



# **EFFECTO DE IMT504 EN LA REPARACIÓN HEPÁTICA Y EL PAPEL DE LOS PROGENITORES ESTROMALES GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> DE LA MÉDULA ÓSEA**

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Biomédicas  
por la Universidad Austral

**Lic. Franco Maximiliano Borda Acevedo.**

**Director: Dr. Jorge Benjamín Aquino.**

**Codirector: Dr. Esteban Juan Fiore.**

**Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT)**

**CONICET - Universidad Austral**

**Pilar, Buenos Aires, Argentina**

**Año 2024**

## AGRADECIMIENTOS

Al doctor Jorge Aquino por haber confiado en mí para realizar el doctorado con él y así también para abrir nuevas líneas de investigación en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Medicina Regenerativa, por haber sido un gran mentor, guía y tratarme como un par en el día a día. También le agradezco eternamente por su paciencia y buen consejo en momentos cruciales de los experimentos realizados.

Al doctor Esteban Fiore, porque su codirección me llevo a realizar estos experimentos con gran criterio salvándome infinitas veces de la desesperación y ante todo porque su parsimonia me demostró que se puede aprender de todo. Te voy a estar agradecido siempre porque junto con Jorge me demostraron que la vocación científica está en enriquecernos colectivamente.

A mis compañeros becarios, sin ustedes no habría tenido la perseverancia necesaria para llegar hasta aquí. Cada uno de ustedes fue fundamental para 'salvarme' durante el doctorado. En especial, quiero destacar a Majo, gran compañera y amiga, porque gracias a ella, hoy estoy logrando terminarlo. A Barbi, Marie, Mai que más allá de ayudarme a planear experimentos y de estar ahí cuando necesito en lo laboral, me han ayudado a crecer como persona, este doctorado fue mucho más manejable con ustedes a mi lado. A Tobi y Benja, mis Bros, para descontracturar en momentos de tensión. A Sofi, Coni y Miru, sus palabras en momentos claves del doctorado me hicieron confiar en mí no cuando yo lo hacía, gracias. Y a cada uno de los becarios y ex becarios del instituto les estoy agradecido, aprendí infinitamente con ustedes y mi formación fue mucho más enriquecedora a la comunidad que forman y formaron. El becaterio siempre en mi corazón.

A Pau, Tobi, los técnicos del laboratorio que más allá del día a día han sido grandes compañeros apoyando mi trabajo, han sido grandes personas que me guiaron incondicionalmente.

Al personal del bioterio por brindarme una gran ayuda en el mantenimiento de las líneas transgénicas, pero también por su buena predisposición, apoyo y palabras

de aliento. Más allá de ser buenos compañeros son buenas personas, gracias Anabel, Guille, Franco, Santi, Lucía y Ariel.

A cada uno de los pasantes y tesinistas que he tenido como compañeros en el laboratorio, su ayuda fue incondicional. Pero lo que quiero rescatar más que nada es que gracias a cada uno de ustedes descubrí que investigar es mucho más lindo y enriquecedor compartiendo lo que sabemos, me llevo este gran aprendizaje: la enseñanza solo se logra si lo hacemos de manera humilde y escuchándonos lo que cada uno tiene para aportar. Gracias Gian, Mati, Lucía, Lucila, Agus, Fran, Cami, Euge, Mateo, Fede, Joaco, Mechi, Luz, Pedro, Claire y Aldana, no quería dejar de nombrarlos.

Al resto del personal del instituto que de manera directa o indirecta aportaron a mis experimentos. Quiero destacar las charlas enriquecedoras que me brindó Juan Bayo: aportaste un montón a los experimentos que realizamos y no quería dejar de resaltarlo.

A la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral, por su valioso aporte a mi formación académica al proporcionar espacios, recursos y el entorno de excelencia científica que la distingue. Quiero rescatar que el espacio que me brindó la Universidad como docente me ayudó a enriquecer mi formación de maneras inimaginables. Puntualmente a la Dra. Ángela Suburo, jefa de cátedra y gran mentora en la docencia.

A mis padres y mis hermanos que me apoyaron desde el primer momento en que decidí hacer un doctorado lejos geográficamente, pero que siempre estuvieron cerca: aunque sea con una palabra o enseñanza para lidiar cada momento difícil. Son las personas más importantes de mi vida, hicieron que pueda vivir de lo que me gusta.

A mi compañera de vida Aldi, gracias por tu amor infinito y la paciencia eterna. Me mostraste que la humildad, que la constancia y la calidad humana son clave para lograr todo. Voy a estar siempre agradecido a la vida por ponerte en mi camino, gracias por ser amiga, familia, refugio, compañera de cocina, de viajes, pero más que nada por ponerme los pies en la tierra cuando colapsaba. Hiciste que sea mejor persona en estos casi 3 tres años de compañía. Tu amor me salvó. Te amo tanto que no sé.

Y finalmente a CONICET y a mi querida Universidad Nacional de Misiones, que hicieron que hoy un pibe del interior del país pueda tener la profesión que siempre quiso.

# **Efecto de IMT504 en la reparación hepática y el papel de los progenitores estromales GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> de la médula ósea**

## **RESUMEN**

El hígado tiene una notable capacidad de regeneración. Sin embargo, esta puede ser insuficiente en casos de enfermedades crónicas como la cirrosis o la hepatitis, donde el tejido hepático sufre daño severo, o ante resecciones o lesiones que exceden su límite regenerativo.

Esta tesis aporta evidencias sobre el potencial terapéutico del oligodesoxirribonucleótido (ODN) inmunomodulador IMT504 en la reparación hepática, tanto en fibrosis hepática como tras una PHx.

Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que IMT504 inhibe la fibrogénesis hepática en dos modelos distintos, uno hepatotóxico y el otro de colestasis. Y acelera la regresión de una fibrosis ya establecida. Estos efectos se asocian con la modulación del microambiente inflamatorio, induciendo un cambio hacia un perfil tolerogénico y prorregenerativo en los macrófagos fibróticos. Además, IMT504 reduce la activación de las células estrelladas hepáticas (HeSCs), y estimula la proliferación y mejora la funcionalidad de los hepatocitos. Su efecto antifibrótico se intensifica con dosis repetidas, destacando su potencial para mitigar la fibrosis hepática y favorecer la recuperación del hígado.

En este trabajo se utilizaron ratones doble-transgénicos que permiten identificar, mediante la expresión del gen reportero Tomato (Tom), células originadas en progenitores estromales de la médula ósea que expresan el transportador de glutamato y aspartato (GLAST) y Wnt1, un ligando de la vía canónica Wnt, los que son denominados GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs. Utilizando esos ratones, demostramos que IMT504 induce la expansión y movilización de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs *in vitro*. Además, durante la fibrogénesis hepática, la administración *in vivo* de IMT504 restauró la proporción relativa de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en la médula ósea y su capacidad proliferativa, lo cual se asoció con un aumento en la proporción relativa de células tipo endoteliales (ELCs) Tom<sup>+</sup>, progenitores de hepatocitos Tom<sup>+</sup> y células tipo hepatocitos (HLCs) Tom<sup>+</sup>. Nuestra evidencia también sugiere que

IMT504 estimula la proliferación de progenitores hepáticos, ELCs y HLCs, derivados de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs.

IMT504 indujo además un cambio en el perfil de expresión de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, lo que resultó en modificaciones en su secretoma. A diferencia del comportamiento de otras poblaciones de BMSPs y de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs no preincubados con IMT504, el medio condicionado de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs pretratados con el ODN alteró el perfil de expresión de varias poblaciones claves en el proceso de fibrogénesis. Sólo en esa condición se observó un cambio en el perfil proinflamatorio de los macrófagos hacia uno tolerogénico, la inactivación de miofibroblastos derivados de HeSCs, y una estimulación de la expresión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y del factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I) en los hepatocitos.

En explantos hepáticos humanos obtenidos de un paciente con cirrosis, IMT504 mostró una notable y sostenida reducción en la expresión del ARN mensajero de marcadores de fibrosis, así como del marcador proinflamatorio IL-6. Estos resultados permiten concluir que este ODN podría tener un potente efecto antifibrótico también en humanos.

En un contexto de hepatectomía parcial, IMT504 aceleró significativamente la regeneración del órgano. Se observó una recuperación más rápida de la masa hepática, alcanzando el 100% de su tamaño original en aproximadamente seis días. Este resultado se relacionó con un aumento sostenido y constante en la tasa de regeneración hepática durante todo el proceso, acompañado de una mayor proliferación de hepatocitos tanto en las fases iniciales como en las tardías del proceso regenerativo. Cabe destacar que este proceso es autorregulado, ya que el efecto regenerativo de IMT504 se detuvo una vez que el hígado alcanzó el tamaño adecuado para satisfacer las necesidades orgánicas. Además, IMT504 promovió la movilización de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs hacia el tejido hepático, facilitando su participación en la generación de hepatocitos y células endoteliales. Estos hallazgos subrayan la capacidad de IMT504 para actuar de manera eficaz en los procesos de regeneración hepática.

Los resultados de esta tesis sugieren que el efecto antifibrótico de IMT504 depende de mecanismos pleiotrópicos que, a pesar de la complejidad de los mecanismos

involucrados en la fibrogénesis y la regeneración hepática tras una hepatectomía, se traducen de manera consistente en mejoras significativas en todos los casos analizados. La combinación de efectos antifibróticos, antiinflamatorios y prorregenerativos posiciona a IMT504 como un candidato prometedor para el tratamiento de patologías hepáticas complejas altamente prevalentes, cuya incidencia está aumentando a nivel global y que, en muchos casos, presentan opciones de tratamiento limitadas. Además, podría ser aplicable en la preparación de fragmentos de hígado pequeños para trasplantes o en la decisión de tratar a pacientes con cáncer hepático que afecte una gran parte del órgano.

# **Effect of IMT504 on Liver Repair and the Role of GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> Bone Marrow Stromal Progenitors**

## **ABSTRACT**

The liver has a remarkable regenerative capacity. However, this can be insufficient in cases of chronic diseases such as cirrhosis or hepatitis, where liver tissue suffers severe damage, or in resections or injuries that exceed its regenerative limit.

This thesis provides evidence of the therapeutic potential of the immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide (ODN) IMT504 in liver repair, both in liver fibrosis and after partial hepatectomy.

Our results demonstrate, for the first time, that IMT504 inhibits hepatic fibrogenesis in two distinct models, one hepatotoxic and the other cholestatic, and accelerates the regression of established fibrosis. These effects are associated with the modulation of the inflammatory microenvironment, inducing a shift toward a tolerogenic and pro-regenerative profile in fibrotic macrophages. Additionally, IMT504 reduces the activation of hepatic stellate cells and stimulates the proliferation and improves the functionality of hepatocytes. Its antifibrotic effect intensifies with repeated doses, highlighting its potential to mitigate hepatic fibrosis and promote liver recovery.

In this study, double-transgenic mice were used, which allow the identification of cells originating from bone marrow stromal progenitors that express the glutamate and aspartate transporter (GLAST) and Wnt1, a ligand of the canonical Wnt pathway, known as GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, through the expression of the Tomato (Tom) reporter gene. Using these mice, we demonstrated that IMT504 induces the expansion and mobilization of GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs *in vitro*. Furthermore, during hepatic fibrogenesis, *in vivo* administration of IMT504 restored the relative proportion of GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs in the bone marrow and their proliferative capacity, which was associated with an increase in the relative proportion of endothelial-like cells (ELCs) Tom<sup>+</sup>, hepatocyte progenitors Tom<sup>+</sup>, and hepatocyte-like cells (HLCs) Tom<sup>+</sup>. Our evidence also suggests that IMT504 stimulates the proliferation of hepatic progenitors, ELCs, and HLCs derived from GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs.

IMT504 also induced a shift in the expression profile of GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, resulting in changes to their secretome. Unlike the behavior of other BMSP populations and GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs not pre-incubated with IMT504, the conditioned medium of GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs pre-treated with the ODN altered the expression profile of several key populations involved in fibrogenesis. Only under these conditions was a change observed in the pro-inflammatory profile of macrophages toward a tolerogenic one, the inactivation of myofibroblasts derived from hepatic stellate cells, and an upregulation of hepatocyte growth factor (HGF) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) expression in hepatocytes.

In human liver explants obtained from a cirrhotic patient, IMT504 showed a remarkable and sustained reduction in the messenger RNA expression of fibrosis markers, as well as the pro-inflammatory marker IL-6. These results suggest that this ODN could have a potent antifibrotic effect in humans as well.

In the context of partial hepatectomy, IMT504 significantly accelerated liver regeneration. Faster recovery of liver mass was observed, reaching 100% of its original size in approximately six days. This result was associated with a sustained and steady increase in the liver regeneration rate throughout the process, accompanied by greater hepatocyte proliferation in both the early and late stages of the regenerative process. It is important to note that this process is self-regulated, as the regenerative effect of IMT504 stopped once the liver reached the appropriate size to meet the organ's needs. Additionally, IMT504 promoted the mobilization of GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs to the liver tissue, facilitating their involvement in hepatocyte and endothelial cell generation. These findings highlight the ability of IMT504 to act effectively in liver regeneration processes.

The results of this thesis suggest that the antifibrotic effect of IMT504 depends on pleiotropic mechanisms that, despite the complexity of the mechanisms involved in fibrogenesis and liver regeneration after hepatectomy, consistently translate into significant improvements in all cases analyzed. The combination of antifibrotic, anti-inflammatory, and pro-regenerative effects positions IMT504 as a promising candidate for the treatment of complex liver diseases that are highly prevalent, with increasing incidence worldwide, and for which treatment options are often limited. Furthermore, it could be applicable in the preparation of small liver fragments for

transplants or in the decision to treat patients with liver cancer affecting a large part of the organ.

## PUBLICACIONES

Durante el desarrollo de esta tesis se lograron las siguientes publicaciones:

- Sierra, R., Gomez Bustillo, S., Kameneva, P., Fiore, E.J., Mazzone G.L., Borda, M., Blanco, M.V., Usuardi, C., Furlan, A., Ernfors, P., Alaniz, L., Montaner, A.D., Adameyko, I. & Aquino, J. B. (2020). Contribution of neural crest and GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> bone marrow pericytes with liver fibrogenesis and/or regeneration. *Liver International*, 40(4), 977-987. doi: 10.1111/liv.14401. No incluido como contenido de esta Tesis.
- Borda Acevedo, F. M., Aquino, J. B., & Mazzone, G. L. (2023). Cell-based experimental strategies for myelin repair in multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 101(1):86-111. doi: 10.1002/jnr.25129. No incluido como contenido de esta Tesis.
- Borda, M., Sierra, R., Cantero, M. J., Gómez Bustillo, S., Fiore, E. J., Giardelli, G., Martino Garcet, M., Rebottaro, M.L., Bayo Fina, J.M., Schiavone, M., Rubione, J., García, M.G., Montaner, A., Mazzolini, G.D. & Aquino, J. B. (2024). The antifibrotic potential of IMT504: modulation of GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> bone marrow stromal progenitors and hepatic microenvironment. *Stem Cell Research & Therapy*, 15(1), 278. doi: 10.1186/s13287-024-03896-w.

A su vez durante el desarrollo de esta tesis se participó con los siguientes trabajos en congresos:

- IMT504 ENHANCES THE CONTRIBUTION OF GLAST<sup>+</sup> WNT1<sup>+</sup> BONE MARROW STROMAL PROGENITORS WITH HEPATOCYTE- AND ENDOTHELIAL-LIKE CELLS IN THE FIBROTIC LIVER. Presentación de póster. Maximiliano Borda, María José Cantero, Esteban J. Fiore, Juan Bayo, Romina Sierra, Sofía Gómez-Bustillo, Agustina Abalo, Gianlucca Giardelli, Alejandro Montaner, Jorge B. Aquino. (2022) Reunión Anual de Sociedades de Biociencias. **Este trabajo fue destacado por una mención especial debido a su presentación.**

- IMT504 ENHANCES WNT SIGNALING PATHWAY IN GLAST+ WNT1+ BONE MARROW STROMAL PROGENITORS. Presentación de póster. Maximiliano Borda, María J. Cantero, Esteban J. Fiore, Gianlucca Giardelli, Francisco Alvarado, Abalo Agustina, Camila Becerra, Alejandro Montaner, Guillermo D. Mazzolini & Jorge B. Aquino. (2023). Reunión Anual de Sociedades de Biociencias.
- CONTRIBUTION OF GLAST+ WNT1+ BONE MARROW STROMAL PROGENITORS TO THE INFARCTED HEART. Presentación de póster. Maximiliano Borda, Gisela Romina Bustos, Francisco Alvarado, Matías Martino-Garcet, Gianlucca Giardelli, Alejandro Montaner, Germán González, Jorge B. Aquino. (2023). Reunión Anual de Sociedades de Biociencias.
- IMT504 AMELIORATES LIVER FIBROSIS IN MICE. Presentación oral. Maximiliano Borda, María J. Cantero, Esteban J. Fiore, Gianlucca Giardelli, Francisco Alvarado, Mercedes Díaz Pedraza, Alejandro Montaner, Guillermo D. Mazzolini & Jorge B. Aquino. (2023). Reunión Anual de Sociedades de Biociencias.
- IMT504 ENHANCES LIVER REGENERATION AFTER PARTIAL HEPATECTOMY IN MICE. Presentación de póster. Borda Maximiliano, Lucia Cafaro, Lucila Valentina Casella, María José Cantero, Mercedes Díaz Pedraza, Camila Becerra, Agustina Ábalo, Montaner Alejandro, Fiore Esteban Juan, Aquino Jorge Benjamín. (2024). Reunión Anual de Sociedades de Biociencias.
- THE ANTIFIBROTIC POTENTIAL OF IMT504: MODULATION OF GLAST+ WNT1+ BONE MARROW STROMAL PROGENITORS AND HEPATIC MICROENVIRONMENT. Presentación oral. Borda Maximiliano, Cantero Maria Jose, Fiore Esteban Juan, Giardelli Gianlucca, Lucia Cafaro, Lucila Valentina Casella, Mercedes Díaz Pedraza, Camila Becerra, Bayo-Fina Juan Miguel, Schiavone, Máximo, Montaner Alejandro, Mazzolini Guillermo Daniel, Aquino Jorge Benjamín. (2024). Reunión Anual de Sociedades de Biociencias. **Este trabajo fue destacado por una mención especial debido a su presentación.**

## Abreviaturas:

- Abl1:** Homólogo 1 del oncogén viral de leucemia murina de Abelson.
- Acta2:** alfa actina de músculo liso.
- ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.
- aHeSCs:** Células estrelladas hepáticas activadas.
- Alb:** Albúmina.
- ANOVA:** Análisis de Varianza.
- Arg1:** Arginasa 1.
- ARN:** Ácido Ribonucleico.
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.
- ASMA:** Actina de músculo liso alfa.
- Bcra2:** Cáncer de mama 2.
- BDL:** Ligadura del conducto colédoco.
- BM-MNCs:** Células mononucleares de la médula ósea.
- BMSP:** Progenitores estromales de médula ósea.
- Ccna1:** Ciclina A1.
- CFU-Fs:** Unidades formadoras de colonias de fibroblastos.
- Col1a1:** Cadena alfa 1 del colágeno tipo I.
- Cre:** Recombinasa Cre.
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol.
- Dkk1:** Dickkopf-1.
- DMEM:** Medio Eagle modificado de Dulbecco.
- ELCs:** Células tipo-endoteliales.
- Ep-CAM:** Molécula de adhesión celular epitelial.
- ERT2:** receptor de estrógeno modificado 2.
- F12:** Mezcla de nutrientes F-12 de Ham.
- Gadd45α:** Gen inducible por daño en el ADN y detención del crecimiento 45α.
- Gapdh:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
- GLAST:** Transportador de glutamato-aspartato.
- H&E:** Hematoxilina y eosina.
- HeSCs:** Células estrelladas hepáticas.
- Hgf:** Factor de crecimiento de hepatocitos.

**HLCs:** Células tipo-hepatocitos.

**Hnf4:** Factor nuclear hepático 4.

**Igf1:** Factor de crecimiento similar a la insulina 1.

**IL-10:** Interleucina 10.

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta.

**IL-6:** Interleucina 6.

**Lef1:** Factor potenciador linfoide 1.

**LRR:** Tasa de regeneración hepática.

**MC:** Medio condicionado.

**MSC:** Células madre mesenquimales o células estromales mesenquimales.

**Myb:** Myeloblastosis.

**Nos2 o iNOS:** Sintasa de óxido nítrico inducible.

**OCT:** Compuesto de temperatura óptima de corte.

**ODN:** Oligodesoxinucleótido.

**P2:** Día postnatal 2.

**P60:** Día posnatal 60.

**P8:** Pasaje 8.

**PCNA:** Antígeno Nuclear de Células en Proliferación.

**Prom1:** Prominina 1.

**qHeSCs:** Células estrelladas hepáticas quiescentes.

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RPMI:** Medio Roswell Park Memorial Institute.

**SFB:** Suero fetal bovino.

**Sp5:** Proteína de especificidad 5.

**TAA:** Tioacetamida.

**TGF- $\beta$ 1:** Factor de crecimiento transformante beta 1.

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa.

