
BASES MOLECULARES DE LA FIBROSIS HEPÁTICA

Pilar Rodríguez Martín
Máster en Biotecnología Sanitaria

Centro Andaluz de Biología Molecular & Medicina Regenerativa (CABIMER)
Organogénesis y enfermedades del páncreas y del hígado – Dra.A. Rojas



UNIVERSIDAD
**PABLO
OLAVIDE**
S E V I L L A

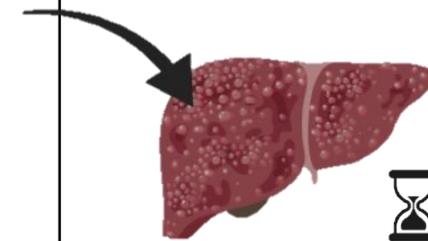
cabimer 
CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA MOLECULAR
& MEDICINA REGENERATIVA

I. INTRODUCCIÓN

Fibrosis hepática: acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular (CME) ante un **daño crónico**

Principales causas

- Infecciones víricas
- Consumo de alcohol
- Esteatohepatitis no alcohólica (NASH)
- Hígado graso no alcohólico (NAFL)
- Enfermedades autoinmunes
- Trastornos crónicos colestáticos

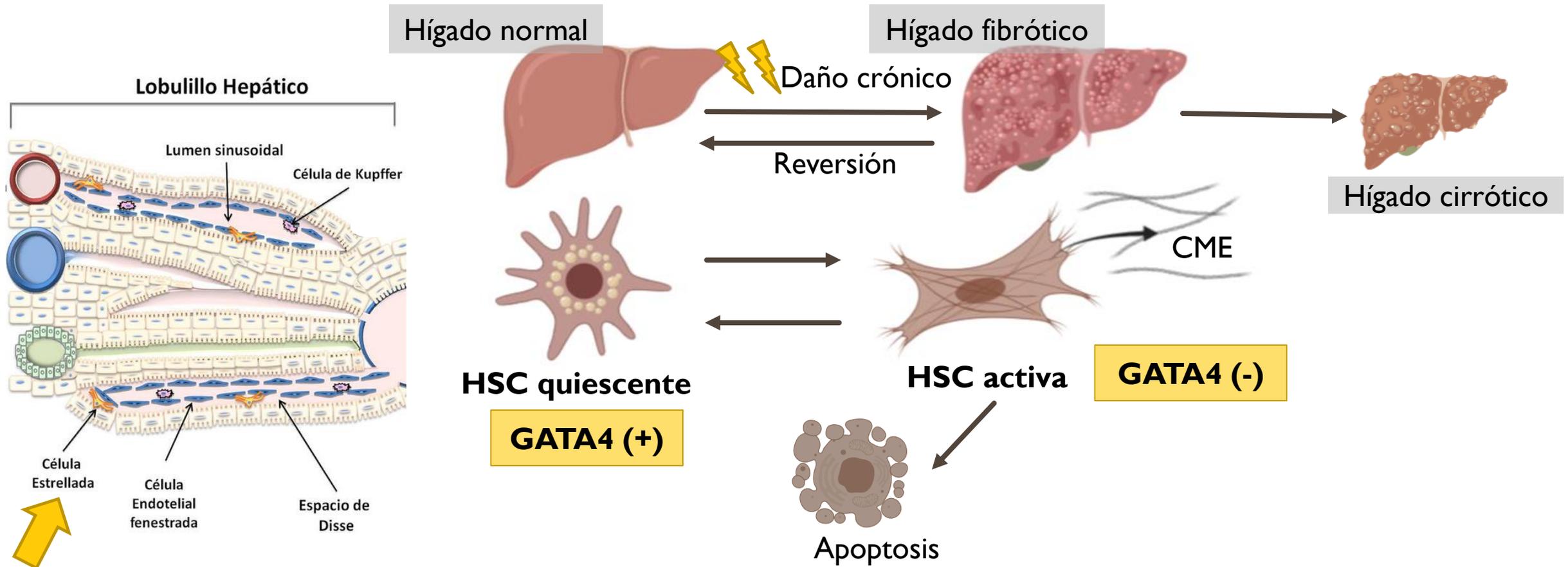


Hepatocarcinoma
Fallo hepático
Muerte



0.9-2% de la población general

2. ANTECEDENTES. EL PAPEL DE GATA4 EN LAS HSCs

