinases and atherothrombosis: MMP-10 mediates vascular remodeling promoted by inflammatory stimuli*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 2916-21.
64. Nakamura, H., et al., *Activation of the precursor of human stromelysin 2 and its interactions with other matrix metalloproteinases*. Eur J Biochem, 1998. **253**(1): p. 67-75.
65. Wilkins-Port, C.E., et al., *TGF-beta1 + EGF-initiated invasive potential in transformed human keratinocytes is coupled to a plasmin/MMP-10/MMP-1-dependent collagen remodeling axis: role for PAI-1*. Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 4081-91.
66. Bord, S., et al., *Stromelysin-1 (MMP-3) and stromelysin-2 (MMP-10) expression in developing human bone: potential roles in skeletal development*. Bone, 1998. **23**(1): p. 7-12.
67. Bertini, I., et al., *Crystal structure of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 10*. J Mol Biol, 2004. **336**(3): p. 707-16.
68. Windsor, L.J., et al., *Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human keratinocytes in response to cytokines and phorbol esters*. J Biol Chem, 1993. **268**(23): p. 17341-7.
69. Saarialho-Kere, U.K., et al., *Distinct populations of basal keratinocytes express stromelysin-1 and stromelysin-2 in chronic wounds*. J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 79-88.
70. Chang, S., et al., *Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10*. Cell, 2006. **126**(2): p. 321-34.
71. Batra, J., et al., *Matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) interaction with tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2: binding studies and crystal structure*. J Biol Chem, 2012. **287**(19): p. 15935-46.
72. Krampert, M., et al., *Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5242-54.
73. Koller, F.L., et al., *Lack of MMP10 exacerbates experimental colitis and promotes development of inflammation-associated colonic dysplasia*. Lab Invest, 2012. **92**(12): p. 1749-59.
74. Rohani, M.G., et al., *MMP-10 Regulates Collagenolytic Activity of Alternatively Activated Resident Macrophages*. J Invest Dermatol, 2015.
75. Shanmukhappa, K., et al., *Plasmin-mediated proteolysis is required for hepatocyte growth factor activation during liver repair*. J Biol Chem, 2009. **284**(19): p. 12917-23.
76. Bezerra, J.A., et al., *Plasminogen activators direct reorganization of the liver lobule after acute injury*. Am J Pathol, 2001. **158**(3): p. 921-9.

77. Madlener, M., et al., *Regulation of the expression of stromelysin-2 by growth factors in keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing*. *Biochem J*, 1996. **320** (Pt 2): p. 659-64.
78. Ishikawa, F., et al., *Transcriptional induction of MMP-10 by TGF-beta, mediated by activation of MEF2A and downregulation of class IIa HDACs*. *Oncogene*, 2010. **29**(6): p. 909-19.
79. Orbe, J., et al., *Matrix metalloproteinase-10 is upregulated by thrombin in endothelial cells and increased in patients with enhanced thrombin generation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(12): p. 2109-16.
80. Deraz, E.M., et al., *MMP-10/stromelysin-2 promotes invasion of head and neck cancer*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e25438.
81. Zhang, D.Y. and S.L. Friedman, *Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis*. *Hepatology*, 2012. **56**(2): p. 769-75.
82. Lichtinghagen, R., et al., *Expression pattern of matrix metalloproteinases in human liver*. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1995. **33**(2): p. 65-71.
83. Castillo, J., et al., *Amphiregulin induces the alternative splicing of p73 into its oncogenic isoform DeltaEx2p73 in human hepatocellular tumors*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(5): p. 1805-15 e1-4.
84. Mitchell, C., et al., *Overexpression of Bcl-2 in hepatocytes protects against injury but does not attenuate fibrosis in a mouse model of chronic cholestatic liver disease*. *Lab Invest*, 2011. **91**(2): p. 273-82.
85. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(2): p. 581-5.
86. Uriarte, I., et al., *Ileal FGF15 contributes to fibrosis-associated hepatocellular carcinoma development*. *Int J Cancer*, 2014.
87. Lasarte, J.J., et al., *The extra domain A from fibronectin targets antigens to TLR4-expressing cells and induces cytotoxic T cell responses in vivo*. *J Immunol*, 2007. **178**(2): p. 748-56.
88. Osterreicher, C.H. and M. Trauner, *Animal models of biliary tract injury*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012. **28**(3): p. 239-43.
89. Berasain, C., et al., *Novel role for amphiregulin in protection from liver injury*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(19): p. 19012-20.
90. Berasain, C., et al., *New molecular targets for hepatocellular carcinoma: the ErbB1 signaling system*. *Liver Int*, 2007. **27**(2): p. 174-85.
91. Seki, E., et al., *CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice*. *Hepatology*, 2009. **50**(1): p. 185-97.