**Tnfsf12:** Ligando inducible por TNF relacionado con la apoptosis.

**Tom:** Proteína fluorescente TdTomato.

**TWEAK:** Inductor débil de apoptosis similar al TNF.

**Tx:** Tamoxifeno.

**Vwf:** Factor de von Willebrand.

**Wnt1:** Miembro de la familia Wnt 1.

**Wnt3a:** Miembro de la familia Wnt 3a.

**Wnt5a:** Miembro de la familia Wnt 5a.

**α-SMA:** actina de músculo liso alfa.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	19
1.1.    El hígado.....	20
1.1.2.    Histología hepática .....	21
1.1.3.    Fisiología hepática .....	24
1.2.    Fibrosis y cirrosis hepática .....	25
1.2.1.    Fibrosis .....	25
1.2.2.    Cirrosis hepática .....	27
1.2.3.    Modelado <i>in vivo</i> de fibrosis hepática.....	29
1.2.4.    Tratamiento de la fibrosis hepática .....	31
1.3.    Regeneración hepática .....	32
1.3.1.    Hepatectomía parcial.....	34
1.3.2.    Síndrome pequeño para su tamaño (small-for-size).....	36
1.4.    Las células progenitoras estromales de la médula ósea .....	37
1.5.    La vía de señalización de Wnt .....	39
Vía de señalización de Wnt en las MSCs humanas.....	42
1.6.    Trazado de linaje celular .....	42
1.7.    Oligonucleótido IMT504.....	45
<b>HIPOTESIS</b> .....	49
<b>OBJETIVOS</b> .....	51
3.1.    Objetivo general.....	52
3.2.    Objetivos específicos.....	52
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	54
4.1.    Cepas de ratones utilizadas .....	55
4.2.    Cruzamientos y uso de tamoxifeno.....	55
4.3.    Genotipificación.....	57
4.4.    Producción, conservación y aplicación del IMT504 .....	58
4.5.    Experimentos <i>in vivo</i> .....	58
Modelos de fibrosis: .....	58
Modelo de hepatectomía parcial .....	60
4.6.    Experimentos <i>in vitro</i> .....	62
Cultivos de células progenitoras estromales de médula ósea (BMSPs): .....	62
Preparación de medio condicionado (MC) de los cultivos de BMSPs.....	62
Macrófagos fibróticos .....	63

<b>Hepatocitos .....</b>	63
Células de Ito .....	63
4.7. <b>Ensayos de proliferación y citometría de flujo.....</b>	64
4.8. <b>Ensayo de motilidad celular en cámara de Boyden.....</b>	65
4.9. <b>Incubación de BMSPs GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> con MC de hígado hepatectomizado.....</b>	66
4.10. <b>Estudios <i>ex vivo</i> de muestras de hígado humanas .....</b>	66
4.11. <b>Histología y análisis de la fibrosis hepática .....</b>	67
4.12. <b>Perfusión de animales y preparación de muestras.....</b>	68
4.13. <b>Inmunofluorescencia.....</b>	69
4.14. <b>Extracción del ARN y análisis de expresión de genes por PCR cuantitativa.....</b>	70
4.15. <b>Análisis estadísticos .....</b>	72
<b>RESULTADOS.....</b>	74
5.1. <b>FIBROSIS HEPÁTICA .....</b>	75
5.1.1. <b>Inhibición de la progresión de la fibrogénesis en ratones mediado por IMT504. ....</b>	75
5.1.2. <b>Aceleración de la regresión en la fibrosis hepática mediado por IMT504 en el modelo murino de TAA.....</b>	81
5.1.3. <b>Aumento en la contribución de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs con células similares a endoteliales y células similares a hepatocitos durante la fibrogénesis mediado por IMT504. ....</b>	84
5.1.4. <b>Aumento en la incidencia de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en la médula ósea en el contexto de la fibrosis inducido por IMT504 .....</b>	89
5.1.5. <b>Los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, pero no los BMSPs Tom<sup>-</sup>, son estimulados a proliferar por IMT504 mediante la inducción de la vía de señalización Wnt....</b>	93
5.1.6. <b>Inducción de la movilización de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs expandidos <i>in vitro</i> mediante tratamiento con IMT504 .....</b>	97
5.1.7. <b>Efecto de IMT504 y del medio condicionado obtenido a partir de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs sobre el perfil de expresión de varios tipos celulares hepáticos .....</b>	99
5.1.8. <b>IMT504 podría modular la expresión de genes profibrogénicos y proinflamatorios en el hígado de un paciente con cirrosis .....</b>	100
5.2. <b>REGENERACIÓN HEPÁTICA.....</b>	102
5.2.1. <b>Aumento en la tasa de regeneración hepática después de una hepatectomía parcial inducido por IMT504 .....</b>	102
5.2.2. <b>Inducción de la proliferación de hepatocitos después de la hepatectomía parcial por tratamiento con IMT504 .....</b>	105
5.2.3. <b>Adquisición de marcadores de hepatocitos y células endoteliales por parte de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs <i>in vitro</i>.....</b>	109

5.2.4. Aumento en la contribución de los GLAST <sup>+</sup> Wnt1 <sup>+</sup> BMSPs con HLCs y ELCs mediado por IMT504 tras una hepatectomía parcial.....	110
<b>DISCUSIÓN</b> .....	114
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	125
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	128

# INTRODUCCIÓN

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El hígado

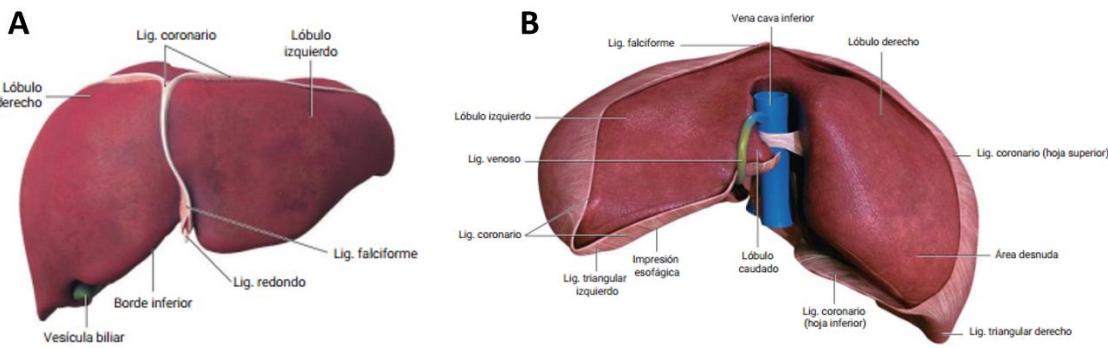
### 1.1.1. Anatomía

El hígado es el órgano más grande del abdomen. Desempeña múltiples funciones vitales, como la síntesis de proteínas plasmáticas, la producción y excreción de bilis para la digestión de grasas, el metabolismo de diversas biomoléculas, la desintoxicación de sustancias químicas, el almacenamiento de micronutrientes y la regulación de los niveles de glucosa en sangre (García-Porrero Pérez, 2020) . Su coloración pardo-rojiza es atribuida a su alta irrigación sanguínea, y su peso representa aproximadamente el 2,5% del peso corporal en adultos.

Se encuentra localizado en la región derecha del espacio supramesocólico, bajo la cúpula diafragmática y parcialmente cubierto por la caja torácica. Está mayormente situado por encima del estómago, el riñón derecho y el intestino delgado. El peritoneo, una membrana serosa que recubre la cavidad abdominal y los órganos contenidos en ella, lo rodea, salvo en las áreas de contacto directo con otros órganos.

El hígado se divide en dos lóbulos principales: el derecho, que es el más grande, y el izquierdo, más pequeño. También presenta dos lóbulos menores, el cuadrado y el caudado, ubicados en su cara inferior. En cuanto a su irrigación, recibe sangre oxigenada a través de la arteria hepática y sangre rica en nutrientes desde el tracto gastrointestinal mediante la vena porta. La sangre drena desde el hígado a través de las venas hepáticas, que la conducen a la vena cava inferior para su retorno al corazón.

Este órgano está sostenido por diversos ligamentos: el ligamento falciforme, que lo conecta con la pared anterior del abdomen y el diafragma; el ligamento redondo, remanente de la vena umbilical; el ligamento coronario, que lo une con el diafragma, y los ligamentos triangulares derecho e izquierdo, que refuerzan su fijación al diafragma (Guyton & Hall, 2019) (**Figura 1**).



**Figura 1. Vista esquemática del hígado humano. (A) Cara anterior (B) Cara posterior. Modificada de** (García-Porrero Pérez, 2020).

### 1.1.2. Histología hepática

El hígado se subdivide en lobulillos hepáticos, que son las unidades funcionales encargadas de filtrar la sangre y producir/recircular la bilis. Los hepatocitos, células especializadas presentes en estos lobulillos, secretan la bilis, que es almacenada en la vesícula biliar para su posterior liberación en el intestino delgado, donde facilita la digestión de las grasas. Los cordones de hepatocitos están rodeados por sinusoides, capilares sanguíneos que permiten el intercambio de nutrientes provenientes de la vena porta, así como de oxígeno desde la arteria hepática (García-Porrero Pérez, 2020; Guyton & Hall, 2019).

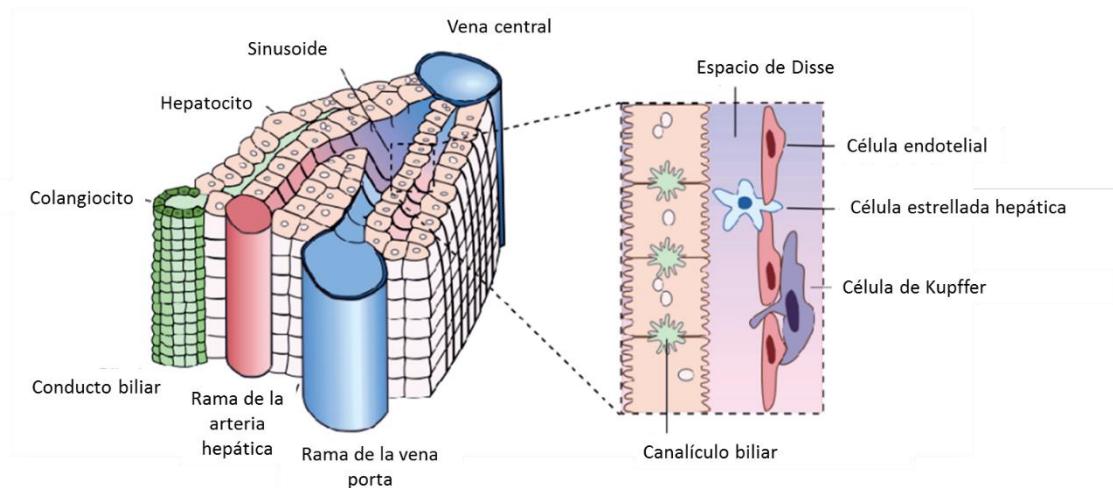
Este órgano está compuesto por parénquima y estroma. El parénquima está constituido principalmente por hepatocitos organizados en cordones anastomosados, dispuestos alrededor de los sinusoides. Los sinusoides son capilares sanguíneos que presentan un epitelio simple con fenestraciones sin diafragma y una membrana basal discontinua, lo que facilita el intercambio de sustancias entre la sangre y las células hepáticas. Los hepatocitos, las células más abundantes del hígado, desempeñan funciones críticas, como la síntesis de proteínas plasmáticas, el almacenamiento de glucógeno, y la metabolización de lípidos y carbohidratos (Ross & Pawlina, 2016).

Los espacios de Disse son estrechos espacios extracelulares localizados entre los hepatocitos y las células endoteliales de los sinusoides hepáticos. Estos espacios facilitan el intercambio de nutrientes, gases y productos metabólicos. En ellos se encuentran las HeSCs (también conocidas como células de Ito), que almacenan vitamina A en condiciones normales, pero pueden participar en la fibrosis hepática

cuando se activan en contextos patológicas. Además, los macrófagos específicos del hígado, denominados células de Kupffer, residen en los sinusoides y tienen un papel crucial en la inmunidad hepática, eliminando patógenos y partículas extrañas de la sangre (Dixon et al., 2013; Puche et al., 2013).

En cuanto a la circulación biliar, la bilis producida por los hepatocitos es liberada hacia los canalículos biliares, espacio limitado por la superficie apical de esas células. Los canalículos biliares se continúan en los conductillos biliares intralobulillares, tapizados por colangiocitos, células epiteliales, que se intercalan con hepatocitos. A estos conductos se los conoce como colangiolos o conductos de Hering, los que contendrían una población de células progenitoras hepáticas bipotentes, que originan hepatocitos o colangiocitos, conocidas también como células ovales (Fausto et al., 2006). Los colangiolos se encuentran en el espacio de Mall, en la periferia de los lobulillos hepáticos, entre los hepatocitos más externos y el tejido conjuntivo asociado a las triadas portales.

Las triadas portales se encuentran en las áreas interlobulillares y están formadas por tres estructuras principales: la arteria hepática, la vena porta y los conductos biliares (**Figura 2**). Estos tres componentes están rodeados por una fina capa de tejido conectivo (Ross & Pawlina, 2016).



**Figura 2. Microarquitectura hepática: Estructura y organización celular del hígado** (modificado de Mandana Khalili & Blaire Burman; en McPhee S & Hammer G. Fisiopatología de la enfermedad. 7ma edición. McGraw-Hill Interamericana Editores SA, México. 2015).

Hacia el centro del lobulillo, la sangre que circula por los sinusoides es recogida en la vena central o vénula post-sinusoidal (**Figura 2**).

Además, el hígado cuenta con una red de vasos linfáticos que drenan la linfa generada en los sinusoides y en los espacios intercelulares. Esta red es esencial para la eliminación de productos de desecho y para la regulación del equilibrio de líquidos.

En el hígado, los hepatocitos se organizan en diferentes estructuras según el modelo que se utilice para describir su anatomía funcional. En el modelo clásico, los hepatocitos se disponen en cordones que irradian desde la vena central, formando una estructura radial alrededor de esta, con los sinusoides entre los cordones. Este modelo refleja el flujo de la sangre centrípeta, que va desde las triadas portales hacia la vena central.

Existen otras dos formas de describir la estructura del hígado en términos de una unidad funcional: el lobulillo portal y el acino hepático.

En el **modelo portal**, se destaca la función exocrina del hígado, cuya principal producto secretado es la bilis. Por ello, el eje morfológico de este lobulillo es el conducto biliar interlobulillar de la triada portal del lobulillo clásico. Sus márgenes externos son líneas imaginarias trazadas entre las tres venas centrales más cercanas a esa triada portal. Estas líneas definen un bloque de tejido aproximadamente triangular que incluye las porciones de tres lobulillos clásicos que secretan la bilis, que drena hacia su conducto biliar axial. Este concepto permite describir la estructura del parénquima hepático de manera comparable a la de otras glándulas exocrinas (Ross & Pawlina, 2016).

El lobulillo acinar o **acino hepático**, por su parte, se basa en la distribución del oxígeno, nutrientes o toxinas dentro del hígado (Ross & Pawlina, 2016). Según este modelo, el hígado se divide en tres zonas, desde la zona 1 (la más cercana a la triada portal) hasta la zona 3 (la más próxima a la vena central). La concentración de oxígeno y nutrientes varía entre estas zonas, lo que influye directamente en la actividad metabólica de los hepatocitos. La zona 1, al estar más próxima a las estructuras vasculares, tienen mayor disponibilidad de oxígeno y nutrientes y son afectadas primero por toxinas, mientras que la zona 3, más alejada, presenta menor

concentración de oxígeno. Estas diferencias explican las variaciones en la función metabólica de los hepatocitos según la zona.

Estas tres configuraciones estructurales -el modelo clásico, el modelo acinar y el modelo portal- son fundamentales para entender cómo el hígado organiza y coordina sus funciones metabólicas y de eliminación de toxinas. La disposición estratégica de las células hepáticas y los vasos sanguíneos garantiza un intercambio eficiente de nutrientes, oxígeno, productos de desecho y bilis. Esto resalta tanto la complejidad como la eficiencia de este órgano vital (Ross & Pawlina, 2016).

### **1.1.3. Fisiología hepática**

El hígado desempeña funciones metabólicas, secretoras y reguladoras esenciales para mantener la homeostasis en el cuerpo. Una de sus principales tareas es la síntesis de proteínas plasmáticas, como la albúmina y algunos de los factores de coagulación, esenciales para la hemostasia y el equilibrio de líquidos (Guyton & Hall, 2019).

Además, el hígado regula el metabolismo de carbohidratos, almacenando glucógeno y liberándolo a la sangre como glucosa según las necesidades del cuerpo. También es responsable de la producción de sales biliares a partir del colesterol, las cuales son fundamentales para la digestión y absorción de grasas en el intestino.

Este órgano actúa como un filtro sanguíneo, facilitando la eliminación de toxinas, como fármacos y algunos productos metabólicos, al transformarlos en compuestos inactivos y/o eliminándolos del cuerpo. Además, desempeña un papel crucial en la metabolización de hormonas, como la conversión de la tiroxina en su forma activa (triyodotironina) y la inactivación de hormonas esteroides.

Este órgano también funciona como depósito y/o conversión de vitaminas (A, D y K) y de hierro, regulando su liberación al torrente sanguíneo según las necesidades del organismo. Finalmente, es responsable de la síntesis de lipoproteínas, esenciales para el transporte de lípidos y colesterol, contribuyendo al equilibrio lipídico en el cuerpo.

## 1.2. Fibrosis y cirrosis hepática

### 1.2.1. Fibrosis

La fibrosis hepática es un proceso patológico que ocurre como resultado de un daño hepático crónico causado por factores como el consumo de alcohol, hepatitis viral (B o C), la esteatohepatitis no alcohólica y enfermedades autoinmunes o colestásicas. Se caracteriza por la acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC), compuesta principalmente por colágeno, lo que da lugar a la formación de tejido cicatricial fibroso que altera la arquitectura normal del hígado (Bataller & Brenner, 2005).

Este proceso es inducido por la inflamación persistente y la activación de las HeSCs, las cuales desempeñan un papel central en la síntesis y depósito de MEC. A medida que la fibrosis avanza, la capacidad regenerativa del hígado se ve comprometida, resultando en la pérdida de funcionalidad hepática y alteración de la perfusión sanguínea.

En etapas tempranas, la fibrosis suele ser reversible si se elimina el agente causal, permitiendo la desactivación de las células estrelladas y la remodelación de la MEC, lo que destaca la importancia de un diagnóstico y tratamiento oportunos (Tsochatzis et al., 2014).

Con el tiempo, la fibrosis hepática progresiva y la MEC desorganizada se acumula de manera excesiva, reemplazando parcialmente los hepatocitos por colágeno fibrilar y otras proteínas (Aydın & Akçalı, 2018). En fases avanzadas, esta condición puede evolucionar hacia la cirrosis, un estadio difícilmente reversible caracterizado por una pérdida severa de la función hepática, la formación de nódulos regenerativos y un incremento notable en depósitos de tejido fibroso. Esto puede derivar en insuficiencia hepática y complicaciones graves, como hipertensión portal.

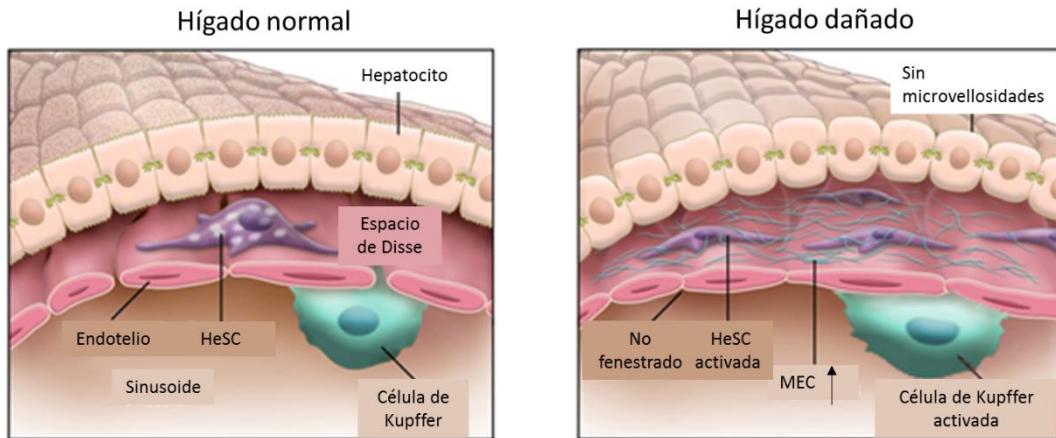
El desarrollo de la fibrosis, o fibrogénesis, comienza con la activación y proliferación de miofibroblastos, las principales células encargadas de la producción de la MEC en el hígado dañado (Aydın & Akçalı, 2018). Aunque las HeSCs activadas (aHeSCs) son la principal fuente de miofibroblastos en la fibrosis hepática, también participan otras células, como los fibroblastos portales, y quizás también células estromales derivadas de la médula ósea y células parenquimatosas hepáticas que

experimentan transición epitelio-mesenquimal (Bataller & Brenner, 2005). En condiciones normales, las HeSCs permanecen en estado quiescente (qHeSCs), almacenando vitamina A en el hígado. Sin embargo, frente a una lesión hepática, estas células se activan en respuesta a mediadores inflamatorios y se transforman en miofibroblastos, que producen y secretan colágeno y enzimas que inhiben la degradación de la MEC. Este proceso provoca la remodelación tisular y contribuye a la formación de tejido cicatricial en el hígado.