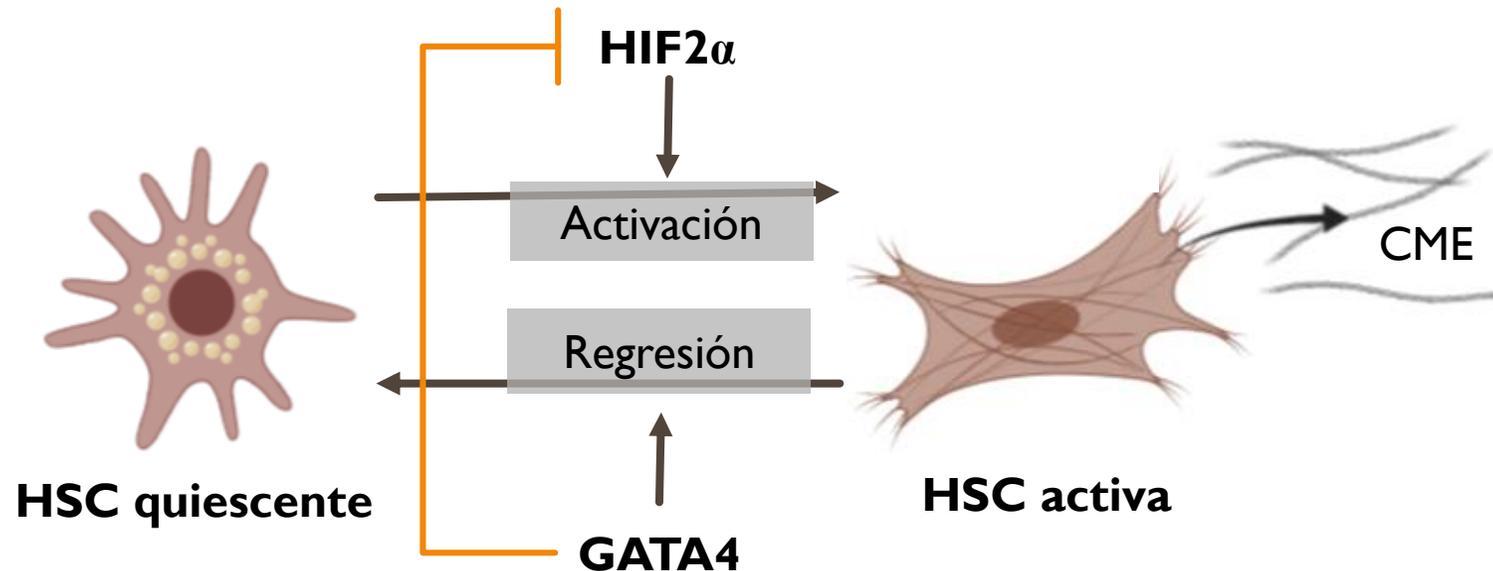


El factor de transcripción GATA4 es crucial para mantener la quiescencia de las Células Hepáticas Estrelladas (HSCs) y prevenir la fibrosis

2. ANTECEDENTES. LA FUNCIÓN DE HIF2 α EN LA FIBROSIS

HIF2 α : factor de transcripción inducible por hipoxia implicado en la activación de las HSCs codificado por *EPAS1* en humanos.

Se han identificado sitios (A/T)GATA(A/G) conservados en EPAS1



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

GATA4 participa en la reversión de la fibrosis hepática induciendo un estado quiescente en las HSCs, para lo que reprime transcripcionalmente HIF2 α .

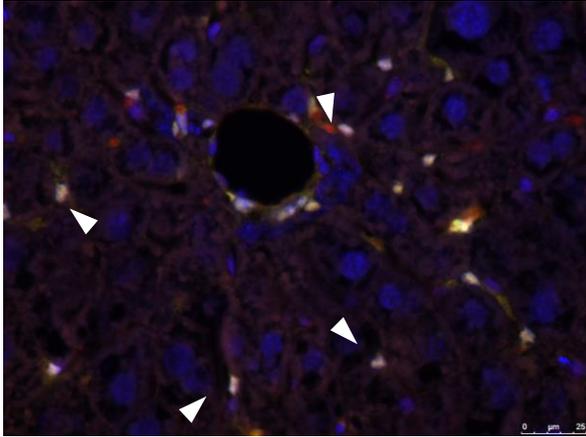
Objetivo 1. Estudiar la función de GATA4 en la reversión de la fibrosis hepática *in vivo*.

Objetivo 2. Estudiar el papel de GATA4 en la regulación de *EPAS1* como mecanismo de inactivación de las HSCs.