92. Isayama, F., et al., *LPS signaling enhances hepatic fibrogenesis caused by experimental cholestasis in mice*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(6): p. G1318-28.
93. Huang, W.C., et al., *Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor-kappaB*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e42507.
94. Murray, M.Y., et al., *Macrophage migration and invasion is regulated by MMP10 expression*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63555.
95. Chang, M.L., et al., *Regulation of fibronectin splicing in sinusoidal endothelial cells from normal or injured liver*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(52): p. 18093-8.
96. Okamura, Y., et al., *The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(13): p. 10229-33.
97. Treiber, M., et al., *Myeloid, but not pancreatic, RelA/p65 is required for fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis*. *Gastroenterology*, 2011. **141**(4): p. 1473-85, 1485 e1-7.
98. Strey, C.W., et al., *The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration*. *J Exp Med*, 2003. **198**(6): p. 913-23.
99. Mitchell, C. and H. Willenbring, *A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(7): p. 1167-70.
100. Fickert, P., et al., *Oncosis represents the main type of cell death in mouse models of cholestasis*. *J Hepatol*, 2005. **42**(3): p. 378-85.
101. Wagner, M., et al., *Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(3): p. 825-38.
102. Mehendale, H.M., *Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury*. *Toxicol Pathol*, 2005. **33**(1): p. 41-51.
103. Neubauer, K., et al., *Accumulation and cellular localization of fibrinogen/fibrin during short-term and long-term rat liver injury*. *Gastroenterology*, 1995. **108**(4): p. 1124-35.
104. Beier, J.I., et al., *Fibrin accumulation plays a critical role in the sensitization to lipopolysaccharide-induced liver injury caused by ethanol in mice*. *Hepatology*, 2009. **49**(5): p. 1545-53.
105. Weerasinghe, S.V., et al., *Fibrinogen-gamma proteolysis and solubility dynamics during apoptotic mouse liver injury: heparin prevents and treats liver damage*. *Hepatology*, 2011. **53**(4): p. 1323-32.

106. Luyendyk, J.P., et al., *Tissue factor-dependent coagulation contributes to alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in mice*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. **296**(4): p. G840-9.
107. Moriya, K., et al., *Fibronectin is essential for survival but is dispensable for proliferation of hepatocytes in acute liver injury in mice*. *Hepatology*, 2012. **56**(1): p. 311-21.
108. Vierkotten, S., P.S. Muether, and S. Fauser, *Overexpression of HTRA1 leads to ultrastructural changes in the elastic layer of Bruch's membrane via cleavage of extracellular matrix components*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e22959.
109. Horowitz, J.C., et al., *Plasminogen activation induced pericellular fibronectin proteolysis promotes fibroblast apoptosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008. **38**(1): p. 78-87.
110. Heo, S.H., et al., *Expression profiling of ETS and MMP factors in VEGF-activated endothelial cells: role of MMP-10 in VEGF-induced angiogenesis*. *J Cell Physiol*, 2010. **224**(3): p. 734-42.
111. Wong, C.C., A.K. Kai, and I.O. Ng, *The impact of hypoxia in hepatocellular carcinoma metastasis*. *Front Med*, 2014. **8**(1): p. 33-41.
112. Bobadilla, M., et al., *The CXCR4/SDF1 axis improves muscle regeneration through MMP-10 activity*. *Stem Cells Dev*, 2014. **23**(12): p. 1417-27.
113. Sutton, A., et al., *Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion*. *Mol Cancer Res*, 2007. **5**(1): p. 21-33.
114. Bertran, E., et al., *Overactivation of the TGF-beta pathway confers a mesenchymal-like phenotype and CXCR4-dependent migratory properties to liver tumor cells*. *Hepatology*, 2013. **58**(6): p. 2032-44.
115. Chetram, M.A. and C.V. Hinton, *ROS-mediated regulation of CXCR4 in cancer*. *Front Biol (Beijing)*, 2013. **8**(3).
116. Radisky, D.C., et al., *Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability*. *Nature*, 2005. **436**(7047): p. 123-7.
117. Schimanski, C.C., et al., *Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4*. *Br J Cancer*, 2006. **95**(2): p. 210-7.
118. Dillmann, F., et al., *Plerixafor inhibits chemotaxis toward SDF-1 and CXCR4-mediated stroma contact in a dose-dependent manner resulting in increased susceptibility of BCR-ABL+ cell to Imatinib and Nilotinib*. *Leuk Lymphoma*, 2009. **50**(10): p. 1676-86.
119. Abe, Y., et al., *Liver epithelial cells proliferate under hypoxia and protect the liver from ischemic injury via expression of HIF-1 alpha target genes*. *Surgery*, 2012. **152**(5): p. 869-78.