Como ha sido descripto previamente (Bataller & Brenner, 2005; Friedman, 2008; Kisseleva & Brenner, 2007), la fibrogénesis hepática es un proceso complejo que ocurre en respuesta a daño crónico, durante el cual los hepatocitos y otros tipos celulares generan señales que estimulan la activación de miofibroblastos y la acumulación de MEC (**Figura 3**). A continuación, se describe de manera resumida el proceso de la fibrogénesis:

1. Daño y señalización inicial: El daño a los hepatocitos, causado por toxinas, infecciones o inflamación, induce la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), citocinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) y fragmentos de MEC degradada. Estas moléculas activan las qHeSCs y las células de Kupffer.
2. Activación de HeSCs: Las HeSCs, que en su estado quiescente almacenan vitamina A, se activan en respuesta a mediadores como el factor transformante de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Al activarse, las HeSCs adoptan un fenotipo de miofibroblasto, caracterizado por la expresión de  $\alpha$ -SMA y la producción de colágeno tipo I.
3. Producción de MEC y remodelación: Los miofibroblastos comienzan a producir MEC, incluido colágeno fibrilar, alterando la arquitectura hepática. Además, secretan metaloproteinasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs), que regulan la degradación y acumulación de MEC.
4. Inflamación y retroalimentación: Los macrófagos activados y las células endoteliales liberan quimioquinas (como CCL2) que reclutan más células inflamatorias. Este proceso perpetúa la inflamación crónica y estimula aún más la activación de HeSCs y miofibroblastos.

5. Progresión y cicatrización: Si el daño persiste, la acumulación de MEC forma bandas fibrosas que pueden evolucionar hacia la formación de puentes de fibrosis, más comúnmente entre tríadas portales. Este proceso puede culminar en la cirrosis, con pérdida de funcionalidad hepática.



**Figura 3. Cambios fenotípicos en el parénquima hepático durante la fibrogénesis.** El proceso incluye muerte de hepatocitos, infiltración de leucocitos y activación de células estrelladas hepáticas (HeSCs) y células de Kupffer. Esto resulta en un aumento de la matriz extracelular (MEC) en el espacio perisinusoidal, pérdida de las fenestraciones del endotelio y retracción de las microvellosidades de los hepatocitos hacia el espacio de Disse. (Adaptado de Bataller y Brenner, 2005).

### 1.2.2. Cirrosis hepática

La cirrosis hepática es el resultado de mecanismos de daño hepático crónico, caracterizados por inflamación persistente, muerte celular y acumulación progresiva de tejido fibrótico (Gasmi & Kleiner, 2019). Desde el punto de vista histológico, se define por la formación de nódulos de regeneración rodeados por septos fibrosos densos. Ese patrón conduce a la extinción del parénquima hepático, el colapso de las estructuras hepáticas y una alteración significativa de la arquitectura vascular. Estas modificaciones incrementan la resistencia al flujo portal, lo que genera hipertensión portal y disfunción hepática (Pinzani et al., 2011).

La enfermedad tiene un impacto global significativo, siendo la decimocuarta causa de muerte a nivel mundial y la cuarta en Europa central, con aproximadamente 1,03 millones de muertes anuales. Además, es la principal indicación para trasplante hepático en Europa, donde se realizan 5500 procedimientos al año. Entre las principales causas se encuentran la infección por hepatitis B o C, el consumo

excesivo de alcohol y, con incidencia creciente, la enfermedad de hígado graso no alcohólica. Sin embargo, determinar la prevalencia real de la cirrosis es un desafío, ya que los estadios iniciales suelen ser asintomáticos (Tsochatzis et al., 2014).

La cirrosis no sólo compromete la función hepática, sino que también se asocia con complicaciones graves, como el desarrollo de hepatocarcinoma, cáncer primario de hígado, que es el quinto tipo de cáncer más común y la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Bray et al., 2018). El limitado número de donantes de órganos destaca la necesidad urgente de avanzar en el desarrollo de terapias más eficaces que puedan detener o revertir la fibrosis antes de que evolucione a una cirrosis avanzada, evitando así la dependencia de trasplantes hepáticos.

Desde un punto de vista clínico, la cirrosis puede dividirse en dos etapas principales: compensada y descompensada.

- Cirrosis compensada: En esta fase, a pesar del daño estructural considerable, el hígado mantiene sus funciones básicas mediante mecanismos adaptativos. Los pacientes suelen ser asintomáticos o presentar síntomas leves, como fatiga y malestar general. El diagnóstico temprano en esta etapa es crucial, ya que permite implementar intervenciones que pueden prevenir la progresión hacia la descompensación.
- Cirrosis descompensada: Esta etapa avanzada de la enfermedad se caracteriza por complicaciones graves, como ascitis (acumulación de líquido en la cavidad abdominal), encefalopatía hepática (deterioro neurológico debido a la acumulación de toxinas), hemorragias por varices esofágicas y peritonitis bacteriana espontánea. En esta fase, la función hepática está severamente comprometida y el pronóstico del paciente empeora significativamente.

Aunque tradicionalmente se ha considerado una enfermedad terminal, los avances en su manejo han transformado esta percepción. La mortalidad a un año varía significativamente, desde el 1% al 57 %, dependiendo de la aparición de eventos clínicos de descompensación. Actualmente, el término “enfermedad hepática avanzada” se emplea para reflejar la naturaleza dinámica de la cirrosis y su

pronóstico variable. Además, estudios recientes han evidenciado que incluso la fibrosis avanzada puede ser reversible con tratamientos específicos, como las terapias antivirales dirigidas a la hepatitis B o C (Tsochatzis et al., 2014).

El enfoque terapéutico moderno se centra en estabilizar la enfermedad, prevenir complicaciones y retrasar la necesidad de un trasplante hepático. Esto se logra a través de intervenciones tempranas y estrategias preventivas que priorizan un manejo integral del paciente, abordando tanto las causas subyacentes como las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

### **1.2.3. Modelado *in vivo* de fibrosis hepática**

Los modelos animales de fibrosis hepática son esenciales para comprender la fisiopatología de la fibrogénesis hepática y evaluar la efectividad de nuevos tratamientos. Debido a que las diversas enfermedades hepáticas que conducen a fibrosis no pueden ser reproducidas fielmente en un único modelo animal, la utilización de diferentes modelos ofrece información complementaria clave para la investigación. Entre los modelos más comunes en ratones y ratas se encuentran los de tioacetamida (TAA) y ligadura de conducto biliar (BDL), los cuales implican mecanismos distintos para inducir fibrosis.

El **modelo de TAA** se emplea principalmente para inducir fibrosis hepática mediante la administración crónica del compuesto (Ravichandra & Schwabe, 2021; Wu et al., 2023) . En ratas, la TAA se administra generalmente a través de inyecciones intraperitoneales, con varias dosis semanales durante un período de entre 4 a 16 semanas, según el grado de fibrosis deseado. Este modelo es útil para estudiar la progresión de la fibrosis hacia la cirrosis y la carcinogénesis hepática. En ratones, además de las inyecciones intraperitoneales, algunos estudios prefieren la administración de TAA diluido en el agua de bebida, lo que permite inducir fibrosis en contextos tanto agudos como crónicos. La TAA actúa induciendo necrosis hepatocitaria y fibrogénesis mediante la formación de metabolitos tóxicos, como los TAA-S-óxidos, que alteran la permeabilidad celular, aumentan los niveles de  $Ca^{2+}$  e inhiben la actividad mitocondrial. Esto culmina en fibrosis predominantemente pericentral, con formación eventual de puentes fibrosos entre venas centrales y estructuras porto-portales.

**El modelo de BDL** se utiliza en ratones y ratas (Ravichandra & Schwabe, 2021; Wu et al., 2023). En este modelo, se realiza una cirugía para obstruir el flujo biliar hacia el duodeno, lo que provoca la acumulación de ácidos biliares, apoptosis y necrosis de hepatocitos, activación de fibroblastos y aumento en la producción de colágeno. En ratas, la fibrosis y los cambios estructurales hepáticos suelen evaluarse entre 10 y 14 días después de la ligadura. En ratones, el desarrollo de fibrosis es más rápido, observándose un estadio avanzado en aproximadamente 16 días. La fibrosis inducida por BDL se caracteriza por puentes entre las áreas portal y central y se emplea comúnmente para estudiar las enfermedades hepáticas colestáticas y la fibrogénesis periportal. Este modelo también permite investigar procesos como el estrés oxidativo y la expresión de factores de crecimiento, especialmente TGF- $\beta$ 1, que desempeñan un papel central en la fibrosis hepática.

**Otros modelos** comunes para estudiar la fibrosis hepática incluyen el de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). Esta droga induce fibrosis mediante toxicidad hepática crónica. La administración repetida de CCl<sub>4</sub> genera daño hepático, inflamación y fibrosis, imitando procesos similares a los de la cirrosis humana (Ravichandra & Schwabe, 2021; Wu et al., 2023).

El modelo de dimetilnitrosamina (DEN) es utilizado para investigar la carcinogénesis hepática en el contexto de fibrosis crónica (Ravichandra & Schwabe, 2021; Wu et al., 2023).

También se utilizan el modelo de dieta alta en grasas (HFD). Este modelo induce una fibrosis hepática asociada con la obesidad y la resistencia a la insulina, factores clave en el desarrollo de enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Otro modelo, conocido como dieta deficiente en metionina y colina (MCD), se utiliza para estudiar la fibrosis relacionada a la NASH. Este modelo induce inflamación y acumulación de lípidos en el hígado, replicando características clínicas de la enfermedad (Ravichandra & Schwabe, 2021; Wu et al., 2023).

Por otro lado, el modelo de lipopolisacárido (LPS) induce inflamación aguda y crónica en el hígado, lo que puede conducir a fibrosis. Es ideal para estudiar los efectos del estrés inflamatorio en la fibrogénesis (Ravichandra & Schwabe, 2021; Wu et al., 2023).

El uso combinado de algunos de estos modelos permite una comprensión integral de los mecanismos de la fibrosis hepática, desde sus etapas iniciales hasta su progresión hacia cirrosis y cáncer hepático (Ravichandra & Schwabe, 2021; Wu et al., 2023).

#### **1.2.4. Tratamiento de la fibrosis hepática**

Actualmente, los tratamientos para la fibrosis hepática y la cirrosis se han diversificado considerablemente, y su efectividad depende de la causa subyacente de la enfermedad hepática (Domínguez et al., 2009). En el caso de la fibrosis hepática, el manejo depende principalmente de controlar el factor desencadenante, como el consumo de alcohol, la hepatitis viral o la enfermedad por hígado graso no alcohólico (Tan et al., 2021). El uso de antivirales de acción directa (AAD) ha revolucionado el tratamiento de la fibrosis hepática asociada a la hepatitis C, permitiendo la erradicación del virus y una reducción significativa de las complicaciones relacionadas con la cirrosis, como el carcinoma hepatocelular, la descompensación hepática y la mortalidad.

En paralelo, se están explorando tratamientos antifibróticos más específicos, como el Cenicriviroc, que actúa sobre los receptores CCR2/5 para inhibir la activación de las HeSCs y reducir la fibrosis, así como el Elafibranor, un agonista de PPAR $\alpha/\delta$  que ha mostrado eficacia en el tratamiento de la NASH. Se requieren más estudios para confirmar su efectividad y seguridad a largo plazo (Tan et al., 2021).

En los casos de cirrosis avanzada, los tratamientos disponibles son principalmente paliativos, ya que la enfermedad no se ha podido revertir en esta fase (Nusrat et al., 2014). Sin embargo, los pacientes pueden beneficiarse de terapias farmacológicas, como los antagonistas de los receptores de aldosterona, como la espironolactona, que ayudan a controlar la ascitis al reducir la retención de sodio y agua. Además, los betabloqueantes no selectivos se utilizan para prevenir el sangrado variceal, una de las complicaciones más graves asociadas con la hipertensión portal. Aunque existen diversas terapias dirigidas a manejar estas complicaciones, el enfoque general sigue siendo el control de los síntomas y la mejora de la calidad de vida.

Sin embargo, cuando la cirrosis progres a una etapa descompensada, el tratamiento farmacológico ya no es suficiente para restaurar la función hepática normal, y el trasplante hepático se convierte en la única opción viable (Gasmi & Kleiner, 2019). El trasplante hepático implica la sustitución del hígado enfermo por un órgano sano proveniente de un donante, ya sea vivo o fallecido. Aunque el trasplante hepático ofrece una solución potencialmente curativa para los pacientes con cirrosis descompensada, está limitado por la escasez de donantes, así como por las complicaciones asociadas con la cirugía y la necesidad de inmunosupresores para prevenir el rechazo del injerto.

A pesar de sus beneficios, el trasplante hepático conlleva riesgos significativos, siendo la recuperación postoperatoria crucial para prevenir infecciones, trastornos de coagulación y el rechazo del injerto (Moreno & Berenguer, 2006). Además, los pacientes deben someterse a un régimen estricto de medicamentos inmunosupresores para prevenir que el sistema inmunológico ataque al nuevo órgano, lo que aumenta la susceptibilidad a infecciones y tiene otros efectos adversos a largo plazo.

Este escenario subraya la importancia del diagnóstico temprano y la prevención de la cirrosis, ya que el tratamiento farmacológico por sí solo no puede restaurar la función hepática normal una vez que la enfermedad ha alcanzado una fase avanzada. Por tanto, la identificación precoz de la cirrosis, el manejo adecuado de los factores de riesgo y el monitoreo constante de los pacientes son fundamentales para mejorar los resultados a largo plazo y reducir la necesidad de trasplante hepático en etapas críticas (Singh et al., 2023).

### **1.3. Regeneración hepática**

El hígado actúa como el principal transductor bioquímico para mantener la homeostasis corporal, procesando las sustancias absorbidas del intestino mediante su almacenamiento, eliminación, transformación en otros compuestos orgánicos o liberación al torrente sanguíneo para su uso en todo el organismo. Esto lo convierte en un proveedor metabólico esencial para todos los tejidos, regulando la disponibilidad de ácidos grasos para los músculos y glucosa para el cerebro, lo que sustenta la estrecha relación entre su peso y el peso corporal total. Esta proporción, conocida como la relación peso hígado/peso corporal, se ajusta de manera estricta

frente a cambios fisiológicos o patológicos, a través de mecanismos aún no se comprenden completamente.

En condiciones normales, las células hepáticas muestran tasas de proliferación muy bajas, representando menos del 0,2 % de los hepatocitos (Michalopoulos, 2020). Estudios recientes sugieren que dicha proliferación ocurre en diferentes zonas del lóbulo. Aunque los mecanismos detrás de estos procesos no se comprenden completamente, se acepta que existen controles que aseguran que el hígado conserve su peso adecuado. Sin embargo, si se pierde una porción significativa del tejido hepático de manera aguda, el hígado iniciará un proceso regenerativo para restaurar con precisión la proporción entre el peso del hígado y el peso corporal, alcanzando el estado previo (Mao et al., 2014).

En situaciones patológicas, la regeneración hepática ocurre cuando hay una pérdida significativa de hepatocitos, como en enfermedades infecciosas, condiciones tóxicas crónicas, lesión por isquemia-reperfusión o ataques inmunitarios crónicos (Michalopoulos, 2020). Esta pérdida masiva de células hepáticas va acompañada de una proliferación compensatoria de los hepatocitos restantes. En contextos agudos, como la exposición a toxinas, trauma o hepatitis breve, la pérdida de hepatocitos desencadena una inflamación y regeneración compensatoria altamente eficiente, donde ambos procesos colaboran para restaurar el tejido hepático. Sin embargo, resulta complejo separar las señales de proliferación de las inflamatorias en este proceso.

La regeneración hepática es un proceso altamente regulado y multifacético que involucra la proliferación celular y la reparación de ADN para restaurar el tejido hepático perdido tras lesiones (Miyaoka & Miyajima, 2013). La proliferación de hepatocitos es mediada por diversas señales de crecimiento, como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que actúan principalmente en respuesta a la pérdida de masa hepática (Cienfuegos et al., 2004). Además, las vías de señalización de Wnt/β-catenina y Notch son esenciales para la activación de células madre hepáticas y progenitoras, contribuyendo a la regeneración celular. Este proceso es especialmente relevante en condiciones de pérdida crítica de masa hepática, donde el daño crónico y la pérdida celular inducen una respuesta compensatoria que activa la proliferación de

progenitores. Este fenómeno puede también suceder en la resección hepática, donde se desencadena una respuesta regenerativa inmediata.

### **1.3.1. Hepatectomía parcial**

El modelo de hepatectomía parcial (PHx) se emplea en ratas y ratones para estudiar los procesos de regeneración hepática y reparación del hígado (Mitchell & Willenbring, 2008). En este modelo, se realiza una resección quirúrgica de un porcentaje específico del hígado, típicamente entre el 60% y el 70%, lo que desencadena una respuesta regenerativa en el tejido hepático remanente. Los primeros signos de regeneración celular aparecen pocas horas después de la cirugía, impulsados por señales moleculares y celulares que activan la proliferación de hepatocitos y subsecuentemente de otras células hepáticas. En ratones, el hígado suele regenerarse completamente en un período de 7 a 14 días. En ratas, este proceso puede extenderse 14 a 21 días, dependiendo del tamaño de la resección y las condiciones experimentales específicas (Kandilis et al., 2014; Yagi et al., 2020).

En la PHx la regeneración del hígado ocurre como respuesta sincrónica y homogénea del hígado remanente, mediante la proliferación de hepatocitos y la activación de rutas de reparación del ADN (Cienfuegos et al., 2004; Cordero-Espinoza & Huch, 2018). No se forma ningún nuevo lóbulo o lobulillo hepático. Después de la regeneración hepática, los lobulillos y los conductillos biliares son más grandes que antes de la hepatectomía, y el grosor de las placas de hepatocitos aumenta de una sola fila de hepatocitos a (en promedio) 1.5 hepatocitos, rodeados a ambos lados por sinusoides hepáticos (Michalopoulos, 2007).

Numerosos estudios han demostrado que la regeneración tras una PHx se caracteriza por una fidelidad fenotípica (Michalopoulos & Bhushan, 2021). Es decir, los hepatocitos generan hepatocitos, y lo mismo ocurre con los colangiocitos, las HeSCs, las células endoteliales sinusoidales, las células de Kupffer y otros tipos celulares. Sin embargo, en estos dos últimos tipos celulares, además de la proliferación local, existe evidencia de la participación de células precursoras que migran desde la médula ósea.

La regeneración hepática es, técnicamente, un proceso de crecimiento compensatorio más que de regeneración (Fausto et al., 2006). Por lo tanto, no sigue los mismos pasos generales involucrados en los procesos regenerativos verdaderos, y no se forma un blastema que contenga células desdiferenciadas. En este contexto, los hepatocitos pueden aumentar su tamaño y acumular material genético antes de entrar en la fase proliferativa.

En el proceso regenerativo del hígado, muchos hepatocitos no se dividen de manera típica (mitosis completa con citocinesis). En cambio, entran en un estado de **poliploidización**, en el que replican su ADN (aumentan la ploidía) sin dividirse en dos células hijas. Esto genera hepatocitos con más de dos copias del genoma, es decir, células poliploides (Michalopoulos & DeFrances, 1997). Además de la poliploidización, algunos hepatocitos adquieren dos núcleos en lugar de uno, lo que también es atípico en comparación con la división celular estándar (Michalopoulos & DeFrances, 1997). Las células poliploides y binucleadas tienen mayor contenido de ADN, lo que permite una mayor producción de proteínas y enzimas necesarias para las funciones hepáticas. Esto es crítico para satisfacer las demandas del cuerpo mientras el hígado recupera su masa funcional (Miyaoka & Miyajima, 2013).

El modelo de PHx es especialmente útil para estudiar los mecanismos moleculares que regulan la regeneración hepática, así como para evaluar el impacto de diversas intervenciones terapéuticas sobre la capacidad regenerativa del hígado. Durante el proceso de regeneración, los hepatocitos proliferan rápidamente para restablecer el volumen hepático perdido. Los macrófagos se activan y sintetizan citoquinas, prostaglandinas y el factor activador de plaquetas con funciones proliferativas y antiapoptóticas (Diehl, 2000; Medzhitov, 2010; van Sweringen et al., 2011). Además, la restauración de la vasculatura hepática desempeña un papel crucial al garantizar la oxigenación y nutrición adecuadas de las células hepáticas, promoviendo la recuperación del tejido dañado (Wu et al., 2023; Yagi et al., 2020).

Otra ventaja importante del modelo de PHx es su utilidad para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la reparación celular, como la activación de las vías de señalización de proliferación celular y reparación del ADN (Hora & Wuestefeld, 2023; Yagi et al., 2020). Además, se ha demostrado que el estrés celular generado por la resección hepática puede ser mitigado mediante mecanismos de defensa antioxidantes y chaperonas moleculares, lo que asegura

la estabilidad genómica de las células hepáticas durante la regeneración. Este modelo, de fácil implementación en animales pequeños, facilita el uso de enfoques genéticos y farmacológicos, ampliando las posibilidades para investigar los mecanismos de regeneración hepática, la restauración de la vasculatura y el desarrollo de terapias para enfermedades hepáticas.