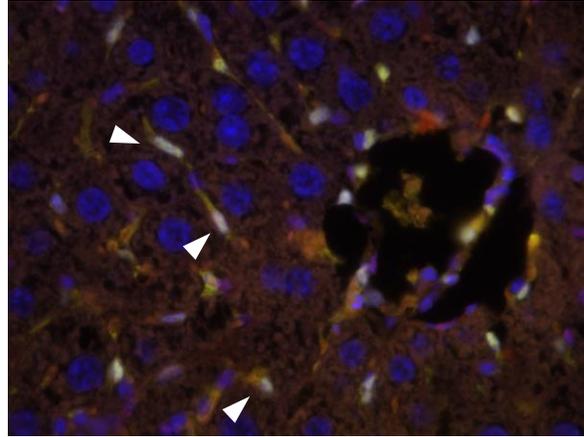
Objetivo 3. Obtener una línea celular hepática con utilidad para el *screening* de fármacos con efecto en la expresión de GATA4 en las HSCs.

3. OBJETIVO I - GATA4 EN LA REVERSIÓN DE LA FIBROSIS

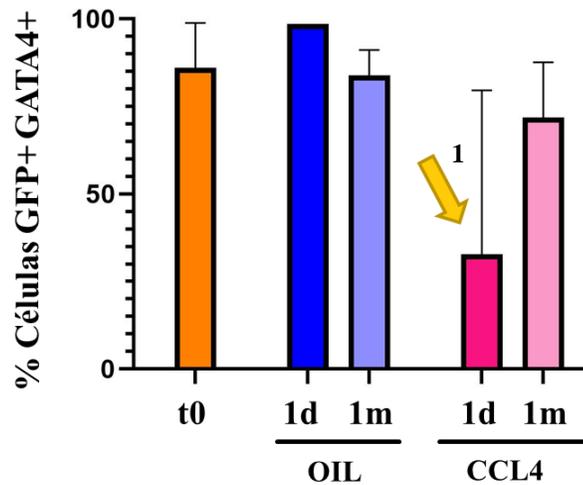
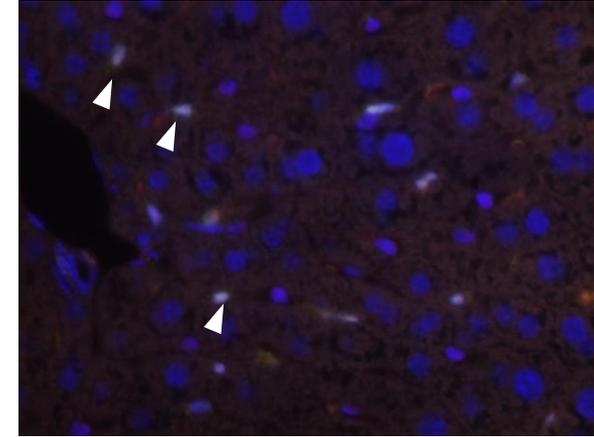
t0