120. Ghanem, I., et al., *Insights on the CXCL12-CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma carcinogenesis*. Am J Transl Res, 2014. **6**(4): p. 340-52.
121. Baek, J.H., et al., *Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis*. Oncogene, 2000. **19**(40): p. 4621-31.
122. Briso, E.M., et al., *Inflammation-mediated skin tumorigenesis induced by epidermal c-Fos*. Genes Dev, 2013. **27**(18): p. 1959-73.
123. Almodovar-Garcia, K., et al., *ANKRD1 acts as a transcriptional repressor of MMP13 via the AP-1 site*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(8): p. 1500-11.
124. Kassim, S.Y., et al., *Individual matrix metalloproteinases control distinct transcriptional responses in airway epithelial cells infected with Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, 2007. **75**(12): p. 5640-50.
125. Montero, I., et al., *C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(7): p. 1369-78.
126. Gill, S.E. and W.C. Parks, *Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1334-47.
127. Berasain, C., et al., *The epidermal growth factor receptor: a link between inflammation and liver cancer*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(7): p. 713-25.
128. Ruiz, P.A. and G. Jarai, *Collagen I induces discoidin domain receptor (DDR) 1 expression through DDR2 and a JAK2-ERK1/2-mediated mechanism in primary human lung fibroblasts*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 12912-23.
129. Bergheim, I., et al., *Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **316**(2): p. 592-600.
130. Luyendyk, J.P., N. Mackman, and B.P. Sullivan, *Role of fibrinogen and protease-activated receptors in acute xenobiotic-induced cholestatic liver injury*. Toxicol Sci, 2011. **119**(1): p. 233-43.
131. Anstee, Q.M., et al., *Coagulation status modulates murine hepatic fibrogenesis: implications for the development of novel therapies*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(8): p. 1336-43.
132. Si-Tayeb, K., et al., *Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis*. Am J Pathol, 2006. **169**(4): p. 1390-401.
133. Eguchi, T., et al., *Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(7): p. 2391-413.

134. Arii, S., et al., *Overexpression of matrix metalloproteinase 9 gene in hepatocellular carcinoma with invasive potential*. Hepatology, 1996. **24**(2): p. 316-22.
135. Balbin, M., et al., *Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice*. Nat Genet, 2003. **35**(3): p. 252-7.
136. Thieringer, F.R., et al., *Liver-specific overexpression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in transgenic mice accelerates development of hepatocellular carcinoma*. Mol Carcinog, 2012. **51**(6): p. 439-48.
137. Frederick, L.A., et al., *Matrix metalloproteinase-10 is a critical effector of protein kinase Ciota-Par6alpha-mediated lung cancer*. Oncogene, 2008. **27**(35): p. 4841-53.
138. Justilien, V., et al., *Matrix metalloproteinase-10 is required for lung cancer stem cell maintenance, tumor initiation and metastatic potential*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35040.
139. Staller, P., et al., *Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL*. Nature, 2003. **425**(6955): p. 307-11.
140. Kaewpila, S., et al., *Manganese superoxide dismutase modulates hypoxia-inducible factor-1 alpha induction via superoxide*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2781-8.
141. Morita, Y., et al., *Expression of urokinase-type plasminogen activator receptor in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 1997. **25**(4): p. 856-61.
142. Avila, M.A., et al., *New therapies for hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2006. **25**(27): p. 3866-84.
143. Zhang, G., et al., *Matrix metalloproteinase-10 promotes tumor progression through regulation of angiogenic and apoptotic pathways in cervical tumors*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 310.
144. Ho, I.A., et al., *Matrix metalloproteinase-1-mediated mesenchymal stem cell tumor tropism is dependent on crosstalk with stromal derived growth factor 1/C-X-C chemokine receptor 4 axis*. FASEB J, 2014. **28**(10): p. 4359-68.
145. Garcia-Irigoyen, O., et al., *Matrix metalloproteinase 10 contributes to hepatocarcinogenesis in a novel crosstalk with the stromal derived factor 1/C-X-C chemokine receptor 4 axis*. Hepatology, 2015. **62**(1): p. 166-78.

ANEXO

Matrix metalloproteinase-10 expression is induced during hepatic injury and plays a fundamental role in liver tissue repair

Liver International ISSN 1478-3223

Oihane Garcia-Irigoyen^{1†}, Simone Carotti^{2†}, Maria U. Latasa¹, Iker Uriarte^{1,3}, Maite G. Fernandez-Barrena^{1,3}, Maria Elizalde¹, Raquel Urtasun¹, Umberto Vespasiani-Gentilucci⁴, Sergio Morini², Jesus M. Banales^{3,5}, William C. Parks⁶, Jose A. Rodriguez⁷, Josune Orbe⁷, Jesus Prieto^{1,3}, Jose A. Pizarro⁷, Carmen Berasain^{1,3‡} and Matias A. Avila^{1,3‡}

1 Centro de Investigacion Medica Aplicada (CIMA), Division of Hepatology and Gene Therapy, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

2 Centre for Integrated biomedical Research (CIR), Laboratory of Microscopic and Ultrastructural Anatomy, University Campus Bio-Medico of Rome, Rome, Italy

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

4 Liver Unit, University Campus Bio-Medico of Rome, Rome, Italy

5 Department of Liver and Gastrointestinal Diseases, Biodonostia Research Institute-Donostia University Hospital,

IKERBASQUE, University of Basque

Country, San Sebastian, Spain

6 Center for Lung Biology, University of Washington, Seattle, WA, USA

7 Centro de Investigacion Medica Aplicada (CIMA), Division of Cardiovascular Sciences, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