### **1.3.2. Síndrome pequeño para su tamaño (small-for-size)**

El trasplante hepático enfrenta un desafío crítico debido a la escasez de órganos disponibles. Para mitigar este problema, se han implementado estrategias como el uso de donantes vivos y la división de injertos cadavéricos, lo que ha permitido ampliar el acceso a trasplantes. Sin embargo, los injertos parciales enfrentan retos específicos, ya que, incluso en ausencia de complicaciones como obstrucción vascular o sepsis, pueden desarrollar disfunción primaria del injerto. Esta situación es conocida como síndrome de tamaño insuficiente o Small for Size Syndrome (SFSS), que supone un desafío importante en el manejo postoperatorio de los receptores (Gonzalez, 2010).

El SFSS se caracteriza clínicamente por colestasis, coagulopatía prolongada, hipertensión portal, ascitis y, en casos graves, hemorragia gastrointestinal. Este síndrome ocurre cuando la masa funcional del injerto no satisface las demandas metabólicas del receptor (Gonzalez, 2010; Heaton, 2003). Las manifestaciones suelen aparecer al final de la primera semana postrasplante y pueden incluir hipertensión portal con ascitis y sangrado persistentes, los cuales remiten solo si el injerto logra regenerarse adecuadamente. A nivel bioquímico, se observa elevación de bilirrubina conjugada, prolongación del tiempo de protrombina y aumentos moderados de transaminasas. Histológicamente, los injertos muestran tapones biliares, necrosis focal e isquemia, con la trombosis de la arteria hepática como complicación secundaria. Aproximadamente el 50% de los pacientes con SFSS fallecen por sepsis entre 4 y 6 semanas tras el trasplante.

El riesgo de SFSS se ve amplificado en casos de daño hepático avanzado, como en la cirrosis, donde la insuficiencia del remanente hepático futuro constituye un obstáculo significativo para la cirugía hepática. En un hígado sano, el remanente hepático futuro (volumen que permanece después de una cirugía mayor) debe

superar el 25% para garantizar la recuperación postoperatoria, pero en contextos de cirrosis, esta proporción aumenta a más del 40%.

Además, la hepatectomía, reconocida como el tratamiento de elección para las neoplasias malignas hepáticas, continúa enfrentándose a altas tasas de insuficiencia hepática postoperatoria, lo cual es una causa relevante de mortalidad perioperatoria que compromete gravemente los resultados clínicos (Buenrostro-Espinosa et al., 2022; Song et al., 2004).

Los estudios en modelos animales han sido esenciales para el desarrollo de enfoques terapéuticos que estimulen la regeneración hepática, incluso bajo condiciones adversas. Estas estrategias incluyen la administración de agentes que promuevan la proliferación celular hepática, la modulación de vías moleculares clave y la optimización de técnicas quirúrgicas, como el manejo del flujo portal (Cienfuegos et al., 2004; Hu et al., 2024). Los avances derivados de estas investigaciones no solo han permitido un mayor entendimiento de la patogénesis del SFSS, sino que también ofrecen herramientas prometedoras para superar las limitaciones actuales en la cirugía hepática, reduciendo complicaciones, mejorando los resultados postoperatorios y aumentando las tasas de éxito en trasplantes hepáticos (Riddiough et al., 2020).

#### **1.4. Las células progenitoras estromales de la médula ósea**

Las células progenitoras estromales de la médula ósea (o progenitores estromales de médula ósea; BMSPs) consisten en una población heterogénea de células mesenquimatosas que expresan marcadores en común, tales como CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y fibronectina (Gao et al., 2022). Algunas subpoblaciones expresan también vimentina y desmina. Estas células tienen la capacidad de pegarse al plástico cuando son sembradas en una placa de cultivo y de proliferar formando colonias. Estas células pueden ser expandidas *in vitro* y presentar diverso grado de plasticidad celular. Algunas de ellas son conocidas como células madre mesenquimales (BMSCs) por: 1) tener la capacidad de pegarse al plástico; 2) expresar marcadores de superficie estromales y carecer de marcadores de células hematopoyéticas, y 3) poder diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos, lo que les otorga un papel fundamental en la regeneración de tejidos y

el mantenimiento de la homeostasis ósea (Aquino et al., 2010; E. J. Fiore et al., 2015).

Además de por su plasticidad, las BMSCs destacan por secretar moléculas bioactivas, lo que les permite participar directamente en la reparación tisular, en parte a través de mecanismos inmunomoduladores (Aquino et al., 2010; Fiore et al., 2015). Estas propiedades posicionan a las BMSCs como una potencial herramienta en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y trastornos autoinmunes. Las BMSCs son consideradas un recurso prometedor en la medicina regenerativa, con aplicaciones en la reparación de tejidos óseos, cartilaginosos y adiposos, así como en el tratamiento de condiciones que requieren la restauración de la homeostasis celular.

En estudios preclínicos y clínicos, las BMSCs han mostrado un notable potencial terapéutico lo que abre nuevas perspectivas para su uso en la terapia de diversas patologías (E. J. Fiore et al., 2015; Gao et al., 2022).

Algunas subpoblaciones de BMSPs poseen una capacidad destacada para migrar hacia áreas lesionadas, desempeñando un papel fundamental en la reparación de tejidos. Su versatilidad no se limita a la migración, ya que estas células podrían eventualmente diferenciarse en diversos tipos celulares, incluidos hepatocitos y células endoteliales, lo que las hace altamente relevantes en la regeneración hepática (Aquino et al., 2021; E. J. Fiore et al., 2018; Sierra et al., 2020).

Los BMSPs desempeñan un papel esencial en la homeostasis de la médula ósea y en la regulación del microambiente hematopoyético. Se pueden identificar subtipos específicos según su localización en la médula ósea. Por ejemplo, las células endosteales se localizan en la interfaz entre la médula ósea y el hueso, y son fundamentales en la regulación del microambiente óseo, debido a su gran capacidad osteogénica. Mientras que alrededor de los vasos sanguíneos se encuentran dos subpoblaciones, las que se localizan en áreas perisinusoidales y periarteriolares, respectivamente, y participan en la formación de nichos hematopoyéticos (Aquino et al., 2021).

Recientemente, nuestro grupo describió la existencia de una subpoblación de BMSPs que coexpresa GLAST (por GLutamate Asparte Transporter; transportador de glutamato y aspartato) y Wnt1 (ligando de Wnt), al menos a días postnatales

tempranos en ratón (Sierra et al., 2020). Corresponde a un grupo de células perisinusoidales. Luego de una lesión hepática se ha descripto que se movilizan hacia la sangre periférica y que originarían células con características morfológicas y la expresión de marcadores típicos de endoteliales (ELCs) o de hepatocitos (HLCs). Estas células no participan en el proceso de cicatrización hepática, sino que cumplirían una función regenerativa (Sierra et al., 2020).

### 1.5. La vía de señalización de Wnt

La vía de señalización Wnt es una cascada de señalización intracelular activada por proteínas de la familia Wnt, las que están modificadas por lípidos y son secretadas por algunos tipos celulares específicos (Clevers & Nusse, 2012). En su forma más simple, esta vía incluye un ligando Wnt, los receptores específicos presentes en la superficie de una célula receptora y los transductores que median la señal dentro de esta última. Tras el reconocimiento del ligando y la transmisión intracelular de la señal, la activación de la vía induce diversas respuestas celulares, como la actividad mitótica, la especificación del tipo celular o el establecimiento de la polaridad celular (Kahn, 2014). Estas respuestas son esenciales para orquestar eventos clave durante el desarrollo del organismo. En el organismo adulto, la señalización Wnt sigue desempeñando un papel crucial al regular la homeostasis tisular y promover la regeneración celular (Rim et al., 2022).

La vía de señalización Wnt se diversifica en tres ramas principales, cada una con funciones específicas. La **vía de la  $\beta$ -catenina o canónica** de Wnt regula la transcripción de genes en el núcleo, controlando la proliferación celular, la diferenciación y la autorrenovación de células madre. Es esencial para el desarrollo y la homeostasis tisular. La **vía de polaridad celular planar (PCP)** está asociada con la quinasa N-terminal de Jun (JNK). Esta rama desencadena reorganizaciones del citoesqueleto, coordinando la polaridad, la migración y la organización celular en tejidos epiteliales y neuronales. Finalmente, la **vía Wnt/Ca<sup>2+</sup>** modula la movilización de calcio intracelular, lo que influye en procesos como la contracción muscular, la adhesión celular y la reorganización del citoesqueleto. Estas tres ramas trabajan de manera coordinada para regular el desarrollo, la homeostasis y las respuestas celulares frente a diversos estímulos.

La vía canónica de Wnt comprende tres componentes principales (Rim et al., 2022; H. Wang et al., 2024):

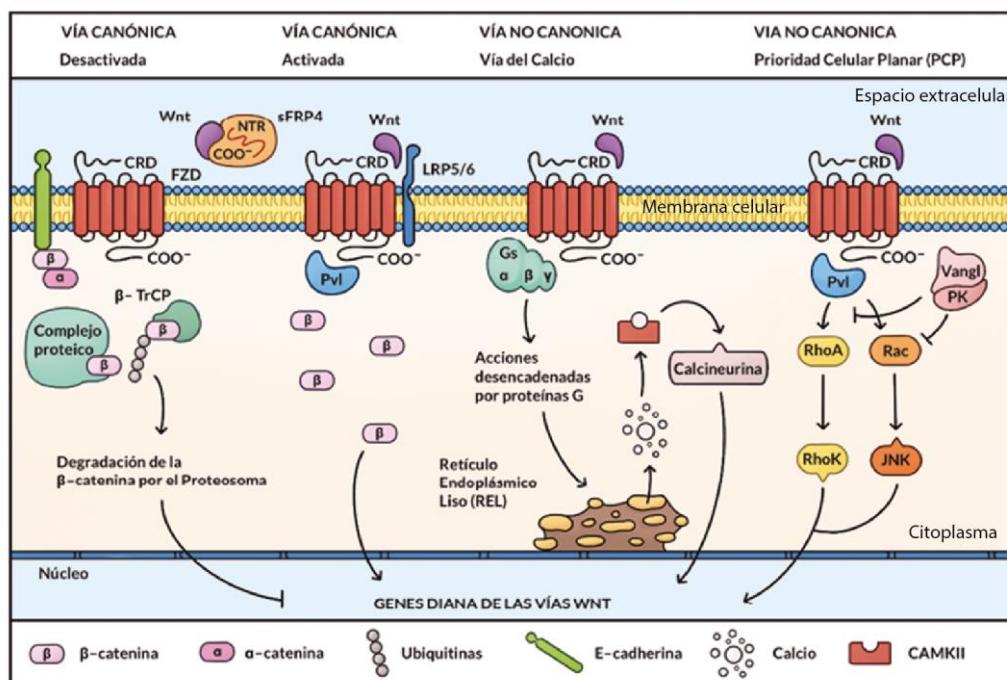
- Proteínas de la membrana celular: Incluyen ligandos Wnt (Wnt1, Wnt2, Wnt3a y Wnt8), receptores transmembrana Frizzled y receptores auxiliares LRP5/6, Ror2 y Tyk2.
- El complejo de degradación: Compuesto por la quinasa 3 $\beta$  de la glucógeno sintasa (GSK-3 $\beta$ ), poliposis adenomatosa coli (APC) la quinasa de caseína 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) y la proteína estructural Axina.
- $\beta$ -catenina: Miembro de la familia de las conexinas, que es fosforilado por GSK-3 $\beta$  y CK1 $\alpha$ . Los componentes APC y Axina se unen a  $\beta$ -catenina, facilitando su fosforilación por GSK-3 $\beta$  y promoviendo su degradación proteasomal para mantener bajos sus niveles intracelulares.

En ausencia de ligandos Wnt en la superficie celular, la mayor parte de  $\beta$ -catenina se localiza en las uniones celulares, donde participa en la regulación del citoesqueleto y en el mantenimiento de la adhesión celular. Una pequeña cantidad de  $\beta$ -catenina se encuentra unida al complejo de degradación en el citoplasma, donde es ubiquitinada y degradada por el proteosoma. Además, el citoplasma contiene bajos niveles de  $\beta$ -catenina libre, que no puede entrar en el núcleo ni iniciar la transcripción de los factores TCF/LEF (factores potenciadores linfoides/factores de células T), lo que bloquea la expresión de sus genes diana río abajo.

Sin embargo, en presencia de ligandos Wnt extracelulares, estas proteínas se unen a FZD y LRP5/6, activando las proteínas disheveled (DVL) en el citoplasma. El DVL activado inhibe GSK-3 $\beta$  en el complejo de degradación. Como consecuencia, la GSK-3 $\beta$  inactiva no puede fosforilar la  $\beta$ -catenina, lo que permite su acumulación gradual en el citoplasma. Cuando los niveles de  $\beta$ -catenina alcanzan un umbral crítico, ésta se transfiere al núcleo, donde inicia la transcripción de Sp1 y 5 (Specificity Proteins 1 y 5), c-Myc, ciclina D1, proteína asociada a Dickkopf 1, metaloproteinasa de matriz (MMP)-7 y axina 2, entre otros genes blanco, al unirse a TCF/LEF en el núcleo (**Figura 4**) (Huelsken & Behrens, 2002).

A diferencia de la activación de la vía clásica Wnt/ $\beta$ -catenina, la señalización Wnt no canónica no depende de  $\beta$ -catenina y se caracteriza por vías alternativas

denominadas vías no canónicas de Wnt (**Figura 4**). La activación de la vía Wnt/PCP comienza con la unión de ligandos Wnt (como Wnt5a y Wnt11), presentes en el espacio extracelular, al receptor de membrana FZD y a co-receptores, que son tirosina quinasas (Qin et al., 2024). Dicha unión causa la fosforilación de Dvl, llevando al reclutamiento de Inversina (Invs). La proteína de polaridad Par6 interactúa con Dvl, y el factor regulador de ubiquitinación Smad (Smurf) es reclutado por el Dvl fosforilado y se une a Par6. Smurf ubiquitina entonces a Prickle, una proteína que normalmente inhibe la señalización Wnt/PCP, marcándola para su destrucción proteasomal. La descomposición de Prickle permite que Dvl se asocie con el activador asociado a Dvl de la morfogénesis (DAAM), lo que activa el gen de homólogo de Ras, miembro A (RhoA), pero no Rac1 ni Cdc24. DAAM también activa Profilina. Rac1 activa JNK, que luego fosforila y activa a c-Jun, lo que lo lleva al núcleo e inicia la expresión génica. JNK también activa la proteína que interactúa con CapZ (CapZIP) mediante fosforilación. RhoA activa la quinasa asociada a RHO con estructura en espiral (ROCK) y la diaphanous 1 (DIA1). ROCK activa la cadena ligera reguladora de la miosina II (MRLC). CapZIP, MRLC, DIA1 y Profilina contribuyen a la polimerización de actina, lo cual es crucial para la polaridad celular y la migración.



**Figura 4. Representación gráfica de las vías de señalización de Wnt.** Se observan la vía canónica, tanto en su estado activo como inactivo, y la vía no canónica, que incluye la vía del calcio y la vía de la Prioridad Celular Planar (PCP). Se aprecian la vía canónica (en su estado activo e inactivo) y la vía no canónica (vía del calcio y de la Polaridad Celular Planar, PCP). Modificado de (Ramírez Tortosa et al., 2021).

La señalización Wnt/Ca<sup>2+</sup> se activa cuando los ligandos Wnt, principalmente Wnt5a y Wnt11, se unen a FZD, reclutando la proteína DVL a la membrana celular mediante la interacción con proteínas de unión a nucleótidos de guanina (**Figura 4**). Este proceso activa la fosfolipasa C y la quinasa dependiente de calmodulina II, provocando un aumento en la liberación de iones Ca<sup>2+</sup> intracelulares (Huelsken & Behrens, 2002). Como resultado, se regula positivamente la señalización celular asociada a esta vía.

**Vía de señalización de Wnt en las MSCs humanas.** Interesantemente, en humanos las BMSCs presentan activación de la vía de Wnt (Paciejewska et al., 2016). En ese trabajo, se reportó que las BMSCs fetales producen factores, incluyendo señales Wnt, que promueven la proliferación de las BMSCs adultas. Y factores relacionados con la vía de Wnt de las BMSCs adultas favorecen la hematopoyesis *in vitro*. De hecho, varios trabajos han reportado que la vía de señalización de Wnt tiene un rol crucial en la proliferación y diferenciación de las BMSCs adultas humanas (Baksh & Tuan, 2007; Boland et al., 2004; De Boer et al., 2004; Etheridge et al., 2004). Estos efectos están mediados tanto por la vía canónica de Wnt, a través Wnt3a, como por la vía no canónica, mediante Wnt5a (Baksh & Tuan, 2007). Cuando las MSCs se cultivaron en suspensión, Wnt3a promovió su proliferación y aumentó la reserva de MSCs capaces de formar unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) y unidades formadoras de colonias de osteoblastos (CFU-O). En contraste, Wnt5a no influyó en estas propiedades bajo las mismas condiciones. Sin embargo, cuando las células se cultivaron directamente sobre plástico, Wnt5a incrementó significativamente el número de CFU-O en comparación con las condiciones de control. Estos hallazgos y otros sugieren que la señalización de Wnt tiene un papel modulador en la funcionalidad de las BMSCs, proporcionando señales instructivas clave para su reclutamiento, mantenimiento y diferenciación (Ling et al., 2009).

## 1.6. Trazado de linaje celular

El análisis de trazado de linaje celular es un enfoque experimental que permite identificar la progenie de un tipo celular específico, gracias a la expresión de un gen reportero (Kretzschmar & Watt, 2012). Su objetivo principal es facilitar el estudio del

origen, diferenciación y/o distribución de una subpoblación celular a lo largo del tiempo dentro de un organismo vivo.

Este análisis generalmente se realiza utilizando modelos genéticos de ratones doble transgénicos que dependen de la actividad de recombinasas. Estos modelos son condicionales: el gen que codifica la enzima recombinasa se encuentra bajo el control de un promotor específico del tipo celular de interés. De este modo, la enzima recombinasa sólo se expresa cuando dicho promotor se activa, lo que a su vez facilita la expresión de la proteína reportera.

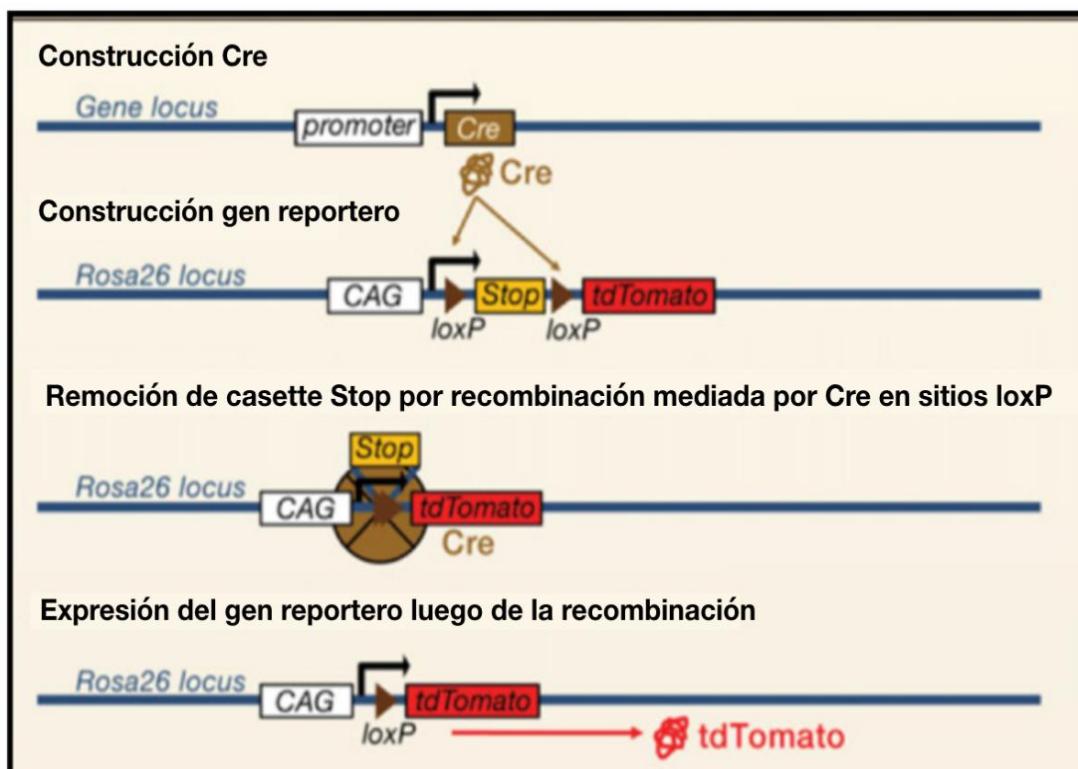
La estrategia requiere cruzar dos cepas de ratones: una que expresa la enzima recombinasa bajo el control de un promotor específico y otra que contiene un gen reportero. Este gen reportero se activa únicamente en los animales que poseen ambos transgenes, marcando las células mediante señales fluorescentes, bioluminiscentes o enzimáticas. Este diseño permite rastrear con precisión el destino de las células a lo largo del tiempo.