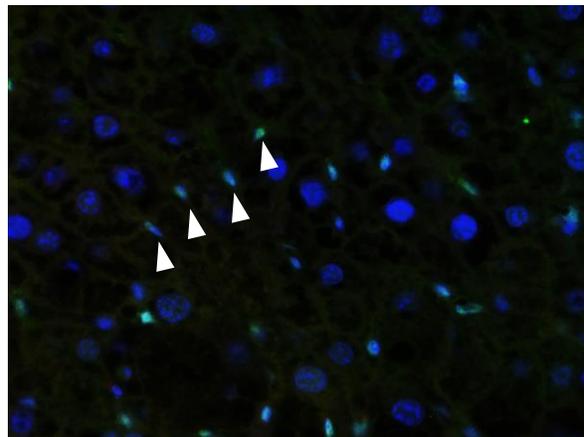
OIL 1 día



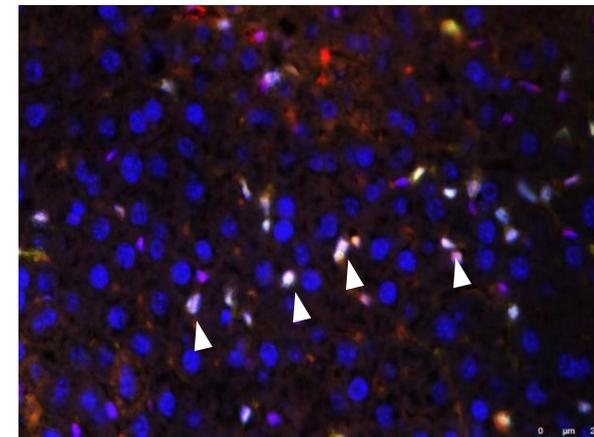
OIL 1 mes



CCL4 1 día

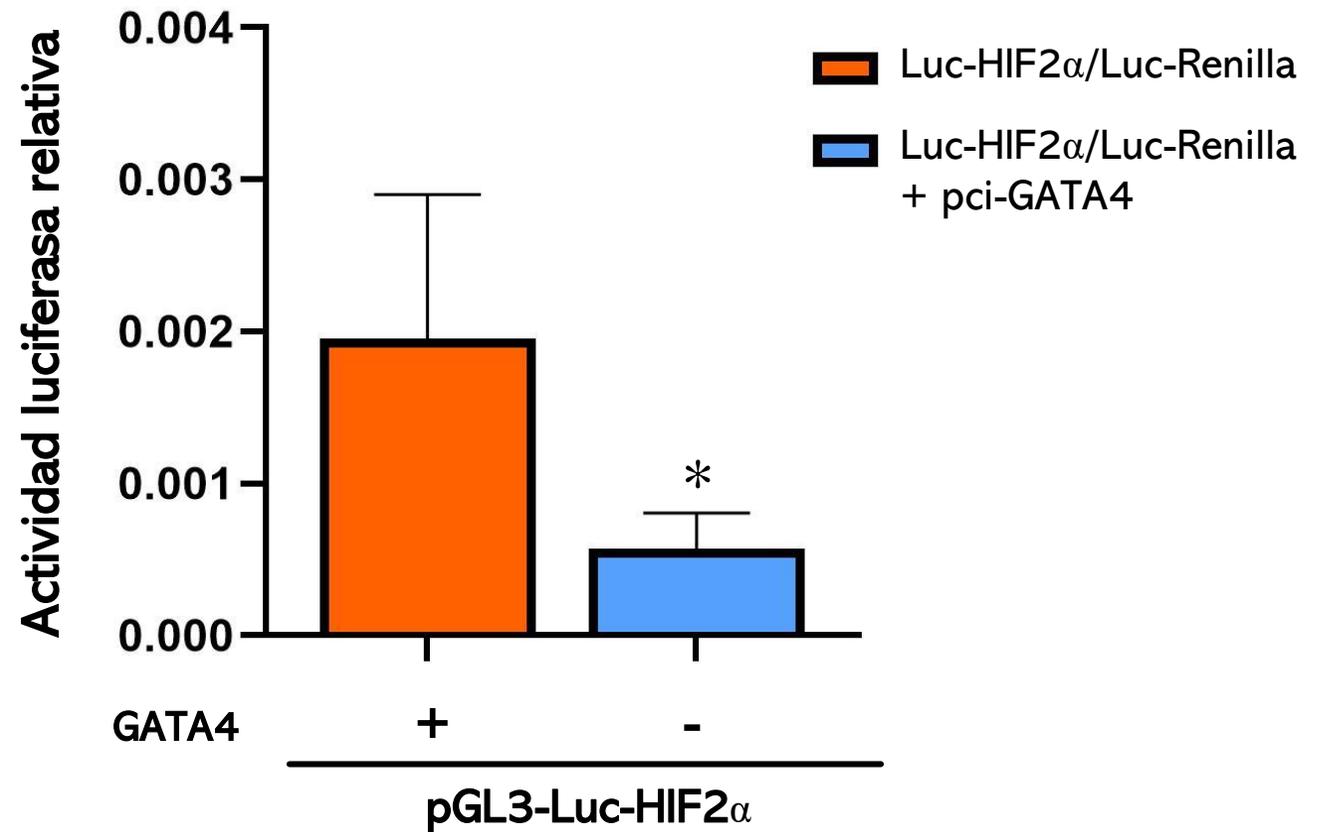
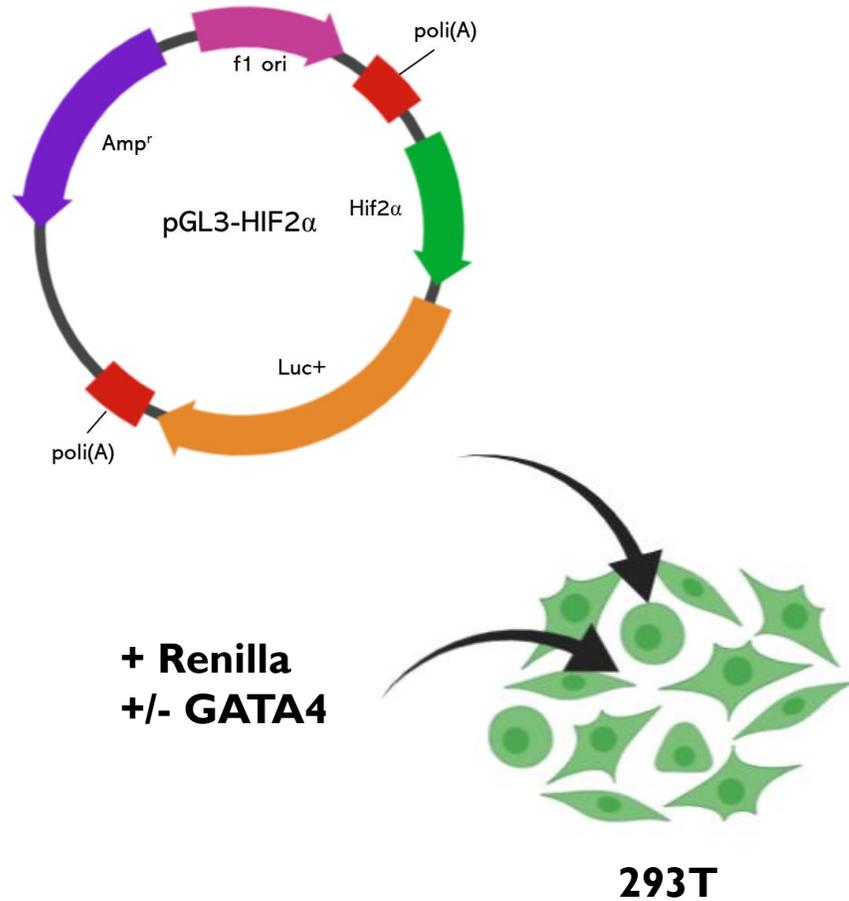