DOI:10.1111/liv.12337

Liver Int. 2014; 34: e257–e270

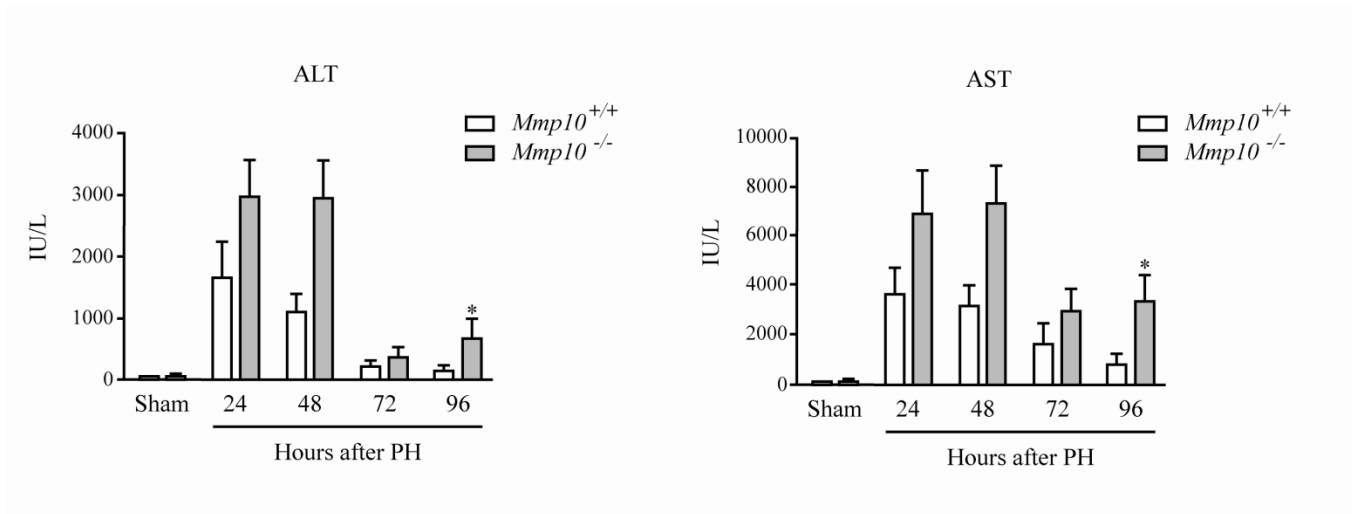


Figure S1. Circulating transaminases levels in wild type and *Mmp10*^{-/-} mice after partial hepatectomy.

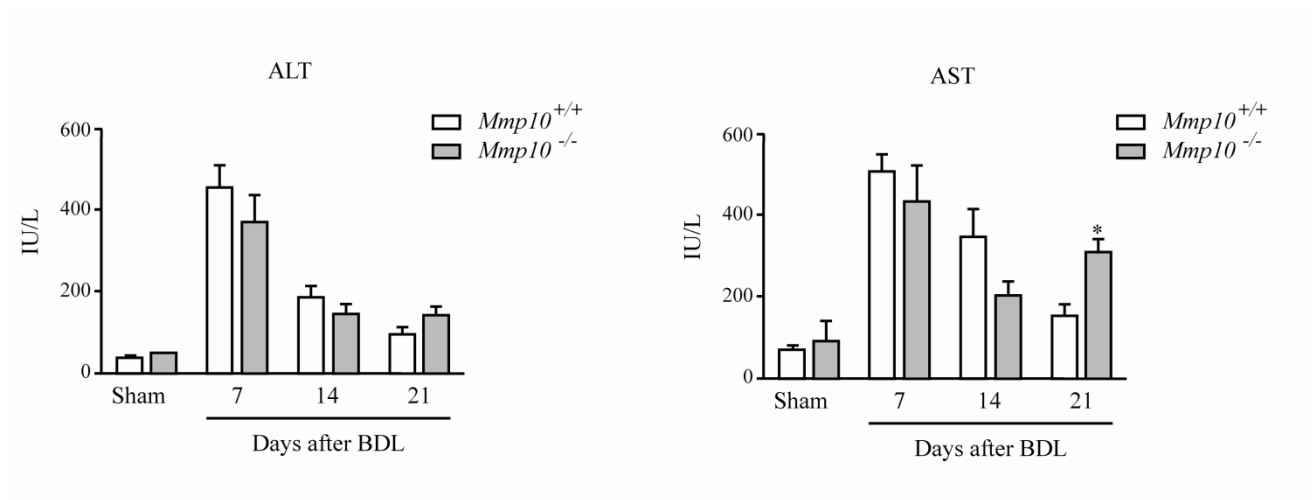


Figure S2. Circulating transaminases levels in wild type and *Mmp10*^{-/-} mice after bile duct ligation.