Esta metodología ha sido instrumental para entender los mecanismos biológicos que subyacen al desarrollo embrionario, la regeneración de tejidos y la respuesta a lesiones, al proporcionar una visión detallada de la dinámica celular en contextos biológicos complejos (T. Wang et al., 2023).

El trazado genético de linaje en ratones se realiza generalmente utilizando el sistema Cre-loxP (**Figura 5**). En una línea de ratones, la recombinasa Cre se expresa bajo el control de un promotor específico de tejido o célula. Esta línea se cruza con una segunda línea de ratones que contiene un gen reportero flanqueado por una secuencia loxP-STOP-loxP, también conocida como "*STOP floxed*". En los animales que expresan ambos constructos, Cre elimina la señal de *STOP* de la transcripción tras cortar los dos sitios LoxP, lo que facilita la expresión del gen reportero en ese tejido o célula y en su linaje.

Los constructos de reporteros suelen estar bajo el control del promotor del locus Rosa26, que está activo de manera ubicua en ratón (Kretzschmar & Watt, 2012). Sin embargo, presentan la limitación de no ser fácilmente detectables mediante citometría de flujo en células vivas. El primer ratón con un reportero fluorescente fue diseñado para expresar EGFP (*enhanced GFP*). Actualmente están disponibles líneas reporteras para muchas otras proteínas fluorescentes, como EYFP

(enhanced yellow fluorescent protein) y ECFP (enhanced cyan fluorescent protein). Entre estas, tdTomato destaca como una de las proteínas fluorescentes más brillantes, lo que la hace ideal tanto para rastrear un número reducido de células marcadas dentro de un tejido como para realizar análisis mediante epifluorescencia.



**Figura 5: Recombinación sitio-específica mediante el sistema Cre-loxP.** La enzima recombinasa Cre se expresa de manera constitutiva bajo el control de un promotor específico de un tipo celular de interés. En estas células, Cre puede recombinar los sitios loxP flanqueando un sitio de STOP de transcripción, ubicado aguas arriba de un gen reportero. Tras la recombinación, el sitio STOP se elimina, permitiendo que el promotor específico active la expresión del gen reportero (Modificado de Kretzschmar y Watt, 2012).

El control temporal y espacial de la actividad de Cre puede lograrse mediante recombinación inducible, utilizando un sistema CreER. En este sistema, la recombinasa Cre está fusionada al receptor de estrógeno humano (ER). En ausencia de ligandos como tamoxifeno o 4-OHT, CreER permanece inactiva en el citoplasma. Sin embargo, al administrar el ligando, CreER se activa, permitiendo su translocación al núcleo y la recombinación de los sitios loxP.

Para evitar la activación de CreER por 17 $\beta$ -estradiol endógeno, se desarrollaron mutantes específicos. Entre ellos, la versión mejorada, CreERT2, permite su activación con bajas dosis de tamoxifeno, reduciendo tanto la toxicidad como la activación basal.

***Wnt1*<sup>Cre</sup>**. Esta cepa de ratones expresa la recombinasa Cre bajo el control del promotor Wnt1, específico de células de la cresta neural. Wnt1 desempeña funciones esenciales durante el desarrollo embrionario, incluyendo la formación del límite entre las regiones cerebro medio y posterior, la regulación del tamaño del cerebro medio y la generación de neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio ventral. Nuestros estudios recientes indican que, en la médula ósea de los ratones *Wnt1*<sup>Cre</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup>, la proteína reportera tdTomato se expresa tanto en células de la glía periférica, como en células estromales perisinusoidales y periarteriolares (Sierra et al., 2020). Sin embargo, utilizando otras líneas de ratones doble-transgénicos (*Sox10*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>EYFP</sup>), pudimos concluir que las poblaciones de células estromales Tom<sup>+</sup> no derivan de la cresta neural. En ese mismo trabajo, observamos que las células estromales perisinusoidales se movilizan hacia la sangre periférica tras lesiones hepáticas y contribuyen a la regeneración hepática originando ELCs y HLCs.

***GLAST*<sup>CreERT2</sup>**. Esta cepa es inducible y requiere la administración de tamoxifeno para que se produzca la recombinación y se exprese el gen reportero. Esto permite identificar las células que expresan GLAST durante una ventana temporal específica. GLAST se expresa en astrocitos y en algunas subpoblaciones de células progenitoras. En la misma publicación, demostramos que se expresa también en los BMSPs Tom<sup>+</sup> presentes en los ratones *Wnt1*<sup>Cre</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (Sierra et al., 2020). *In vivo*, inyectando tamoxifeno a día postnatal 2, este modelo permite trazar la misma proporción relativa de ELCs Tom<sup>+</sup> y HLCs Tom<sup>+</sup> que pueden observarse en el hígado de ratones *Wnt1*<sup>Cre</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> después de una lesión inducida por tioacetamida durante 8 semanas. Interesantemente, Dezawa et al. mostraron evidencias de que MSCs de rata o humanas expresan GLAST cuando son transfectadas para expresar exógenamente el dominio intracelular de Notch (Dezawa et al., 2004). En ese trabajo se reporta que esas células pudieron adquirir un fenotipo neuronal y mejoraron el comportamiento motor en un modelo de enfermedad de Parkinson.

## 1.7. Oligonucleótido IMT504

Los oligodeoxinucleótidos inmunomoduladores (ODNs) son moléculas sintéticas diseñadas para estimular diferentes componentes del sistema inmune en

vertebrados, como las células dendríticas plasmocitoides (PDCs), células B, células asesinas naturales (NK) y células T asesinas naturales (NKT) (Horner & Raz, 2002; Klinman, 2004; Klinman et al., 2004). Estas moléculas inducen activación, proliferación y secreción de inmunoglobulinas.

Los ODNs se clasifican en CpG y no-CpG. Los ODNs CpG se caracterizan por la presencia de al menos un dinucleótido CpG no metilado en su sitio activo, lo que permite su interacción con el receptor Toll-like 9 (TLR9). Esta interacción activa vías de señalización clave, como NF-κB e IRF7, y promueve la secreción de IFN-α por las PDCs (Murad & Clay, 2009).

Por otro lado, En cambio, los ODNs no-CpG contienen sitios activos con la secuencia PyNTTTGT (donde Py es citosina o timina, y N puede ser adenina, timina, citosina o guanina). Estos ODNs destacan por su capacidad para inducir la producción de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en colaboración con IL-26, además de estimular células madre mesenquimales (MSCs) (Rodriguez et al., 2015).

IMT504 es el prototipo de los oligodeoxinucleótidos inmunomoduladores no-CpG (5'-TCATCATTGTCATTGTCATT-3'). Este ODN ha mostrado un amplio rango de efectos terapéuticos en diversos modelos patológicos. Su uso ha demostrado efectos significativos en modelos de dolor inflamatorio y neuropático.

En el caso del dolor inflamatorio, la administración sistémica de IMT504 revirtió rápidamente el dolor crónico inducido por adyuvante completo de Freund, modulando el microambiente inflamatorio local y reduciendo la presencia de mediadores proinflamatorios (Leiguarda et al., 2020).

En modelos de dolor neuropático, una dosis única subcutánea de IMT504 promovió la movilización de células madre mesenquimales (MSCs) hacia los nervios lesionados, reduciendo los comportamientos asociados al dolor (Casadei et al., 2021, 2024).

Además, cuando se administra de forma preventiva, IMT504 modula la respuesta inflamatoria, reduce significativamente el dolor postoperatorio y permite disminuir el uso de opioides en modelos de cirugía, mostrando su potencial como una alternativa analgésica eficaz (Rubione et al., 2023).

Su capacidad para modificar en forma beneficiosa tanto el componente inflamatorio como el neuropático posiciona a IMT504 como un agente prometedor en el manejo de condiciones dolorosas complejas.

IMT504 ha mostrado también efectos positivos en modelos animales de diabetes tipo 1, mejorando la homeostasis de la glucosa y la función de las células beta pancreáticas (S. Bianchi et al., 2021; Converti et al., 2023). En ratones NOD, el tratamiento con IMT504 redujo la glucemia en ayunas, aumentó la insulinemia, mejoró la función de las células beta, incrementó el número de islotes y disminuyó la apoptosis, la insulitis y la infiltración de leucocitos CD45<sup>+</sup> en el páncreas (S. Bianchi et al., 2021).

Además, se observó una mejora en el metabolismo de la glucosa a largo plazo, incluso después de suspender el tratamiento, y un aumento en la supervivencia (S. Bianchi et al., 2021). En modelos de diabetes inducida por estreptozocina en ratones BALB/c, IMT504 promovió la recuperación de las células beta, redujo la infiltración leucocitaria, aumentó la proliferación de las células beta y disminuyó su apoptosis (M. S. Bianchi et al., 2010).

También se observó una mayor expresión de marcadores de células progenitoras, como nestina y neurogenina 3, sugiriendo una posible regeneración de células beta (M. S. Bianchi et al., 2010). En conjunto, estos hallazgos sugieren que IMT504 tiene el potencial de mejorar el control glucémico y modular la respuesta inmunitaria, abriendo nuevas vías terapéuticas para la diabetes tipo 1.

En un estudio preclínico con ratas neutropénicas infectadas con *Pseudomonas aeruginosa*, la administración de IMT504 mejoró significativamente la supervivencia, incluso cuando el tratamiento se inició después del inicio de la fiebre y la infección sistémica. Este efecto se observó tanto en monoterapia como en combinación con antibióticos, sin pérdida de eficacia (Chahin et al., 2015). Se atribuye este efecto, en parte, a la capacidad del IMT504 de modular citocinas proinflamatorias, incluyendo una reducción en los niveles plasmáticos de interleucina-6 (IL-6), lo que sugiere una disminución de la respuesta inflamatoria excesiva característica de la sepsis (Chahin et al., 2015). Estos hallazgos posicionan al IMT504 como una opción terapéutica prometedora para infecciones bacterianas graves y sepsis en pacientes neutropénicos.

En la esclerosis múltiple, una enfermedad inflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central (Borda et al., 2023), el IMT504 ha mostrado efectos prometedores en un modelo experimental de desmielinización inducida por cuprizona. En este modelo, el ODN exacerbó inicialmente la respuesta inflamatoria, pero aceleró la transición hacia un estado antiinflamatorio (Mathieu et al., 2024). Además, redujo la microgliosis, particularmente la abundancia relativa de la microglía fagocítica, y promovió la expansión de células progenitoras oligodendrogliales, lo que se tradujo posteriormente en un aumento de oligodendrocitos maduros. Hallazgos similares se observaron con la inyección intracraneal de IMT504 y la inoculación intravenosa de linfocitos B tratados con IMT504, destacando su potencial terapéutico en la regulación de la neuroinflamación y la remielinización en enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple (Mathieu et al., 2024).

# **HIPOTESIS**

## 2. HIPOTESIS

- En ratón, el tratamiento con IMT504 inhibiría el desarrollo de la fibrosis hepática y aceleraría la regresión de la fibrosis hepática establecida. Este efecto terapéutico sería potente y se debería a la capacidad del IMT504 de modular las respuestas celulares y moleculares implicadas en el proceso de fibrosis, tales como la inflamación y la fibrogénesis.
- Independientemente, la administración del ODN favorecería una mayor contribución de las células progenitoras estromales de médula ósea GLAST<sup>+</sup> y Wnt1<sup>+</sup> (GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs), una subpoblación de BMSPs, con células tipo-endoteliales y con células tipo-hepatocitos, participando de esa forma en la regeneración hepática. Este efecto podría estar mediado por la inducción de la proliferación y de la movilización de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs hacia el hígado a través de la circulación sanguínea periférica.
- El IMT504 modularía el perfil de expresión de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, además de actuar directamente sobre las distintas poblaciones celulares involucradas en el proceso de fibrosis. En este contexto, el tratamiento con IMT504, o con los factores secretados por los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs pretratados con este compuesto, podría disminuir la activación de las HeSCs, cambiar el fenotipo de los macrófagos fibróticos, y estimular a los hepatocitos para incrementar la expresión de marcadores asociados con la regeneración y la funcionalidad hepática. En muestras de hígados cirróticos humanos, el tratamiento IMT504 podría producir efectos similares, reduciendo significativamente los niveles de expresión de marcadores fibrogénicos y proinflamatorios.
- Finalmente, en un modelo de hepatectomía parcial, el tratamiento con IMT504 incrementaría la tasa de regeneración hepática, en asociación con un aumento sostenido en la proliferación de hepatocitos. Además, aumentaría incidencia de células tipo-hepatocitos y de células tipo-endoteliales derivadas de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, lo que sugeriría una mayor contribución de esas células progenitoras con la regeneración hepática.

# **OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

El objetivo de esta tesis doctoral fue analizar y evaluar el efecto terapéutico del IMT504 en modelos experimentales de fibrosis y regeneración hepática. Asimismo, se investigó su impacto en las células progenitoras estromales de médula ósea GLAST<sup>+</sup> y Wnt1<sup>+</sup>, involucradas en la regeneración hepática y la respuesta a lesiones en el hígado. Este estudio buscó comprender cómo el IMT504 podría influir en estos procesos y evaluar su potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades hepáticas asociadas con fibrosis y dificultades en la regeneración del tejido hepático.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Para la verificación de las hipótesis propuestas, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Analizar el efecto terapéutico del IMT504 en modelos experimentales de fibrosis hepática en ratones, evaluando su capacidad para inhibir este proceso y acelerar la regresión de la fibrosis hepática establecida. Investigar cambios en los niveles de expresión de marcadores inflamatorios, de fibrosis y de regeneración hepatocitaria en el tejido hepático y en su fracción parenquimática.
- Evaluar el impacto del IMT504 sobre los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en ratones, con el objetivo de entender su papel en la reparación hepática.
- Investigar el efecto del ODN y de los medios condicionados de distintas fracciones de BMSPs, pretratadas o no con IMT504, sobre distintos tipos celulares presentes en el hígado con relevancia en un hígado fibrótico.
- Estudiar el efecto antifibrótico y de modulación de la inflamación del IMT504 sobre muestras obtenidas de hígado cirrótico humano.
- Analizar el efecto de IMT504 sobre la recuperación de la masa hepática en ratones sometidos a PHx, evaluando su posible impacto en la proliferación de hepatocitos y la mejora en la función hepática.

- Analizar el efecto de IMT504 sobre el papel que cumplen los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en el modelo de PHx.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Cepas de ratones utilizadas

Se utilizaron ratones *Wnt1<sup>Cre</sup>* (Jackson stock Nº 022501) y ratones *Rosa26<sup>td-Tomato</sup>* (*Rosa26<sup>Tom</sup>*; Jackson stock Nº 007909), en fondo genético C57. Además, se emplearon animales *GLAST<sup>CreERT2</sup>* (Mori et al., 2006) y *Rosa26<sup>Tom</sup>* (Jackson stock Nº 007908) que habían sido previamente cruzados con ratones CD1 exocriados durante más de 20 generaciones por el Dr. Guillermo Lanuza (Fundación Instituto Leloir). Se establecieron colonias de estos ratones en el bioterio del IIMT CONICET-Universidad Austral para la realización de los estudios. Todo el trabajo ha sido reportado en línea con las guías ARRIVE 2.0 y aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IIMT (CICUAL), #2019-03, 2021-06, 2022-09.

### 4.2. Cruzamientos y uso de tamoxifeno

El sistema de recombinación Cre-loxP se utiliza para lograr expresión génica condicional y trazar linajes celulares. Esto requiere cruzar dos líneas de ratones: una que expresa la enzima Cre bajo un promotor específico, garantizando la especificidad celular, y otra línea reportera (como *Rosa26<sup>Tom</sup>*) que contiene un gen flanqueado por dos sitios loxP. Los sitios lox P son pequeñas secuencias de 34 pares de bases diseñadas en la cepa reportera para estar ubicadas a ambos lados de una señal de *STOP* en la transcripción. La enzima recombinasa Cre corta los sitios loxP, eliminando la señal de *STOP* y permitiendo la expresión constitutiva del gen reportero bajo un promotor ubicuo, como es Rosa. Así, el gen reportero (por ejemplo, *tdTomato* o *Tom*) se expresa solo en las células donde se activa el promotor que está río arriba del gen que codifica para la proteína Cre, lo que permite analizar la expresión génica en tipos celulares específicos y rastrear su linaje (**Figura 6**). Este sistema es ampliamente utilizado por su precisión en estudios genéticos y celulares.

En nuestro laboratorio, hemos realizado los siguientes cruzamientos para producir animales doble transgénicos: *Wnt1<sup>Cre</sup>* x *Rosa26<sup>Tom</sup>* y *GLAST<sup>CreERT2</sup>* x *Rosa26<sup>Tom</sup>*. Estos apareamientos se llevaron a cabo utilizando ratones portadores del promotor específico en heterocigosis, para evitar

recombinaciones aberrantes, y ratones con el gen reportero en homocigosis. Este diseño permitió obtener una proporción esperada del 50% de animales doble transgénicos. Los animales que no presentaron ambos genes transgénicos, lo que fue confirmado mediante ensayos de PCR tradicional, se utilizaron para los estudios que no requirieron de análisis de trazado del linaje de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, en los modelos de fibrogénesis o regeneración hepática.

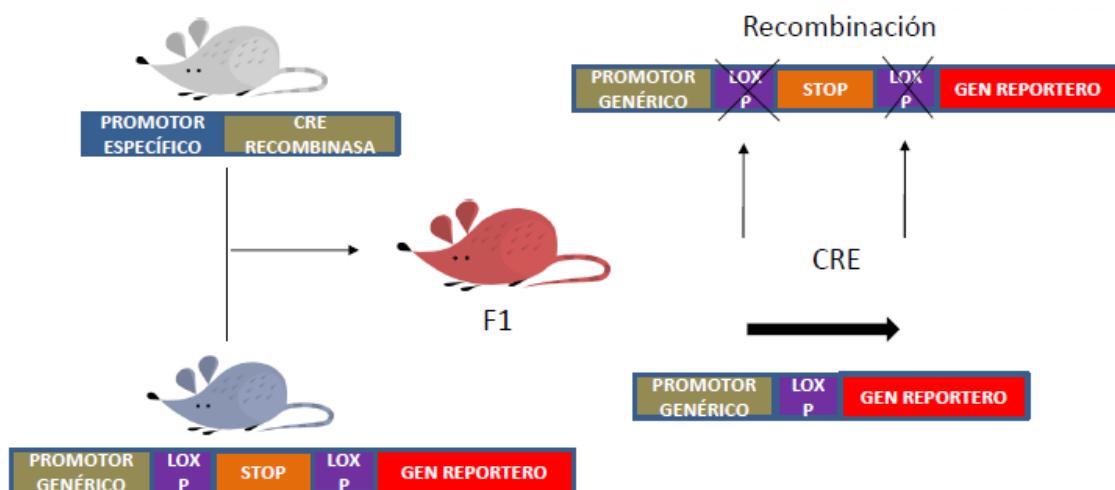
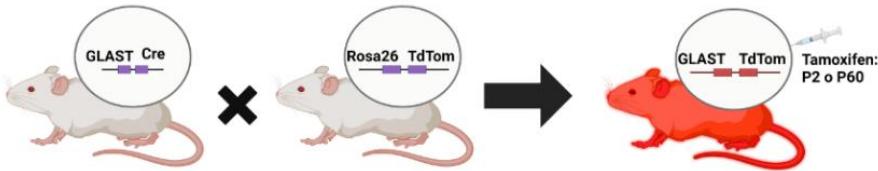


Figura 6: Esquema de la estrategia empleada para el trazado de linajes celulares con ratones doble transgénicos.

La actividad de la recombinasa Cre puede ser regulada mediante la generación de constructos químéricos del gen que codifica para Cre con el de un receptor de estrógenos (ERT2), lo que da lugar a un modelo condicional e **inducible**. Para lograr esto, se utilizan ratones en los que la recombinación se activa tras la administración de tamoxifeno, el cual es reconocido a nivel celular por el receptor específico ERT2, permitiendo así un control temporal preciso de la recombinación. Los ratones GLAST<sup>CreERT2</sup>; Rosa26<sup>Tom</sup> fueron inyectados por vía subcutánea con tamoxifeno (Tx; Sigma-Aldrich; T-5648; 20 mg/mL en aceite de maíz; 50 µl/animal) a días posnatales 2 (P2) o 60 (P60) (Figura 7).



**Figura 7. Vista esquemática de la derivación de los ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>;*Rosa26*<sup>Tom</sup>.** Para los experimentos de trazado de linaje se ha utilizado la progenie del cruce de animales heterocigotas para el transgén *GLAST*<sup>CreERT2</sup> (preferentemente machos) con animales homocigotas para el transgén *Rosa26*<sup>Tom</sup>. Para inducir la expresión en los animales que portan ambos transgenes se inyectó tamoxifeno a P2 o P60.