CCL4 1 mes

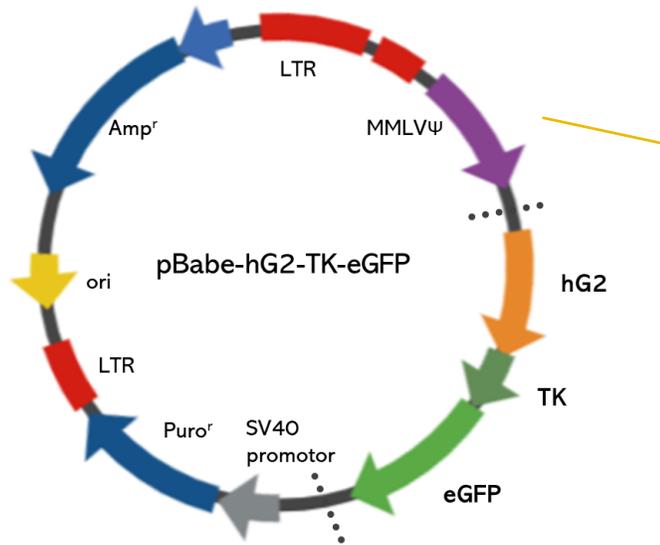


¹ Pendiente evaluación nuevas muestras

4. OBJETIVO 2 - GATA4 EN LA REGULACIÓN DE EPASI



5. OBJETIVO 3 – DESARROLLO DE UNA LÍNEA CELULAR PARA EL SCREENING DE FÁRMACOS

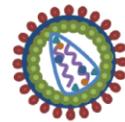
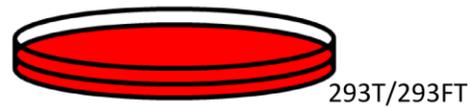
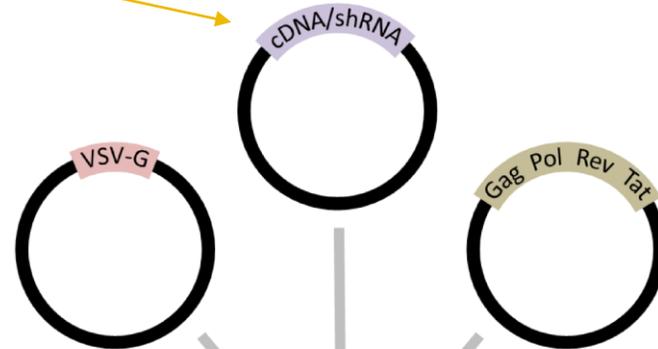