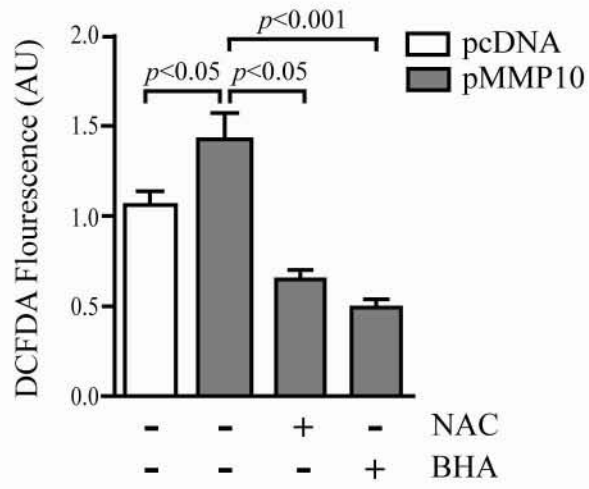
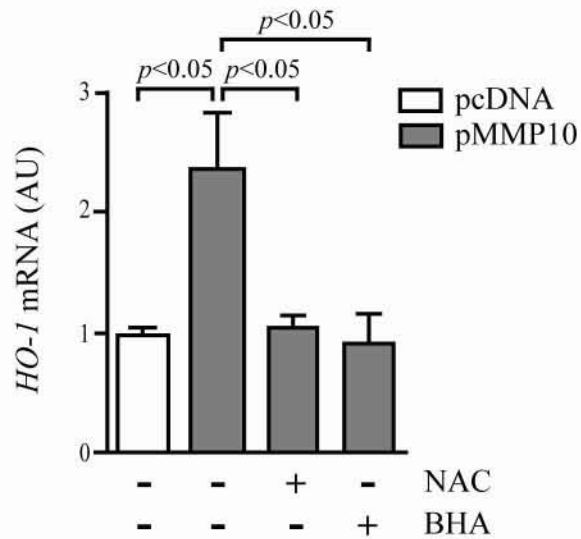
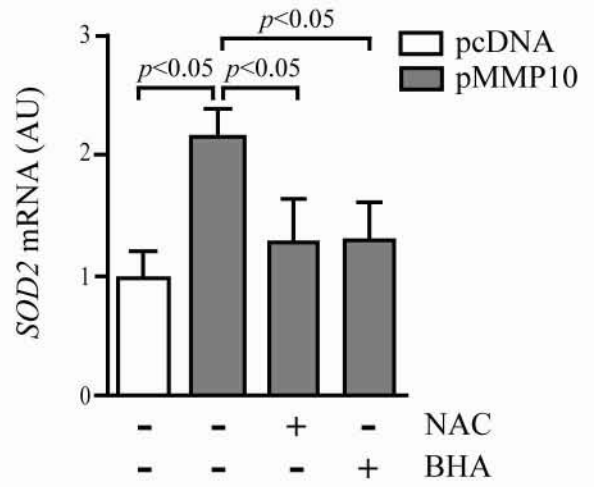
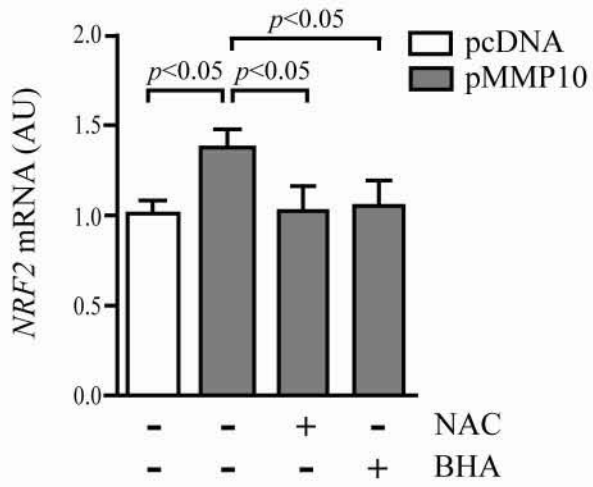
Supplementary Table 1.

Primers used for qPCR

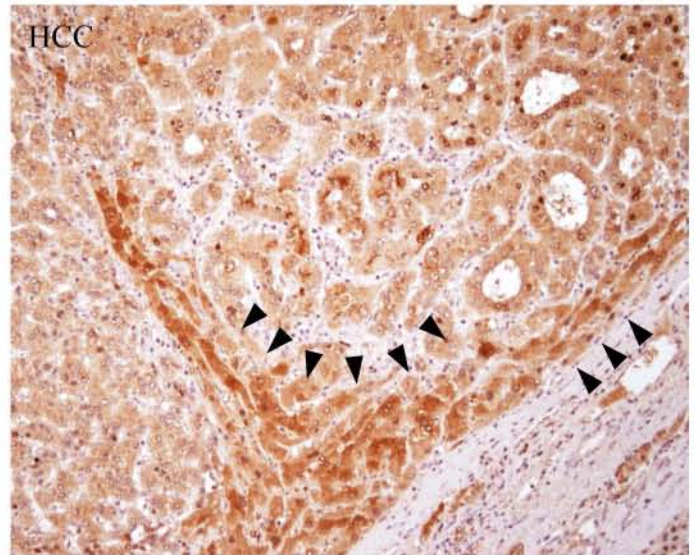
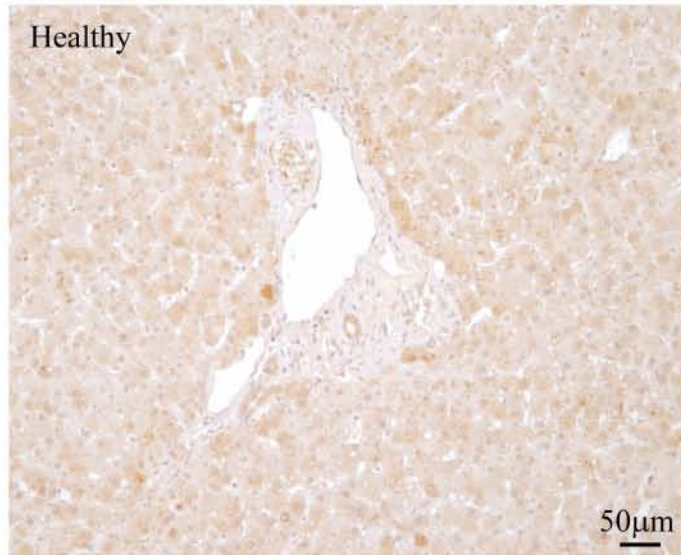
Gene	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')
Actin	CGCGTCCACCCGCGAG	CCTGGTGCCTAGGGCG
AR	CTGCTGGTCTTAGGCTCAGG	CCAGGTTCTCGATGTATCTGC
EGF	CCCTGGATCCTATTACTGCAC	GAAAGCAATCACATTCCCAGG
Ereg	ACAAAGTGTAGCTCTGACATG	CGATTTCTGTACCATCTGCAG
HB-EGF	ATGAAGCTGCTGCCGTCGGTG	TGGATGCAGTAGTCCTTGTATTTC
Histone 3A	AAAGCCGCTCGCAAGAGTGCG	ACTTGCCTCCTGCAAAGCAC
MCP1	CCACTCACCTGCTGCTACTC	TTCACATTCAAAGGTGCTGAAG
MMP10 human	GCTCTGCCTATCCTCTGAGTG	CAACGTCAGGAACTCCACACC
MMP10 mouse	CCTGTGTTGTCTGTCTCTCCAAGA	CGTGCTGACTGAATCAAAGGAC
TNF α	GAGTGACAAGCCTGTAGCCC	CCCTTCTCCAGCTGGAAGAC