#### 4.3. Genotipificación

Los ratones fueron identificados mediante marcas en la oreja al momento del destete, y se tomaron muestras de la cola para su genotipificación. El material obtenido fue digerido siguiendo el protocolo con proteinasa K (Invitrogen, N°25530031, 1 mg/mL), y para detectar la presencia o ausencia del transgén, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando primers específicos. Los primers utilizados fueron: Rosa26, forward: 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3' y reverse: 5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'; Tom, forward: 5'-GGACGGCACGCTGATCTA-3' y reverse: 5'-CTGTTCCACGATGCTGTAGT-3'; Wnt1<sup>Cre2</sup>, forward: 5'-ATTCTCCCACCGTCAGTACG-3' y reverse: 5'-CGTTTCTGGAGCATACCTGCA-3', y Cre (genérico, utilizado para *GLAST*<sup>CreERT2</sup>), forward: 5'-GCGGTCTGGC AGTAAAAACTATC-3' y reverse: 5'-TAATCGCCATCTTCCAGCAG-3'. Para llevar a cabo la amplificación del ADN, se preparó la MasterMix correspondiente, con el volumen calculado según la cantidad de animales a genotipificar. La composición de la MasterMix fue la siguiente: primers forward y reverse 10 µM, dNTPs 2,5 mM, Taq polimerasa (TAQ Pegasus, Productos Bio-Lógicos EA01), buffer 10X (Productos Bio-Lógicos EA01) y agua Milli-Q. Se agregó 2 µL de la muestra a la MasterMix y se ajustó el volumen final a 18 µL.

La amplificación se realizó en una termocicladora SimpliAmpTM Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) bajo las siguientes condiciones: 95°C durante 3 minutos; 35 ciclos de: 95°C durante 30 segundos, temperatura específica de annealing para los primers utilizados, 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; 72°C por 5 minutos y se mantuvo a una temperatura final de 4°C. Luego, se sembró

cada muestra junto a un control negativo (sin muestra) y un control positivo (muestra positiva para el gen buscado) en un gel de agarosa al 1%. El gel fue preparado con buffer TAE y 1% de agarosa, y se le añadieron 5 µL de Bromuro de Etido (Bromuro de 2,7- diamino-10-etil-6-fenilfenantridinio). Se realizó la electroforesis en una cuba por 1 hora a 110V y, posteriormente, se procedió al revelado en un transiluminador ultravioleta.

#### **4.4. Producción, conservación y aplicación del IMT504**

El oligodesoxinucleótido IMT504 con esqueleto fosforotioato fue adquirido de Biosynthesis (Lewisville, TX), purificado mediante cromatografía liquida de alta eficacia y analizado mediante MALDI. El IMT504 liofilizado fue diluido en agua despirogenada (concentración madre de 20 mg/mL), analizado para la contaminación de lipopolisacáridos y mantenido a -20 °C hasta su uso. La secuencia del ODN es 5' TCATCATTGTCATTTGTCATT 3'.

Para los experimentos *in vivo*, este ODN fue administrado por vía subcutánea a una dosis de 6 mg/kg de peso corporal por animal, a partir de una solución preparada previamente con una concentración de 0,4 mg/mL (Hernando Insúa et al., 2007). Mientras que para experimentos *in vitro*, se utilizó una concentración de 0,5 µg/ml (Casadei et al., 2021).

#### **4.5. Experimentos *in vivo***

**Modelos de fibrosis:** Se establecieron dos modelos de fibrosis hepática. En el **modelo de TAA**, se utilizó el hepatotóxico tioacetamida en animales *GLAST*<sup>CreERT2</sup>;Rosa26<sup>Tom</sup> (dos meses de edad) tratados con tamoxifeno (Tx) a los días P2 y P60 para el trazado de linaje celular, durante 2 u 8 semanas (inyección intraperitoneal, 0,2 mg/g peso corporal; tres veces por semana). Los animales fueron distribuidos en diferentes cajas según el sexo. Para los estudios histológicos, varios animales fueron administrados por vía subcutánea con IMT504 (0,4 mg/ml; 6 mg/kg/animal) 4 horas después de la sexta dosis de TAA. Otros recibieron 3 dosis de IMT504: 4 horas después de la sexta, duodécima y decimoctava dosis de TAA (**Figura 8A**). Se incluyeron animales CD1 (hermanos de camada de los ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>;Rosa26<sup>Tom</sup>, que carecieron de al menos un transgén) tratados con TAA durante 2 u 8 semanas, con la consiguiente

administración de IMT504 (4 horas después de la última dosis de TAA). En estos experimentos también se incluyeron las condiciones control (vehículo) y naïve (con y sin IMT504), que se utilizaron para qPCR.

Para los experimentos de regresión en la fibrosis hepática, se trataron animales CD1 con TAA durante 8 semanas. Algunos de estos animales recibieron una dosis de IMT504 o vehículo 4 horas después de la decimoctava dosis de TAA. Posteriormente, se suspendió la administración de TAA, y los animales fueron analizados 10 semanas después del inicio del experimento (**Figura 7A**).

En el **modelo de ligadura de colédoco** (BDL) se utilizaron animales CD1 de la misma edad. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano, introduciéndolos en una cámara de inducción con una concentración de anestésico entre el 3-5% hasta alcanzar una anestesia profunda. Posteriormente, fueron transferidos a una mesa quirúrgica y colocados con una máscara de inhalación del agente anestésico para mantener la sedación durante todo el procedimiento, ajustando la concentración de isoflurano a aproximadamente 2,5-3,5% para garantizar estabilidad anestésica y seguridad, sin deprimir excesivamente la respiración. Una vez en posición supina sobre una almohadilla térmica, se desinfectó el área abdominal y se realizó una incisión en la línea media para acceder al hígado. La cavidad fue ampliada fijando una sutura en el esternón y empleando un separador mariposa en los márgenes de la cavidad peritoneal. Se desplazó cuidadosamente el intestino para exponer el conducto biliar, el cual fue separado de la vena porta y la arteria hepática utilizando pinzas micro-serradas. Se colocó una sutura 5-0 alrededor del conducto biliar, asegurando la obstrucción con dos nudos quirúrgicos y aplicando fuerza controlada para evitar daños al conducto. Luego, se añadió una segunda ligadura en la parte craneal sin cortar el conducto entre ambas, para prevenir fugas biliares y peritonitis. Los extremos de las suturas fueron recortados, el esternón bajado y el separador retirado. Posteriormente, se enjuagó la cavidad peritoneal con solución salina y los órganos abdominales fueron reubicados en su posición original. Finalmente, se cerraron el peritoneo y la piel, junto con la fascia, utilizando suturas continuas de 6-0 Mersilk. La incisión fue desinfectada con una gasa humedecida en solución antiséptica (Tag et al., 2015), y los animales fueron trasladados a una jaula limpia con almohadilla térmica para su recuperación, monitoreándolos hasta que

recuperaron el estado de alerta. Los animales fueron distribuidos en diferentes cajas según su sexo. Un grupo de animales recibió tratamiento con IMT504, mientras que otro fue administrado con vehículo (solución salina) cinco días después de la cirugía. Estos animales fueron posteriormente utilizados para estudios histológicos (**Figura 11A**).

Para los **análisis de qPCR**, los animales fueron anestesiados, y sus hígados fueron perfundidos utilizando un buffer de lavado (1:25 PBC y EDTA 0,4 mM en agua destilada), seguido de colagenasa (C5138, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, los hígados fueron disgregados mecánicamente y filtrados a través de mallas de 40  $\mu$ m. De la suspensión obtenida, se tomaron 200  $\mu$ L que fueron resuspendidos en Trizol Reagent (SigmaAldrich Co). Para obtener una suspensión enriquecida en hepatocitos (fracción parenquimática), el homogenato fue dejado en decantación por 30 minutos y sometido a dos ciclos de centrifugación (5 minutos, 1000 RPM). De la fracción parenquimática resultante, se tomaron 200  $\mu$ L que también fueron resuspendidos en Trizol Reagent. El volumen restante de esta fracción fue sembrado en placas *multiwell* P6 para el establecimiento de cultivos primarios de hepatocitos ( $2 \times 10^5$  células/pocillo en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Para aislar las células de Kupffer, la suspensión inicial de hígado total fue centrifugada a 50 x g durante 3 minutos a 4 °C, separando así la fracción no parenquimática presente en el sobrenadante. Este sobrenadante fue resuspendido en 2 mL de medio RPMI y sometido a un gradiente químico con Histodenz (Sigma-Aldrich; 30% en PBS) mediante centrifugación a 1500 x g durante 20 minutos a 4 °C sin freno. La interfase resultante entre las capas del gradiente, rica en células de Kupffer, fue recolectada. Tras un lavado con medio RPMI, el pellet fue resuspendido en 3 mL de medio DMEM con 10% de SFB. Estas células fueron sembradas en placas P12 a una densidad de  $2,5 \times 10^6$  células/pocillo en 500  $\mu$ L de medio RPMI con 10% de SFB y se incubaron durante 40 minutos. Las células adheridas al fondo de las placas al finalizar este período fueron identificadas como macrófagos.

**Modelo de hepatectomía parcial:** Se utilizaron animales *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (de dos meses de edad) tratados con Tx a P60 para identificar células

derivadas de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, y sus hermanos de camada, sin los transgenes, fueron utilizados para estimar la tasa de regeneración hepática y los mecanismos involucrados. Los ratones fueron anestesiados, y se realizó una incisión abdominal con expansión de la cavidad peritoneal, siguiendo el protocolo descrito para el modelo de BDL. Se identificaron los lóbulos izquierdos y mediales, y sus vasos fueron cuidadosamente ligados para evitar el sangrado (Mitchell & Willenbring, 2008). Posteriormente, se llevó a cabo la resección de estos lóbulos. Se inspeccionó la cavidad abdominal, se irrigó con solución salina estéril para mantener la hidratación de los tejidos y se cerró siguiendo las mismas técnicas postoperatorias empleadas en el modelo de colestasis, para garantizar la correcta recuperación de los animales.

Fueron realizados dos esquemas de inyección de IMT504 (0,4 mg/ml; 6 mg/kg/animal). Los animales *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> recibieron estas inyecciones cinco días después de la cirugía y fueron sacrificados cinco días más tarde. Se recolectaron médula ósea, sangre e hígado para su análisis mediante citometría de flujo e histología. Los ratones sin los transgenes fueron inyectados un día antes o un día después de la cirugía de hepatectomía. Esos animales fueron sacrificados en los días 2, 4, 6 y 10 post-cirugía. Las muestras de hígado recolectadas fueron analizadas por morfometría (pesado de la masa hepática), expresión génica por qPCR e histología (**Figura 23A**). La tasa de regeneración hepática se evaluó mediante la determinación de dos parámetros principales: el peso y el índice mitótico. La restitución del peso hepático se calculó como el porcentaje de la masa hepática regenerada en relación con el peso total esperado. La tasa de regeneración hepática (LRR, por sus siglas en inglés) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{LRR} = (C - (A - B)) / C \times 100$$

donde A es el peso total estimado del hígado al momento de la resección, B es el peso del hígado extirpado, y C es el peso del hígado regenerado al momento del sacrificio (Murata et al., 2007). Para cada tiempo de sobrevida, se calculó el porcentaje de recuperación hepática en función del peso total estimado del hígado al día 0, asumiendo que el tejido resecado correspondía al 60% de la masa hepática inicial. Este porcentaje se determinó dividiendo el peso del hígado

registrado el día del sacrificio por el peso total estimado del hígado antes de la cirugía.

El índice mitótico fue calculado utilizando secciones histológicas de hígado teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). Este índice se expresó como el porcentaje de hepatocitos en mitosis respecto al total de hepatocitos. Se analizaron para ello diez campos a 400x por sección.

#### **4.6. Experimentos *in vitro***

**Cultivos de células progenitoras estromales de médula ósea (BMSPs):** Se utilizaron ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>;*Rosa26*<sup>Tom</sup> (TxP2) o *Wnt1*<sup>Cre</sup>;*Rosa26*<sup>Tom</sup>, los cuales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Posteriormente, se disecaron los fémures y las tibias, extrayendo la médula ósea con medio DMEM bajo en glucosa suplementado con 10% SFB (Gibco). La suspensión celular obtenida fue sembrada en placas de Petri de 145 mm (Greiner Bio-One), a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Las células se mantuvieron en el mismo medio de cultivo, realizando cambios cada 72 horas hasta alcanzar una confluencia del 90%. Las colonias de células Tom<sup>+</sup> fueron identificadas mediante microscopía de fluorescencia (Nikon Eclypse NiE, Melville, NY, USA). Los límites de estas colonias fueron demarcados en la base de las placas con fibrón. Posteriormente, se procedió a tripsinizarlas (0,25% tripsina con 1mM EDTA), levantarlas, disociarlas y resembrarlas a una densidad de  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> con el mismo medio de cultivo. Este procedimiento se repitió durante los primeros tres pasajes, permitiendo obtener cultivos enriquecidos en GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs y otros formados por células Tom<sup>-</sup>. Tanto en los cultivos de células Tom<sup>+</sup> como en los Tom<sup>-</sup>, se continuaron los ciclos de tripsinización y resembrado cuando las células alcanzaron una confluencia de 80-90%, realizando estos pasajes hasta el pasaje 8 (P8). Este procedimiento permitió obtener poblaciones enriquecidas en GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs y en BMSPs Tom<sup>-</sup>, útiles para estudios posteriores.

**Preparación de medio condicionado (MC) de los cultivos de BMSPs:** Para obtener el MC de las células Tom<sup>+</sup> y Tom<sup>-</sup>, se sembraron  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de Petri de 96mm. Al día siguiente, los cultivos se mantuvieron en medio sin suero toda la noche. Luego, se los trató con IMT504 o vehículo durante 2

horas, seguido de un lavado con solución fisiológica y una incubación adicional de 22 horas con la mitad del volumen del medio sin suero. El sobrenadante generado fue recolectado, centrifugado para eliminar restos celulares, alicuotado y almacenado a -80 °C hasta su uso.

**Macrófagos fibróticos:** Los macrófagos fueron aislados a partir de ratones CD1 previamente tratados con TAA durante 6 semanas, siguiendo el procedimiento descrito previamente a partir de la fracción no parenquimática. Las células aisladas fueron incubadas durante 24 horas, consistiendo en 2 horas de estimulación con IMT504 (o su omisión) seguidas de 22 horas con RPMI+2%SFB. Las condiciones experimentales fueron: RPMI+2%SFB (control), RPMI+2%SFB+IMT504 (0,5 µg/ml) o una mezcla 50 % v/v del medio condicionado obtenido de las células Tom<sup>+</sup> y Tom<sup>-</sup>, pretratadas o no con IMT504. A finalizar el período de incubación, las células fueron recolectadas para medir la expresión de distintos genes mediante qPCR.

**Hepatocitos:** Los hepatocitos fueron obtenidos de la fracción parenquimática de ratones CD1 sanos, según fue descrito previamente. A las 24 horas de haber sembrado las células en DMEM/F12+10% SFB, los cultivos se sometieron a 24 horas de incubación bajo las siguientes condiciones experimentales: DMEM/F12+2%SFB (control), DMEM/F12+2%SFB+IMT504 (la incubación con IMT504 por 2 horas, seguida de 22 horas en DMEM/F12+2%SFB), o una mezcla 50 % v/v del MC obtenido de las células Tom<sup>+</sup> o Tom<sup>-</sup> pretratadas o no con IMT504 (según lo descrito previamente). Al finalizar el período de incubación, las células fueron recolectadas para medir la expresión de distintos genes mediante qPCR.

**Células de Ito:** La línea celular CFSC-2G de HeSCs, originalmente obtenida de hígados cirróticos de rata, fue amablemente proporcionada por el Dr. Marcos Rojkind (Albert Einstein College of Medicine, New York, NY, USA). Las células fueron cultivadas en aMEM suplementado con 10% SFB y sin aminoácidos esenciales. Para explorar el efecto de IMT504, las células fueron incubadas en las siguientes condiciones: aMEM+2%SFB (control); aMEM+2%SFB+IMT504 (2 horas de incubación seguidas de 22 horas de recuperación), o una mezcla 50 % v/v del medio condicionado obtenido de las células Tom<sup>+</sup> y Tom<sup>-</sup>, pretratadas o no con IMT504 (según lo descrito previamente). Al finalizar el período de

incubación, las células fueron recolectadas para medir la expresión de distintos genes mediante qPCR.

#### **4.7. Ensayos de proliferación y citometría de flujo**

Los BMSPs Tom<sup>+</sup> y Tom<sup>-</sup> a P8 fueron sembrados en placas de Petri de 96 mm y, al alcanzar una confluencia del 80%, fueron sometidos o no a un pretratamiento de 2 horas con IMT504 (0,5 µg/mL). Algunas células fueron incubadas con CHIR (9 µM), conocido por inducir la señalización de Wnt y la translocación nuclear de β-catenina (Gomez et al., 2019), Dkk1 (200 ng/mL; R&D; antagonista de Wnt), o una combinación de IMT504 y Dkk1, o IMT504 y IWR1(10 µM; Sigma-Aldrich; inhibidor de Wnt1) (Gomez et al., 2019; Martins-Neves et al., 2018).

Después del pretratamiento, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM baja glucosa para eliminar el IMT504 y/o los factores que activan o inhiben la señalización de Wnt. Tras 4 horas de incubación, las células de todas las condiciones fueron despegadas y fijadas con paraformaldehído 4% para ser analizadas por citometría de flujo usando el marcador Ki67, de células en ciclo celular (Soares et al., 2010).

Las células fueron lavadas tres veces con buffer FACS (1xPBS-1% BSA) mediante centrifugación (5 minutos a 1000 RPM) y luego fueron resuspendidas. A continuación, las células fueron transferidas a tubos de citometría de flujo (10<sup>6</sup> células por tubo) y se incubaron durante 45 minutos con el anticuerpo primario no conjugado anti-Ki67 (1/100; abcam ab15580) en buffer FACS con 0,1% de saponina. Después de 2 rondas de lavados con buffer FACS, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor 488®- o AlexaFluor 594®- (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a una concentración de 1/100 en FACS buffer y 0,1% saponina durante 45 minutos. Tras dos lavados adicionales con buffer FACS, las células fueron fijadas con paraformaldehído y mantenidas en 200 µL de PBS 1x hasta el análisis por citometría de flujo.

Otros marcadores utilizados en la citometría de flujo fueron: anti-Albumin (Santa Cruz Biotechnology; sc-374670), anti-CD31 (BD Pharmingen; 553370), anti-

CD44-APC (BD Pharmingen; 559250), anti-CD133 (Abcam; ab19898) y anti-Ep-CAM (Santa Cruz Biotechnology; sc-23788).

Las muestras de sangre periférica fueron incubadas durante 5 minutos en buffer lisis ACK ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 0,15 M,  $\text{KHCO}_3$  a 0,1M y EDTA a 0,001 M) y fijadas en paraformaldehído antes de la marcación. Las muestras de hígado fueron perfundidas o incubadas en colagenasa (según el modelo murino analizado), separadas en fracción parenquimática y no parenquimática, y luego se continuó con la marcación.

Fueron incluidos en los análisis controles de autofluorescencia y de monomarca pertinentes. Los análisis fueron realizados en el equipo Becton–Dickinson FACSaria Fusion (servicio brindado por Fundación Instituto Leloir) y los datos fueron procesados con el software FlowJo v10.0.8 (FlowJo, Ashland, OR, USA).

#### **4.8. Ensayo de motilidad celular en cámara de Boyden**

En este ensayo se utilizó una cámara de microquimiotaxis de 48 pocillos tipo Boyden (Neuro Probe; Cabin John, MD). Se emplearon BMSPs Tom<sup>+</sup> o Tom<sup>-</sup> a P8, que fueron pretratados durante 2 horas con IMT504 (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o con vehículo. Después de 4 horas en medio sin tratamiento, las células fueron sembradas en la cámara superior de la placa de migración a una densidad de  $1,2 \times 10^3$  células por pocillo.

En la cámara inferior, se colocaron 26  $\mu\text{L}$  de DMEM bajo en glucosa o medio condicionado obtenido de células LX2 (línea celular de estrelladas hepáticas humanas). Las células migraron desde la cámara superior hacia la cámara inferior a través de una membrana con poros de 8  $\mu\text{m}$  durante un período de 4 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, la membrana fue fijada con paraformaldehído 4%, y las células que migraron hasta la superficie inferior de la membrana fueron teñidas con DAPI (1 mg/ml). Se tomaron tres fotografías por cada réplica utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss LSM700, y luego se contó el número total de células migradas.

#### **4.9. Incubación de BMSPs GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> con MC de hígado hepatectomizado**

Cultivos semiconfluentes a P8 enriquecidos en GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs fueron incubados con MC de hígado hepatectomizado, diluido en concentraciones de 1/2, 1/4 o 1/8, o con medio estándar compuesto por 2% SFB (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) y 0,2% de penicilina-estreptomicina (Gibco; 15070063) en DMEM bajo en glucosa (Elessar Científica) durante 7 días. El medio se reemplazó cada 36 horas.

Para la preparación de MC, tres ratones adultos CD1 fueron hepatectomizados y sacrificados 3 días después. El hígado se disecó y se cortó en piezas de 4 x 4 x 4 mm. Se seleccionaron tres piezas de cada lóbulo, excluyendo las regiones necróticas, y se incubaron durante la noche en placas de 6 pocillos con 1 mL de DMEM bajo en glucosa sin suero, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se recogió y centrifugó a 2500 RPM durante 5 minutos, y el sobrenadante se alicuotó en tubos de 1,5 mL.