1) Transfect packaging cells

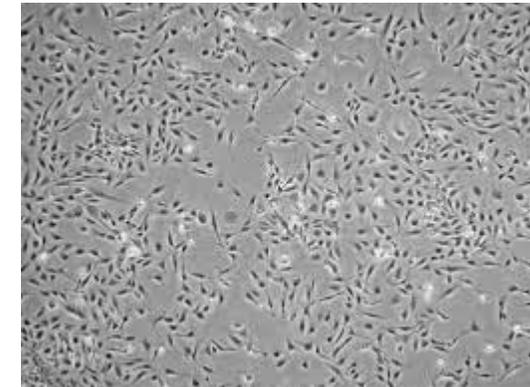
2) Collect virus particles

3) Transduce target cells

Lentivirus



LX2 humanas



Fármaco



5. CONCLUSIONES

- La expresión de GATA4 se reactiva en las HSCs con la regresión de la fibrosis
- GATA4 reprime transcripcionalmente la expresión de HIF2 α
- Inducir la expresión de GATA4 en las HSCs podría ser una estrategia efectiva para reducir la fibrosis hepática
- La línea celular LX2 con el transgén hG2-TK-eGFP podría agilizar la búsqueda de fármacos para revertir la fibrosis hepática



MUCHAS GRACIAS

BASES MOLECULARES DE LA FIBROSIS HEPÁTICA
Jornadas de Biotecnología 2020

Pilar Rodríguez Martín

Centro Andaluz de Biología Molecular & Medicina Regenerativa (CABIMER)



UNIVERSIDAD
**PABLO^D
OLAVIDE**
S E V I L L A

cabimer 
CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA MOLECULAR
& MEDICINA REGENERATIVA

BASES MOLECULARES DE LA FIBROSIS HEPÁTICA

PILAR RODRÍGUEZ MARTÍN

GUIÓN PRESENTACIÓN ORAL - JORNADAS DE BIOTECNOLOGÍA 2020

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA SANITARIA

Diapositiva 1 – Presentación

El presente Trabajo de Fin de Máster se está realizando en el grupo de la Dra. Anabel Rojas, de *Organogénesis y enfermedades del páncreas y del hígado*, dentro del Centro Andaluz de Biología Molecular & Regenerativa (CABIMER). En este grupo estudiamos los mecanismos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario del hígado y el páncreas, así como los procesos de regeneración que ocurren en estos tejidos en adultos. Con esta perspectiva, podemos entender mejor cómo afectan las enfermedades a estos órganos y hallar nuevas estrategias terapéuticas.

Diapositiva 2 – Introducción

La fibrosis hepática es un estado patológico en el que se produce una respuesta exacerbada de cicatrización ante un daño hepático crónico (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Este daño puede ser de diversa naturaleza, incluyendo infecciones víricas, el consumo abusivo de alcohol, enfermedades como la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o el hígado graso no alcohólico (NAFL), enfermedades autoinmunes o trastornos crónicos colestáticos (Bataller and Brenner, 2005). Si la fibrosis no es tratada y el daño crónico no remite, puede producirse cirrosis, llegando a degenerar en hepatocarcinoma, fallo hepático y, en ocasiones, la muerte (Aydin and Akcali, 2018). Dado que actualmente se estima que la fibrosis avanzada de hígado afecta a entre un 0.9 y un 2% de la población general (Harris *et al.*, 2017), existe un gran interés en encontrar estrategias para tratar e, idealmente, revertir la fibrosis.

Diapositiva 3 – Antecedentes. El papel de GATA4 en las HSCs

En este contexto son clave las células hepáticas estrelladas (HSCs, por sus siglas en inglés). Estas células, que se encuentran en los espacios perisinusoidales de los lobulillos hepáticos, se mantienen quiescentes en condiciones normales. Sin embargo, ante un estímulo provocado por un daño hepático cambian a un fenotipo miofibroblástico, convirtiéndose en una importante fuente de componentes de la matriz extracelular (ECM) (Higashi, Friedman and Hoshida, 2017). En estudios previos, nuestro grupo ha demostrado que la expresión del factor de transcripción GATA4 en las HSCs es crucial para el mantenimiento de la quiescencia y, por tanto, para la prevención de la fibrosis (Delgado *et al.*, 2014). Por ello, desvelar la ruta molecular por la que GATA4 efectúa su función puede ser de gran utilidad para comprender mejor la fibrosis y encontrar estrategias para revertirla.