Matrix Metalloproteinase 10 Contributes to
Hepatocarcinogenesis in a Novel Crosstalk
With the Stromal Derived Factor 1/C-X-C Chemokine
Receptor 4 Axis

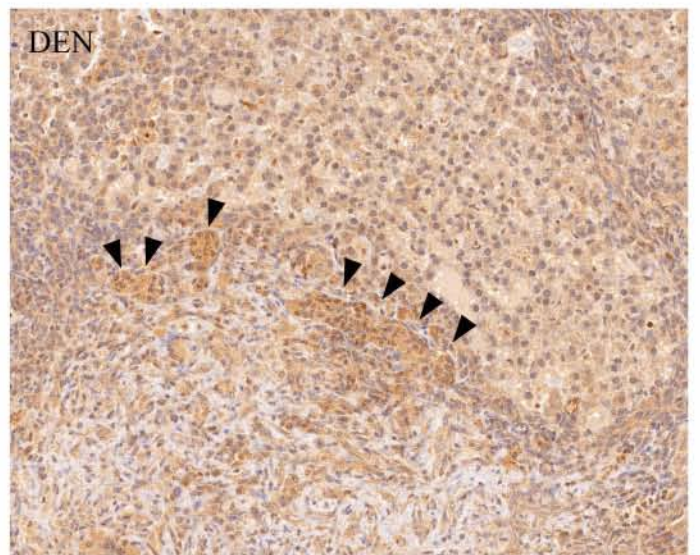
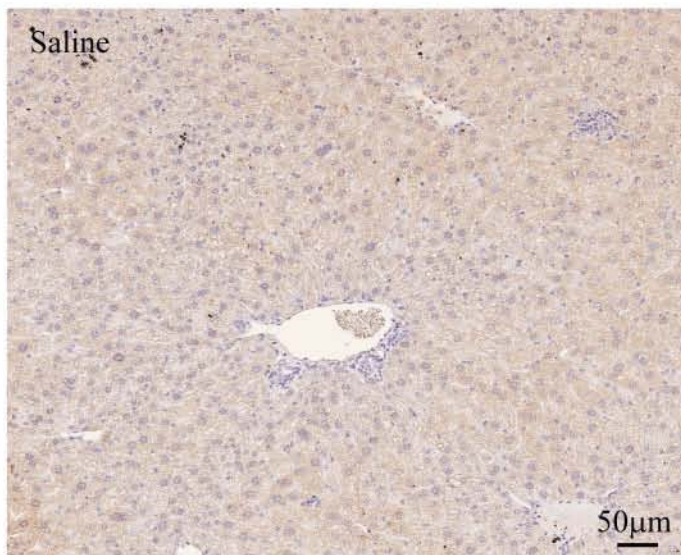
Oihane Garcia-Irigoyen,^{1*} Maria U. Latasa,^{1,7*} Simone Carotti,² Iker Uriarte,^{1,3,7} Maria Elizalde,¹ Raquel Urtasun,^{1,7} Umberto Vespasiani-Gentilucci,⁴ Sergio Morini,² Patricia Benito,⁵ Jose M. Ladero,⁵ Jose A. Rodriguez,^{6,7} Jesus Prieto,^{1,3} Josune Orbe,^{6,7} Jose A. P_aramo,^{6,7} Maite G. Fern_andez-Barrena,^{1,7} Carmen Berasain,^{1,3,7**} and Matias A. Avila^{1,3,7**}