#### **4.10. Estudios ex vivo de muestras de hígado humanas**

Se utilizaron explantos obtenidos a partir de una muestra de hígado cirrótico, a través de una colaboración con el servicio de Hepatología del Hospital Universitario Austral, en el marco de un proyecto aprobado por el Comité Institucional de Evaluación (P24-050). Una vez recibidas las muestras se relevaron los datos del paciente (número de la historia clínica y formulario de consentimiento informado), los cuales fueron guardados en forma segura en un archivo online bajo clave. Bajo flujo laminar, se obtuvieron fragmentos de hígado de 4 x 4 x 4 mm, los que fueron tratados con IMT504 (0,5 µg/mL) durante 2 horas o se dejaron sin tratamiento. Después de este período, los fragmentos hepáticos se incubaron en medio de reposo (DMEM baja glucosa, 2 mM de L-glutamina y 0,2% de penicilina-estreptomicina) durante 4 o 44 horas. Al finalizar las 6 o 46 horas totales de tratamiento, los fragmentos se conservaron en TRIzol (Invitrogen) y se procesaron para analizar la expresión diferencial de genes profibrogénicos (*TGFB1* y *ACTA2*) y proinflamatorios (*IL-6*) mediante qPCR.

#### 4.11. Histología y análisis de la fibrosis hepática

Los hígados recolectados se sumergieron en formalina al 10% preparada en tampón fosfato. Los tejidos fijados se procesaron siguiendo un protocolo de dos días: en el primer día se realizó la deshidratación de los tejidos, y el segundo se formaron los bloques en parafina. Posteriormente, los bloques se cortaron en secciones de 8  $\mu\text{m}$ , que se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) o rojo sirio, o se emplearon en análisis inmunohistoquímicos para evaluar la expresión de  $\alpha$ -SMA y PCNA.

El contenido de colágeno se cuantificó mediante análisis de morfometría computarizada en muestras teñidas con rojo sirio. Las imágenes digitales se obtuvieron con un microscopio de campo claro Leica ICC50 E a un aumento de 200X, excluyendo grandes venas centrolobulillares y tractos portales principales. Posteriormente, estas imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EE. UU.), y los resultados se expresaron como el porcentaje de área positiva.

Para el análisis inmunohistoquímico cromogénico y la cuantificación de la expresión de  $\alpha$ -SMA y PCNA, las secciones se desparafinaron, rehidrataron y sometieron a recuperación antigénica mediante calentamiento en tampón de citrato (pH=6) utilizando un protocolo de microondas. La peroxidasa endógena se bloqueó con una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% en etanol al 95%. Posteriormente, las secciones se trataron para bloquear la biotina y la avidina endógenas utilizando un kit de bloqueo (Vector Laboratories Inc.) y se incubaron con una solución de 1% de BSA en 1% PBS para prevenir la unión inespecífica del anticuerpo primario.

Las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios anti- $\alpha$ -SMA (1:100; Abcam, ab5694) o anti-PCNA (1:100; Santa Cruz Biotechnology, sc-56). Tras lavados extensivos, se incubaron con anticuerpos secundarios biotinilados conjugados con peroxidasa durante 2 horas, seguidos de una nueva incubación adicional con un complejo avidina-biotina (AB) a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se lavaron dos veces con PBS y dos veces con tampón de acetato 0.1 M antes de incubarlas con una solución de 3,3-diaminobenzidina (DAB; Sigma), sulfato de níquel amónico y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hasta obtener

la señal específica deseada. En los controles negativos, donde se omitió la incubación con el anticuerpo primario, sólo se observó una tinción débil (datos no mostrados).

La cuantificación de la expresión de  $\alpha$ -SMA se realizó mediante morfometría computarizada, mientras que la cuantificación de PCNA se llevó a cabo contando los núcleos positivos en las imágenes obtenidas, por dos observadores independientes. Para cada espécimen, se capturaron y analizaron aproximadamente 80 imágenes de microscopio de luz (200X) utilizando un sistema de detección de umbral de color desarrollado en el software ImageJ (NIH, EE. UU.). Los resultados se expresaron como porcentaje de área positiva.

#### **4.12. Perfusión de animales y preparación de muestras**

Estos procedimientos se emplearon para preservar los tejidos de manera rápida y uniforme, permitiendo su análisis histológico mediante microscopía. La principal ventaja de perfundir directamente el fijador directamente a través de la aorta ascendente radica en que el agente químico alcanza de forma eficiente y rápida los tejidos a nivel celular, logrando una distribución uniforme a través de la red de capilares sanguíneos.

Para llevar a cabo este proceso, los animales fueron anestesiados previamente con hidrato de cloral (2,2,2-tricloroetano-1,1-diol) preparado en fresco administrado por vía intraperitoneal a una dosis subletal de 400 mg/kg. Una vez bajo anestesia, se realizó una incisión en la cavidad torácica, cortando las costillas y el diafragma para exponer el corazón. Se insertó una aguja conectada a una tubuladura en el ventrículo izquierdo, mientras que simultáneamente se practicó una incisión en la aurícula derecha. A continuación, se activó una minibomba para realizar la perfusión, comenzando con PBS 1x (10 mL durante 5 minutos) y seguido por una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% (60 mL durante 30 minutos).

Tras finalizar la perfusión, el hígado se extrajo y se mantuvo en PFA al 4% durante 90 minutos antes de transferirse a dos soluciones consecutivas de sacarosa al 20% en tampón fosfato 0,2 M. Posteriormente, se disecaron los cuatro lóbulos hepáticos, que fueron incluidos en OCT (Optimal Cutting

Temperature compound) y almacenados a -20°C hasta su procesamiento en un criostato. Además, se obtuvieron muestras de hueso de las extremidades posteriores. Estas muestras, tras una postfijación en PFA al 4%, fueron desmineralizadas en una solución de EDTA al 10% en PBS 1x durante 10 días. Finalmente, se sometieron a pasos sucesivos de incubación en sacarosa al 20% y se incluyeron en OCT para su posterior análisis.

#### 4.13. Inmunofluorescencia

Las muestras de los cuatro lóbulos hepáticos (cuadrado, caudado, derecho e izquierdo) se procesaron para inmunomarcación utilizando protocolos previamente publicados (Aquino et al., 2006). Los anticuerpos primarios empleados fueron: anticuerpo monoclonal anti-albúmina de ratón (1/100; Santa Cruz Biotechnology sc-374670), anticuerpo monoclonal anti-alfa fetoproteína de ratón (1/200; R&D mab1368), anticuerpo monoclonal anti-alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA; 1/300; Sigma, clon 1A4), anticuerpo policlonal anti-alfa actina de músculo liso de conejo (1/200; abcam ab5694), anticuerpo monoclonal anti-CD31 de rata (1/200; BD Pharmingen 553370), y anticuerpo monoclonal anti-HNF4 $\alpha$  de ratón (1/100; Santa Cruz Biotechnology, sc-374229).

Para la detección de los anticuerpos primarios, se utilizaron anticuerpos secundarios producidos en burro, conjugados con fluoróforos Alexa-488, -555 y -647 (1:1000, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific), o con FITC y Rodamina (1:100, Jackson ImmunoResearch). Para la identificación de células endoteliales, las secciones criostáticas se incubaron durante la noche con lectina de *Lycopersicon esculentum* (tomate) conjugada con fluoresceína (Vector Laboratories, FL-1171; 1/400), en una solución que contenía BSA al 0,1%, NaN<sub>3</sub> 0,1% y Tritón 0,15% en PBS 1X, a 4°C.

Tras múltiples lavados, las secciones se tiñeron con Hoechst 33258 o DAPI durante 15 minutos, seguidos de lavados adicionales. Finalmente, se montaron con cubreobjetos en una solución de 80% de glicerol en PBS 1x. Las imágenes se adquirieron utilizando microscopios confocales de fluorescencia Zeiss LSM700, Zeiss LSM780 y Olympus IX-83-DSU. El número de células Tomato<sup>+</sup> con diferentes fenotipos se cuantificó mediante observación directa bajo un

microscopio de fluorescencia a 400x, considerando únicamente las células con núcleos visibles en el análisis.

#### **4.14. Extracción del ARN y análisis de expresión de genes por PCR cuantitativa**

Para la extracción del ARN total en experimentos *in vivo*, se recolectaron entre 30–50 mg de tejido hepático por muestra. Los tejidos se homogeneizaron utilizando un Polytron (Janke & Kunkel IKAWERK), y el ARN total se aisló empleando TRIzol Reagent® (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En experimentos *in vitro* o a partir de explantos tisulares, el ARN total se extrajo directamente desde placas de cultivo incubando las células ( $6 \times 10^5$ ) con TRIzol Reagent® durante 2 a 3 minutos. La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa, y su concentración se determinó usando un espectrofotómetro NanoDrop.

Antes de la síntesis de ADNc, el ARN fue tratado con ADNasa I (Thermo Scientific) para eliminar contaminantes genómicos. En un volumen final de 10  $\mu$ L, se incubaron 2  $\mu$ g de ARN con tampón de reacción ADNasa 1X y ADNasa I (2U) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se inactivó la enzima añadiendo 0,5  $\mu$ L de EDTA 25 mM y calentando durante 10 min a 65°C. La transcripción reversa se realizó utilizando 200 U de transcriptasa inversa SuperScript II (Life Technologies, California, EE. UU.) en presencia de 500 ng de Oligo (dT) como cebador, una mezcla de dNTPs y el inhibidor de ARNasa RiboLock (Life Technologies, California, EE. UU.).

Finalmente, los niveles de expresión de los genes que se detallan en la Tabla 2 se analizaron a partir del ADNc mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando un termociclador Agilent Aria (California, EE. UU.). Para las reacciones se empleó una mezcla comercial que contenía Taq ADN polimerasa Hot Start, los colorantes SYBR Green y ROX, y dNTPs (Productos Bio-Lógicos, Argentina). Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo con el siguiente programa: desnaturación inicial a 95°C durante 10 min; 40 ciclos de amplificación con los siguientes pasos, desnaturación a 95°C durante 30 segundos, alineación a una temperatura entre 54 a 60°C durante 1 minuto, y extensión a 72°C durante 1 minuto. Al finalizar la reacción, se realizó

una curva de disociación mediante un incremento de la temperatura a 95°C durante 1 minuto, seguido de 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 95°C, midiendo la fluorescencia cada 15 segundos. Esto permitió confirmar la especificidad de los productos amplificados. Los valores de expresión se normalizaron utilizando como genes de referencia gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o actina B, aplicando el método de  $\Delta\Delta Ct$ . Este método determinó los niveles de expresión de los genes de interés en relación con los niveles observados en las células o muestras control. Los ensayos se realizaron por triplicado en dos o tres experimentos independientes. La lista de *primers* utilizados se encuentra en la Tabla 1. En las anotaciones, "(m)" indica *primers* diseñados para ratones y "(h)" refiere a *primers* diseñados para humanos.

Gen	Sentido	Antisentido
<i>Abl1</i> (m)	5'-AGAAAGATGCGCCTGACACC-3'	5'- AGGAAGCAGTGGCGATACAG-3'
<i>Acta2</i> (m) y (h)	5'-ACTGGGACGACATGGAAAA-3'	5'- CCATCTCCAGAGTCCAGCAC-3'
<i>ACTB</i> (h)	5'-TTTGCAGCTCCTCGTTGCC-3'	5'-CGCAGCGATATCGTCATCCA-3'
<i>Arg1</i> (m)	5'-CAGAAGAATGGAAGAGTCAG -3'	5'-CAGATATGCAGGGAGTCACC -3'
<i>Axin2</i> (m)	5'-AATAAGCAGCCGTCGCGATG -3'	5'-AGCCTCCTCTCTTACAGCAA-3'
<i>Ctnnb1</i> (m)	5'-GGCGGCCGCGAGGTA-3'	5'-GCCATGTCCAACCTCCATCA-3'
<i>Brca2</i> (m)	5'-AGCCCAGCTTGAAGCAAGT -3'	5'-TGGCTCTCAGGATCATTGG -3'
<i>Ccna1</i> (m)	5'-AAGCATGCCTCAGTATCCCC -3'	5'-CAGGGGAAGAACTACAGGCG-3'
<i>Ccnd1</i> (m)	5'-TCAAGTGTGACCCGGACTGC-3'	5'-CCTTGGGTCGACGTTCTG-3'
<i>Col1a1</i> (m)	5'-CAACCTCAAGAAGTCCCTGC-3'	5'-AGGTGAATGACTGTTGCCT-3'
<i>Cdh1</i> (m)	5'-AACCCAAGCACGTATCAGGG-3'	5'-GAGTGTGGGGCATCATCA-3'
<i>Gadd45a</i> (m)	5'-CTGCAGAGCAGAAGACCGAA-3'	5'-TACACGCCGACCGTAATGG-3'
<i>Gapdh</i> (m)	5'-GGGGCTGCCAGAACATCAT-3'	5'-GCCTGCTTCACCACCTCTTG-3'
<i>Hgf</i> (m)	5'-GGCTGAAAAGATTGGATCAGG-3'	5'-CCAGGAACAATGACACCAAGA-3'
<i>Igf1</i> (m)	5'- CAGTCGTGTGGACCAAG-3'	5'-GTCTT GGGCATGTCAGTGTG-3'
<i>Il10</i> (m)	5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3'	5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
<i>Il1b</i> (m)	5'-TGACAGTGATGAGAATGACCTGTT-3'	5'-TTGGAAGCAGCCCTCATCT-3'

<i>Il6</i> (m)	5'- AGTGCCTCTGGACTGA-3'	5'- TCCACGATTCCCAGAGAAC-3'
<i>IL6</i> (h)	5'- GAGTAGTGAGGAACAAGCCAGA-3'	5'- GTTGGGTCAAGGGTGGTTATT-3'
<i>Nos2</i> (m)	5'-AAGATGGCCTGGAGGAATGC-3'	5'-TGCTGTGCTACAGTCCGAG-3'
<i>Lef1</i> (m)	5'- GCCACCGATGAGATGATCCC -3'	5'- TTGATGTCGGCTAAGTCGCC-3'
<i>Myb</i> (m)	5'- CAGATGTGCAGTGCCAACAC-3'	5'- GACCAACGCTTCGGACCATA-3'
<i>Notch2</i> (m)	5'-GTGTGGACAAAGTCAACCGC-3'	5'-ATGTCGATCTGGCACACTGG-3'
<i>Pcna</i> (m)	5'-AAAGATGCCGTGGGTGAAT-3'	5'-TTCCCATTGCCAAGCTCTCC-3'
<i>Prom1</i> (m)	5'- TCGGCATAGGGAAAGCCACG-3'	5'-GGGCACAGTCTAACATCGT -3'
<i>Sp5</i> (m)	5'-TCCAGACCAACAAACACACCA-3'	5'-AGTTTGCCTACCCAATCA-3'
<i>Tgfb1</i> (m)	5'-CCACTCGCTTCTTGAGACC-3'	5'-TAGTGGAAAGTGGGTGGGGAC-3'
<i>TGFB1</i> (h)	5'-CAGTGGTTGTAGTCAGCTC -3'	5'- CCACTTGCAGTGTGTTATCCC-3'
<i>Tnfa</i> (m)	5'-GACCCTCACACTCAGATCATC TTCT-3'	5'-CCACTTGGTGTGTTGCTACGA-3'
<i>Tnfsf12</i> (m)	5'- GCCCTGCGCTGCCTGGAAGA-3'	5'- TC CTGAGGGGCCTTGCTCT-3'
<i>Wnt1</i> (m)	5'-ACTACGTTGCTACTGGCACT-3'	5'- GTTCACGATGCCCAACCATC -3'
<i>Wnt3a</i> (m)	5'-GCTACCCGATCTGGTGGTCC-3'	5'- CAGAGAATGGCTGAGTGCT -3'
<i>Wnt5a</i> (m)	5'-GCTTCGCTTGAATTCCCTCG-3'	5'- TGGAAGACATGGCACCT-3'

**Tabla 1: Lista de genes analizados por RT-qPCR.** Sigla del gen con la correspondiente especie y los cebadores sentido y antisentido. *Ab1* (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1), *Acta2* (alfa actina de músculo liso), *ACTB* (Actina beta), *Arg1* (Arginasa 1), *Axin2* (Axina 2), *Ctnnb1* ( $\beta$ -catenina), *Brca2* (Breast cancer 2), *Ccna1* (Ciclina A1), *Ccnd1* (Ciclina D1), *Col1a1* (Colágeno tipo I alpha 1 cadena), *Cdh1* (Cadherina 1), *Gadd45a* (Growth arrest and DNA damage-inducible alpha), *Gapdh* (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa), *Hgf* (Factor de crecimiento de hepatocitos), *Igf1* (Factor de crecimiento similar a la insulina 1), *Il10* (Interleucina 10), *Il1b* (Interleucina 1 beta), *Il6* (Interleucina 6), *Nos2* (Sintasa de óxido nítrico inducible o iNOS), *Lef1* (Factor potenciador linfoide 1), *Myb* (Myeloblastosis oncogene), *Pcna* (Antígeno Nuclear de Células en Proliferación), *Prom1* (Prominina 1 o CD133), *Sp5* (specificity protein 5), *Tgfb1* (Factor de crecimiento transformante beta 1), *Tnfa* (factor de necrosis tumoral alfa) y *Tnfsf12* (tumor necrosis factor superfamily member 12 o TWEAK). Los pares de primers correspondientes a *Col1a1*, *Tgfb1* y *Acta2* son específicos para rata también. Lo mismo ocurre con *Acta2* en muestras humanas.

#### 4.15. Análisis estadísticos

A menos que se indique lo contrario, cada experimento se realizó al menos dos veces con un tamaño muestral de 4. Este tamaño permitió detectar diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones cuando estas superaban el 30%. Los datos obtenidos de diferentes experimentos se incluyeron en el mismo

análisis, y los resultados se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Los métodos estadísticos empleados variaron según el número de grupos comparados, la distribución de los datos y el enfoque experimental. En este estudio se utilizaron las siguientes pruebas: t de Student, Mann-Whitney, ANOVA, Kruskal Wallis y ANOVA de dos vías. Para evaluar si los datos seguían una distribución normal, se aplicó el *test* de Kolmogorov-Smirnov. Un nivel de significación de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el software Prism (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). No se excluyeron datos en el análisis.

# **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. FIBROSIS HEPÁTICA

#### 5.1.1. Inhibición de la progresión de la fibrogénesis en ratones mediado por IMT504.

Considerando las propiedades inmunomoduladoras del IMT504 y el hecho de que los procesos fibrogénicos están asociados con un aumento de la inflamación (Czaja, 2014), planteamos la hipótesis de que este ODN podría inhibir la progresión de la fibrogénesis hepática.

Para explorar esta posibilidad, primero confirmamos que el tratamiento con TAA induce el desarrollo de fibrosis establecida en ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (TxP2) tras 8 semanas de exposición a este hepatotóxico (**Figura 8A**). Se considera fibrosis establecida a un estadio avanzado de la fibrosis hepática, en la cual se ha formado una cantidad significativa de tejido cicatricial (fibroso) en el hígado debido a una lesión crónica o daño repetido. La fibrosis se evaluó mediante la cuantificación del porcentaje de área teñida con rojo sirio y la medición del área con inmunorreactividad para el marcador  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA).

En el grupo de ratones que recibió una única dosis de IMT504 dos semanas después de iniciado el tratamiento con TAA, se observó una reducción significativa en el grado de fibrosis en comparación con el grupo control (**Figura 8B-C; Figura 9A-B**). Este efecto fue aún más pronunciado en los ratones que recibieron tres dosis de IMT504, administradas con intervalos de 2 semanas entre cada una (**Figura 8B-C; Figura 9A-B**).