Diapositiva 4 – Antecedentes. La función de HIF2 α en la fibrosis

Un punto clave de esta ruta molecular podría ser el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF2 α , codificado por el gen *EPAS1* en humanos. Previamente, nuestro grupo identificó mediante tecnología *microarray* y qPCR que la sobreexpresión de GATA4 en la línea celular hepática LX2 resulta en unos niveles de expresión menores de HIF2 α (datos

no publicados). Esta relación también se estudió *in vivo* mediante un modelo de ratón, con lo que se confirmó que HIF2 α es un activador de las HSCs y favorece la fibrosis. El factor de transcripción GATA4 recibe este nombre porque contiene una región dedo de zinc que reconoce la secuencia consenso (A/T)GATA(A/G) en el promotor o región reguladora de aquellos genes que regula. Mediante análisis bioinformático se han podido identificar sitios GATA conservados entre distintas especies, lo que sugiere que GATA4 podría reprimir transcripcionalmente la expresión de HIF2 α a través de estos sitios.

Diapositiva 5 – Hipótesis y objetivos

Con estos antecedentes, se estableció la siguiente hipótesis:

“GATA4 participa en la reversión de la fibrosis hepática induciendo un estado quiescente en las HSCs, para lo que reprime transcripcionalmente HIF2 α .”

Partiendo de dicha hipótesis, se fijaron los siguientes objetivos:

1. Estudiar cuál es la función de GATA4 durante la reversión de la fibrosis tras un daño hepático controlado *in vivo*.
2. Estudiar la posible regulación de EPAS1 como mecanismo de inactivación de las HSCs por parte de GATA4.
3. Obtener una línea celular hepática con utilidad para el cribado de fármacos con actividad inductora en la expresión de GATA4 en las HSCs.

Diapositiva 6 – Objetivo 1. GATA4 en la reversión de la fibrosis hepática *in vivo*

Para poder evaluar la función de GATA4 durante la reversión de la fibrosis se realizó un ensayo de trazado de linaje. Se utilizó para ello un modelo de ratón G2Cre;yfp/yfp en el que las HSCs están marcadas con GFP. Los ratones recibieron durante un mes 8 inyecciones intraperitoneales con tetracloruro de carbono (CCL4), una molécula inductora de fibrosis hepática. Después se extrajeron los hígados de los animales en tres tiempos: antes del tratamiento, 1 día tras la última inyección y 1 mes tras la última inyección. Los resultados obtenidos confirmaron nuestra hipótesis de partida (Figura 1). Antes de recibir el tratamiento se observa que la mayor parte de las HSCs, que están marcadas con GFP, coexpresan GATA4, lo que indica un estado normal del hígado. Como cabía esperar, un día después del tratamiento la expresión de GATA4 disminuye drásticamente, y la mayor parte de las HSCs quedan marcadas únicamente con GFP. En cambio, tras un mes desde el fin del tratamiento, cuando la fibrosis se ha revertido mayoritariamente, observamos la recuperación de la expresión de GATA4, alcanzándose unos niveles similares a los observables a tiempo 0. En todas las muestras se mantiene un porcentaje reducido de HSCs (~9%) con expresión de GATA4, pero no de GFP, probablemente debidas a que la eficiencia del marcaje con el sistema Cre-LoxP no es total. Sin embargo, hay que destacar que los datos de ratones sacrificados 1 día después de la última inyección muestran una barra de error demasiado elevada, probablemente debida a errores experimentales durante el ensayo de inmunofluorescencia en una de las muestras. Actualmente, se están evaluando nuevos cortes histológicos para obtener resultados más robustos.

Diapositiva 7 – Objetivo 2. GATA4 en la regulación de EPAS1

Con el objetivo de analizar la regulación de EPAS1 por parte de GATA4 se clonó un fragmento *enhancer* de EPAS1 en el que se encontraron sitios GATA putativos en el vector comercial pGL3-basic (Promega). Este plásmido es un *reporter* de luciferasa, de tal modo

que la expresión de HIF2 α es acompañada de la expresión de luciferasa de luciérnaga, una enzima que produce luminescencia en presencia de su sustrato. Se cotransfectaron células de la línea 293T con: el plásmido pGL3-HIF2 α ; con un plásmido con luciferasa de *Renilla* como control de la transcripción; y con, bien un plásmido de sobreexpresión de GATA4, o el mismo plásmido vacío. Después, se utilizó el kit comercial Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) para medir los niveles de luciferasa. Con este ensayo observamos que en presencia del plásmido con GATA4, los niveles de luciferasa de luciérnaga, indicativos de la expresión de HIF2 α , se reducían significativamente (Figura 2). Esto parece indicar que GATA4 reprime la expresión de HIF2 α a través de su unión a sitios GATA.