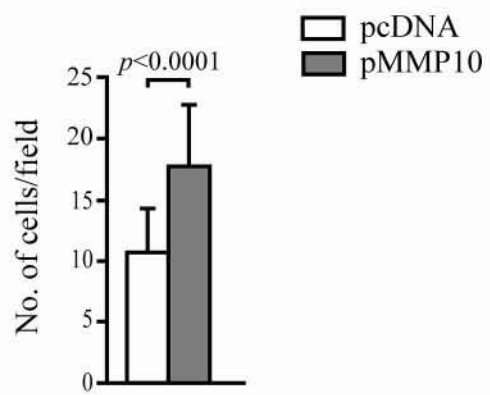
A**B**

A



B





Legends to the Supplementary Figures

Supplementary Fig. 1. Measurement of ROS levels and expression of ROS-responsive genes in control (pcDNA) and MMP10 expressing (pMMP10) Huh7 cells. (A) ROS levels assessed by DCFDA in cells cultured during 48 h and treated as indicated with NAC (10 mM) or BHA (75 mM). (B) qPCR analysis of NRF2, heme oxygenase-1 (HO-1) and superoxide dismutase 2 (SOD2) in pcDNA and pMMP10 cells treated as indicated above.

Supplementary Fig. 2. Immunohistochemical detection of CXCR4 in control and HCC tissues. (A) Representative images of normal human liver tissue, left panel, and human HCC tissue, right panel. (B) Representative images of control mouse liver tissue, left panel, and DEN-induced HCC (11 months after DENinjection). Arrowheads point to tumor boundaries, where CXCR4 staining intensity is higher.

Supplementary Fig. 3. Determination of the invasive capacity of control (pcDNA) and MMP10 expressing (pMMP10) Huh7 cells as evaluated in a basement membrane matrigel invasion chamber. Data are from two experiments performed in quadruplicates.

Supplementary Materials and Methods

Histological analyses

Immunohistochemical analyses of MMP10 and CXCR4 in human formalin-fixed paraffin embedded liver tissues were performed with an anti-MMP10 rabbit polyclonal antibody from Abcam (Cambridge, UK) (1:250 dilution) or an anti-CXCR4 mouse monoclonal antibody (Abnova, Taiwan) (1:400 dilution). Negative control tissue slides processed with normal serum were included. MMP10 expression was quantified as the product between a score for the extent of staining positivity and a score for the intensity of staining positivity, as reported previously (1). The extent of positivity (percentage of positive cells) was scored on a scale of 0–3, in which 0= negative, 1= 1–5%, 2= 6–30%, 3= 31–100%. The intensity of staining was scored on a scale of 0–3, in which 0= negative, 1= weakly positive, 2=moderately positive and 3= strongly positive.

Immunohistochemical detection of MMP10 and Ki67 in mouse liver were performed as described (2). Ki67 positive nuclei in tumoral cells were quantitated (five random fields at x200 magnification) (3). CXCR4 was detected with an anti-CXCR4 rabbit polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK)(1:50 dilution). CD31 was detected with a goat polyclonal antibody (R&D System, Abingdon, UK)(1:400 dilution). For quantitation of microvascular density (MVD) in CD31-stained sections five fields at ×200 magnification were captured for each sample in tumor area, and MVD was quantitated as CD31-positive vascular area/total area (% of total area) as described (4). H&E stainings of liver tissue sections from all mice were examined by light microscopy (Olympus BX-51) by two pathologists (SC, SM) blinded to the identity of samples. Histological tumoral lesions were analyzed and measured as described (5).

Cell culture, transfections, treatments, ROS determination, migration and invasion assays.

Human Huh7 HCC cells were cultured as reported (6). Human MMP10 cDNA was cloned in the eukaryotic expression vector pcDNA6/V5-HisB (Invitrogen/Life Technologies). Primers used for cloning are described in Supplementary Table 1. Huh7 cells were stably transfected with this construct or the empty vector as reported (6). Huh7 cells were also transiently transfected with a luciferase reporter pGL-3 vector harboring a 2.0-kb fragment of human *MMP10* 5' region, or a mutant version in which the AP-1 site located between the -67 and -61 positions had been mutated (7), and luciferase activity was measured as previously described (7). Where indicated cells were treated with stromal-derived factor-1 (SDF-1) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), the MEK inhibitor UO-126 (10 μM) or the antioxidants N-acetyl-cysteine (NAC, 10mM) and butylated hydroxyanisole (BHA, 75 μM) (all from Sigma Aldrich). Hypoxic conditions (1% O₂) were induced by culturing cells in a Whitley H35 Hypoxystation (Don Whitley Scientific Ltd, Shipley, UK). ROS concentrations were measured essentially as described(8). Briefly, cells were incubated in the dark with 50 μM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) during 30 min and then were trypsinized, washed with PBS and transferred to multiwell plates to measure fluorescence in an Infinite 200 Tekan fluorimeter.

Cell migration assays were performed with ThinCert 24-well tissue culture inserts (8 μm pore size) (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). Cells (2×10^5) were plated on the upper chamber in serum-free medium and fresh medium (containing 10% fetal calf serum) was added to the bottom chamber. Where indicated the C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) antagonist AMD-3100 (10 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma Aldrich) or plasminogen (5 $\mu\text{g/ml}$) (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN, USA) were added to the

upper chamber. After 18 h the filter membrane was washed and fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were then stained with crystal violet 0.1% in methanol at 2% and counted under the microscope at 200x view. Invasion assays were performed using BD BioCoat Matrigel Invasion Chambers (Corning, Bedford, MA, USA) following the manufacturer's instructions. Cells (2×10^4) were plated on the upper chamber in serum-free medium and fresh medium (containing 10% fetal calf serum) was added to the bottom chamber. After 18 h the filter membrane was washed and fixed with methanol. Cells were washed with PBS and then stained with crystal violet 0.25% in methanol at 2% and counted under the microscope at 200x view.

Western blot analyses

Cells and liver tissues were lysed and homogenates were subjected to Western blot analysis as reported (2). Anti-MMP10 antibody was from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and the anti-CXCR-4 antibody was from Abcam. Blots were also probed with anti-GAPDH antibodies (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA) to show equal loading. Where indicated densitometric analysis of the films was carried out with the ImageJ Image Processing Program (NIH, Bethesda, MD, USA).

Statistical analysis

Data are means \pm SEM. Analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, USA). Data were compared using the Student *t* test or the Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests. A *P* value of <0.05 was considered significant.

References

1. Corradini SG, Morini S, Liguori F, Carotti S, Muda AO, Burza MA, et al. Differential vascular endothelial growth factor A protein expression between small hepatocellular carcinoma and cirrhosis correlates with serum vascular endothelial growth factor A and alpha-fetoprotein. *Liver Int.* 2009;29:103–112.
2. Elizalde M, Urtasun R, Azkona M, Latasa MU, Goñi S, Garcia-Irigoyen O, et al. Splicing regulator SLU7 is essential for maintaining liver homeostasis. *J. Clin. Invest.* 2014;
3. Briso EM, Guinea-Viniegra J, Bakiri L, Rogon Z, Petzelbauer P, Eils R, et al. Inflammation-mediated skin tumorigenesis induced by epidermal c-Fos. *Genes & Development.* 2013;27:1959–1973.
4. Zhang W, Zhu X-D, Sun H-C, Xiong Y-Q, Zhuang P-Y, Xu H-X, et al. Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects. *Clin. Cancer Res.* 2010;16:3420–3430.
5. Uriarte I, Latasa MU, Carotti S, Fernández-Barrena MG, Garcia-Irigoyen O, Elizalde M, et al. Ileal FGF15 contributes to fibrosis-associated hepatocellular carcinoma development. *Int. J. Cancer.* 2014;
6. Latasa MU, Salis F, Urtasun R, Garcia-Irigoyen O, Elizalde M, Uriarte I, et al. Regulation of amphiregulin gene expression by β -catenin signaling in human hepatocellular carcinoma cells: a novel crosstalk between FGF19 and the EGFR system. *PLoS ONE.* 2012;7:e52711.
7. Orbe J, Rodriguez JA, Calvayrac O, Rodríguez-Calvo R, Rodriguez C, Roncal C, et al. Matrix metalloproteinase-10 is upregulated by thrombin in endothelial cells and increased in patients with enhanced thrombin generation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2009;29:2109–2116.
8. Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE, et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature.* 2005;436:123–127.

Supplementary Table S1.

Primers used in this study for qPCR analysis of gene expression (S: sense, AS: antisense)

Gene		Sequence (5'-3')
<i>MMP10</i>	S	GCTCTGCCTATCCTCTGAGTG
	AS	CAACGTCAGGAACTCCACACC
<i>Mmp10</i>	S	CCTGTGTTGTCTGTCTCTCCAAGA
	AS	CGTGCTGACTGAATCAAAGGAC
<i>CXCR4</i>	S	ATCTTCCTGCCACCACATCTA
	AS	TAGCGTCCAGACTGATGAA
<i>Afp</i>	S	GCCATGAAGTGGATCACACC
	AS	CTCCTCGGTGGCTTCCGGAA
<i>HO-1</i>	S	GAAGGAGGCCACCAAGGAGG
	AS	GCGTGGGCCACCAGCAGCTC
<i>NRF2</i>	S	GATCTTGAGTAAGTCGAGAAG
	AS	GGAATGTGGGCAACCTGGGAG
<i>SOD2</i>	S	TTGAGAAGTTTAAGGAGAAGCTGAC
	AS	CTCCCAGTTGATTACATTCC
<i>Histone H3</i>	S	AAAGCCGCTCGCAAGAGTGCG
	AS	ACTTGCCTCCTGCAAAGCAC

Primers used in this study for human *MMP10* cDNA cloning (S: sense, AS: antisense)

Gene		Sequence (5'-3')
<i>MMP10</i>	S	GGTACCATGATGCATCTTGCATTCTTGTC
	AS	GAATTCGTATGGATGCCTCTTGGATAACCTGC

Primers used in this study for human *MMP10* promoter mutagenesis (S: sense, AS: antisense)

Gene		Sequence (5'-3')
<i>MMP10</i>	S	AGACTTAAAAACACATGCAGGAACCATACTGTTGGTGATCTCAGCA
	AS	TGCTGAGATCACCAACAGTATGGTTCTGCATGTGTTTTTAAGTCT