Diapositiva 8 – Desarrollo de una línea celular para el cribado de fármacos

Actualmente estamos trabajando también en el desarrollo de una línea celular humana transgénica que nos permita realizar cribados de fármacos inductores de la expresión de GATA4 en las HSCs. Para ello, se ha seleccionado la región *enhancer* G2 de GATA4, previamente identificada como responsable de la expresión de GATA4 en las HSCs (Rojas *et al.*, 2005; Cañete *et al.*, 2017) y se está clonando en el vector viral pBabe-puro (Addgene) junto con el promotor mínimo TK y la secuencia eGFP. Este vector, utilizado en conjunto con otros vectores comerciales para el empaquetamiento de lentivirus, se transfectará en una línea celular de empaquetamiento adecuada, como las células 293T para obtener partículas víricas con el fragmento de interés hG2-TK-eGFP. Más adelante, estos virus se usarán para introducir el transgén en la línea celular hepática LX2, logrando una expresión estable a largo plazo. El objetivo final es que incorporando fármacos candidatos que puedan inducir la expresión de GATA4 a través del *enhancer* G2, las células emitirán fluorescencia, con lo que se podrían hacer cribados masivos de fármacos.

Diapositiva 9 – Conclusiones

Mediante el ensayo de trazado de linaje, hemos comprobado que la expresión de GATA4 se reactiva en las HSCs una vez que se produce la regresión de la fibrosis. Esto parece indicar que GATA4 no solo participa en el mantenimiento de la quiescencia en estas células, sino que juega un papel relevante en las rutas moleculares implicadas en la regeneración una vez que desaparece la fuente de daño hepático. Además, nuestros resultados apuntan a que esta acción se debe, al menos en parte, a que GATA4 actúa sobre los sitios GATA de HIF2 α y lo reprime transcripcionalmente. En la actualidad, este ensayo se ha llevado a cabo en la línea celular 293T, aunque se está poniendo a punto un protocolo para realizar el ensayo en la línea LX2, específica de hígado.

Nuestros datos apoyan la idea de que inducir la expresión de GATA4 en las HSCs podría ser una estrategia efectiva para reducir la fibrosis hepática. Por este motivo, la obtención de la línea transgénica de células LX2 en la que estamos trabajando sería un logro muy prometedor, ya que permitiría agilizar enormemente el cribado de fármacos que activen el *enhancer* G2, responsable de la expresión de GATA4 en las HSCs. Con esto se lograría una aproximación traslacional, en la que se podrían aprovechar los conocimientos generados en este proyecto para una aplicación clínica, acercándonos un paso más al objetivo final, revertir la fibrosis hepática en pacientes enfermos.

Bibliografía

Aydin, M. M. and Akcali, K. C. (2018) 'Liver fibrosis', *Turkish Journal of Gastroenterology*. AVES, pp. 14–21. doi: 10.5152/tjg.2018.17330.

Bataller, R. and Brenner, D. A. (2005) 'Liver fibrosis', *The Journal of Clinical Investigation*, 115. doi: 10.1172/JCI200524282.

Cañete, A. *et al.* (2017) 'A population of hematopoietic stem cells derives from GATA4-expressing progenitors located in the placenta and lateral mesoderm of mice.', *Haematologica*. Italy, 102(4), pp. 647–655. doi: 10.3324/haematol.2016.155812.

Delgado, I. *et al.* (2014) 'GATA4 loss in the septum transversum mesenchyme promotes liver fibrosis in mice.', *Hepatology (Baltimore, Md.)*. United States, 59(6), pp. 2358–70. doi: 10.1002/hep.27005.

Harris, R. *et al.* (2017) 'Prevalence of clinically significant liver disease within the general population, as defined by non-invasive markers of liver fibrosis: a systematic review', *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. Elsevier Ltd, pp. 288–297. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30205-9.

Hernandez-Gea, V. and Friedman, S. L. (2011) 'Pathogenesis of Liver Fibrosis', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Annual Reviews, 6(1), pp. 425–456. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130246.

Higashi, T., Friedman, S. L. and Hoshida, Y. (2017) 'Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., pp. 27–42. doi: 10.1016/j.addr.2017.05.007.

Rojas, A. *et al.* (2005) 'Gata4 expression in lateral mesoderm is downstream of BMP4 and is activated directly by Forkhead and GATA transcription factors through a distal enhancer element', *Development*. Development, 132(15), pp. 3405–3417. doi: 10.1242/dev.01913.

National Library of Medicine (US). Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD): The Library; 2020 March 3. EPAS1 gene; [reviewed 2012 Aug; cited 2020 March 16]; [about 6 screens]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/EPAS1#resources>