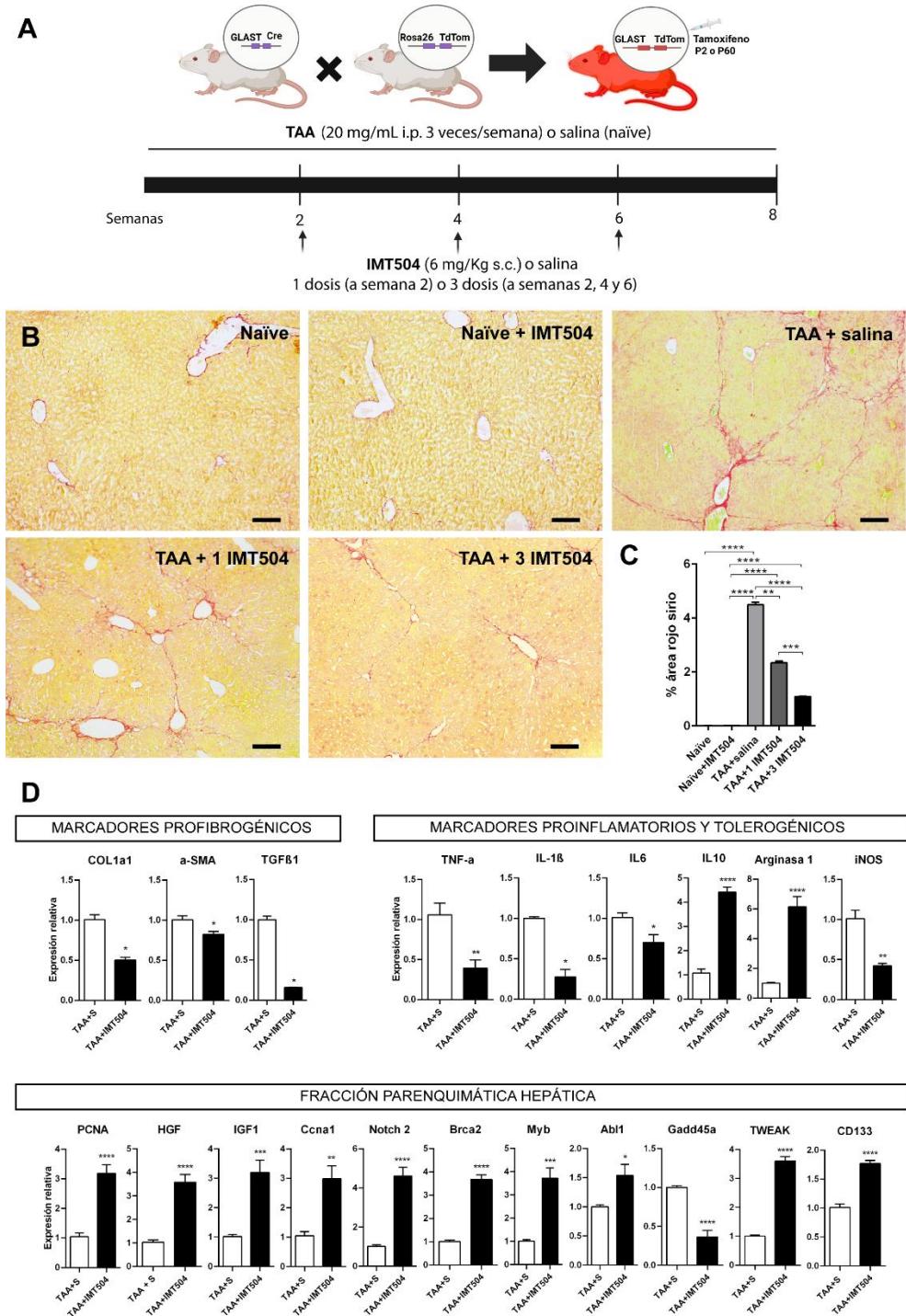
El microambiente proinflamatorio del hígado, típicamente asociado con la activación de HeSCs, dificulta tanto la regeneración hepática como la proliferación de hepatocitos (Blas-García & Apostolova, 2023). En línea con la hipótesis de que IMT504 desempeña un rol inmunomodulador en contextos fibróticos, observamos un aumento en la proliferación de hepatocitos proporcional al número de dosis administradas (**Figura 10**).

Para explorar los mecanismos tempranos inducidos por IMT504, se utilizaron ratones de las mismas camadas que no heredaron los transgenes. Estos fueron tratados con TAA por 2 semanas, tras lo cual se les administró IMT504 (o vehículo) y fueron sacrificados al día siguiente. Se recolectaron muestras de hígado total y de la fracción parenquimática de cada animal, que luego fueron procesadas para análisis por RT-qPCR.

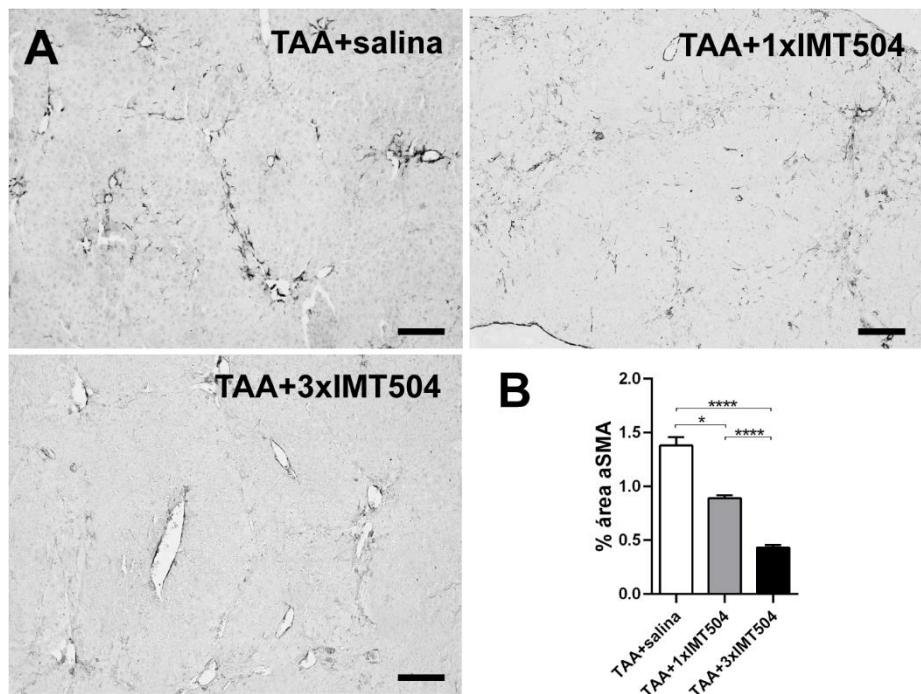
En el hígado total de los ratones que no heredaron los transgenes, el tratamiento con IMT504 redujo significativamente los niveles de expresión de ARNm de marcadores profibrogénicos (*Col1a1*, *Acta2* y *Tgfb1*) y proinflamatorios (*Tnf*, *Il1b*, *Il6* y *Nos2*) (**Figura 8D**). Paralelamente, se observó un aumento en la expresión de marcadores tolerogénicos (*Il10* y *Arg1*).

En la fracción parenquimática, se encontró una sobreexpresión de marcadores relacionados con la proliferación de hepatoblastos/hepatocitos (*Hgf*, *Pcna* y *Notch2*), la función de hepatocitos (*Igf1*), la síntesis y reparación del ADN (*Bcra2*, *Myb*, *Abl1*) y la regulación positiva del ciclo celular (*Ccna1*). En contraste, los niveles de expresión de *Gadd45a* (marcador de estrés celular, daño en el ADN y arresto del ciclo celular) disminuyeron. Interesantemente, dos marcadores de células progenitoras hepáticas *Tnfsf12* (TWEAK) y *Prom1* (CD133) (Rountree et al., 2007; Thomas et al., 2011) presentaron una mayor expresión en la fracción enriquecida de hepatocitos en el grupo tratado con el ODN.

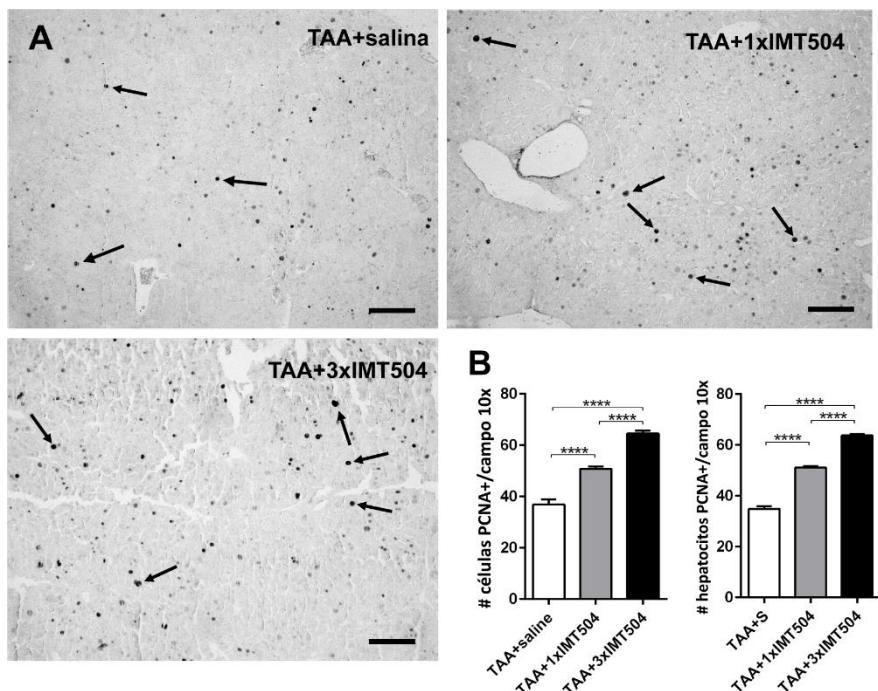
Los resultados indican que IMT504 podría tener un efecto inhibidor sobre la progresión de la fibrosis hepática, ya que reduce la fibrosis en ratones tratados con TAA, especialmente cuando se administran dosis repetidas del ODN. Este efecto parece estar acompañado de una mayor proliferación de hepatocitos y una modulación de la respuesta inflamatoria, evidenciada por la disminución de marcadores profibrogénicos y proinflamatorios, así como por el aumento en marcadores tolerogénicos y de células progenitoras hepáticas. Estos hallazgos sugieren una posible influencia regenerativa de IMT504 sobre el hígado.



**Figura 8: IMT504 inhibe la fibrogénesis hepática.** (A) Representación esquemática de la derivación de ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>tdTomato</sup> y del diseño experimental. (B) Micrografías representativas que muestran tinción con rojo sirio en secciones de hígado obtenidas de ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (TxP2) de diferentes grupos experimentales. Barras de escala: 200  $\mu$ m. (C) Comparaciones estadísticas entre grupos. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Dunn; n=4. (D) Comparaciones estadísticas de los niveles de expresión determinados por qPCR de marcadores profibrogénicos e inmunomoduladores en tejido hepático completo, y de proliferación, función de hepatocitos, síntesis/reparación de ADN, y estrés celular, en la fracción hepática enriquecida en parénquima, un día después de la aplicación de IMT504 o vehículo, dos semanas después del inicio del tratamiento con TAA. Medido en porcentaje de cambio, relativizado a TAA+S. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001; vs. TAA+S. Prueba de Mann-Whitney: COL1a1,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$  e iNOS; prueba t de Student no apareada: todos los demás marcadores.



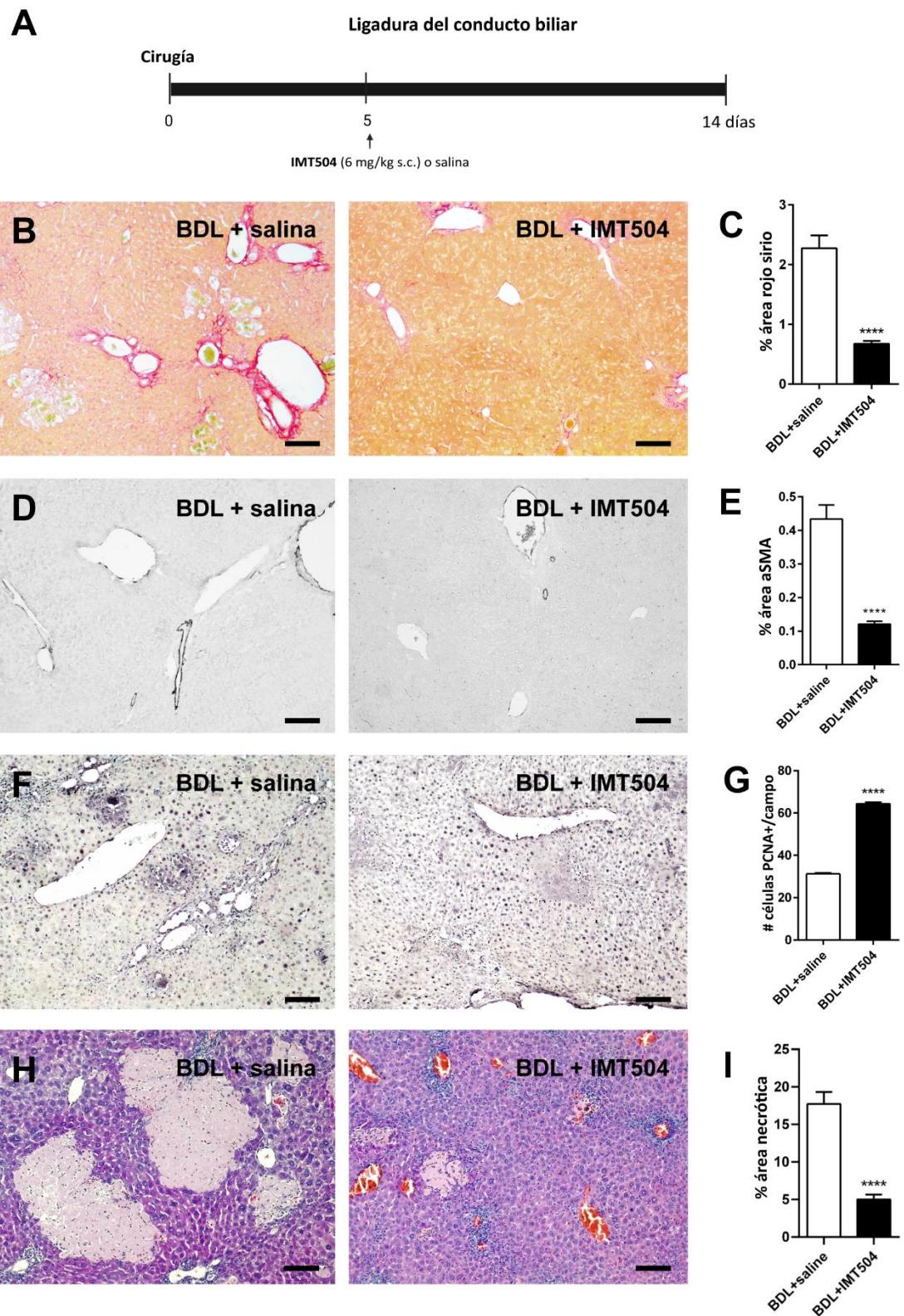
**Figura 9: IMT504 inhibe la fibrogénesis hepática.** (A) Micrografías representativas que muestran la inmunorreactividad de  $\alpha$ -actina de músculo liso en secciones de hígado obtenidas de ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (TxP2) tratados con TAA+vehículo, TAA+1xIMT504 o TAA+3xIMT504. Barras de escala: 200  $\mu$ m. (B) Comparaciones estadísticas entre grupos. \*p<0.05; \*\*\*p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Dunn; n=4.



**Figura 10: IMT504 induce la proliferación de células hepáticas.** (A) Micrografías representativas que muestran la inmunorreactividad para PCNA en secciones de hígado obtenidas de ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (TxP2) tratados con TAA+salina, TAA+1xIMT504 o TAA+3xIMT504. Barras de escala: 200  $\mu$ m. (B) Comparaciones estadísticas entre grupos. \*\*\*\*p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Dunn; n=4.

Para evaluar si IMT504 podría reducir la fibrosis hepática en un modelo *in vivo* con una etiología diferente, se sometió a ratones CD1 a una ligadura del conducto biliar (BDL). Cinco días después de la cirugía, los animales fueron tratados con IMT504 o solución salina y sacrificados nueve días después (**Figura 11A**). El tratamiento con IMT504 se asoció con una reducción en el depósito de colágeno fibrilar y en la activación de miofibroblastos, así como en una estimulación de la proliferación de hepatocitos (**Figura 11B-G**).

Notablemente, se observó una disminución en las áreas necróticas en el grupo de ratones tratados con el ODN (**Figura 11H-I**). En conjunto, estos hallazgos respaldan sólidamente la capacidad de IMT504 para reducir la fibrogénesis hepática en los modelos de ratón estudiados. Además, el tratamiento con IMT504 no solo disminuye los marcadores profibrogénicos, sino que también favorece la proliferación de hepatocitos, lo que sugiere un efecto positivo en la regeneración y reparación del hígado.



**Figura 11: IMT504 inhibe la fibrogénesis en un modelo *in vivo* de ligadura del conducto biliar. (A)** Representación esquemática del diseño experimental. **(B, D, F, H)** Microfotografías representativas de secciones de hígado obtenidas de ratones CD1 inyectados con salina o IMT504 a los 5 días después de la BDL y sacrificados 9 días más tarde que muestran tinción con rojo sirio **(B)**, inmunorreactividades para  $\alpha$ -SMA **(D)** o PCNA **(F)**, o tinción con hematoxilina-eosina **(H)**. **(C, E, G, I)** Comparaciones estadísticas. \*\*\*\*p<0.0001; **(C, E, I)** prueba de Mann-Whitney; **(G)** prueba t de Student no apareada; n=4. **(H)** Note las áreas necróticas. Barras de escala: 200  $\mu$ m.

### **5.1.2. Aceleración de la regresión en la fibrosis hepática mediado por IMT504 en el modelo murino de TAA.**

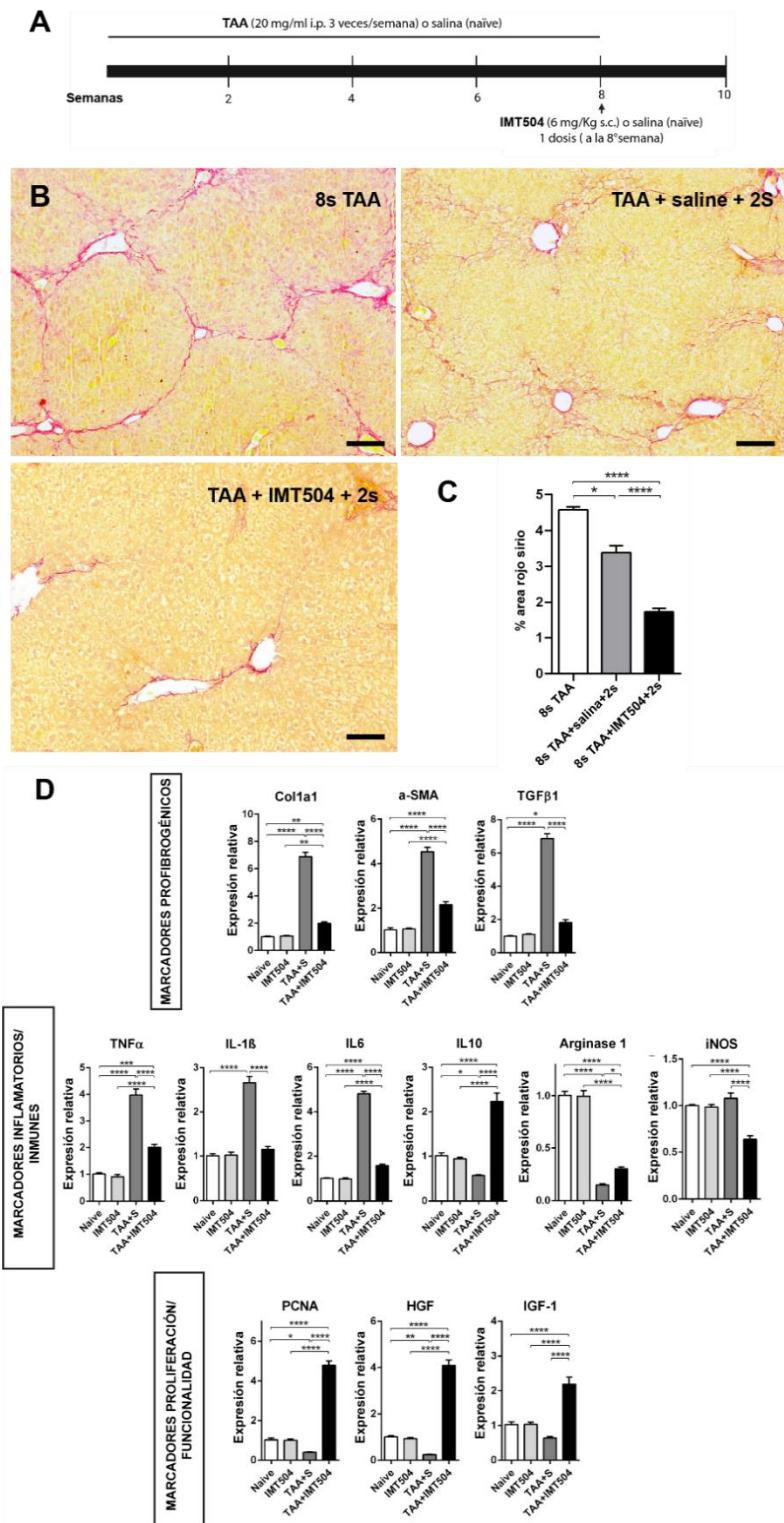
Subsecuentemente, investigamos si IMT504 podría facilitar la regresión de la fibrosis preexistente. Para ello, administramos una dosis de IMT504 o vehículo a ratones obtenidos de las mismas camadas de ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (TxP2), tras un tratamiento de 8 semanas con TAA. Posteriormente, los animales fueron sometidos a un periodo de recuperación de dos semanas sin la administración de TAA. Al finalizar este período, los ratones fueron sacrificados, y sus hígados fueron disecados y procesados para análisis histológicos y moleculares.

La administración de IMT504 resultó en una reducción sustancial en el colágeno depositado, evidenciada mediante la tinción con rojo sirio, y en la activación de miofibroblastos, analizado a través de la inmunomarcación con  $\alpha$ -SMA (**Figura 12B-C** y **Figura 13A-B**). Además, se registró un aumento significativo en el número de hepatocitos PCNA<sup>+</sup>, lo que sugiere una mayor proliferación de esas células en el grupo tratado con IMT504.

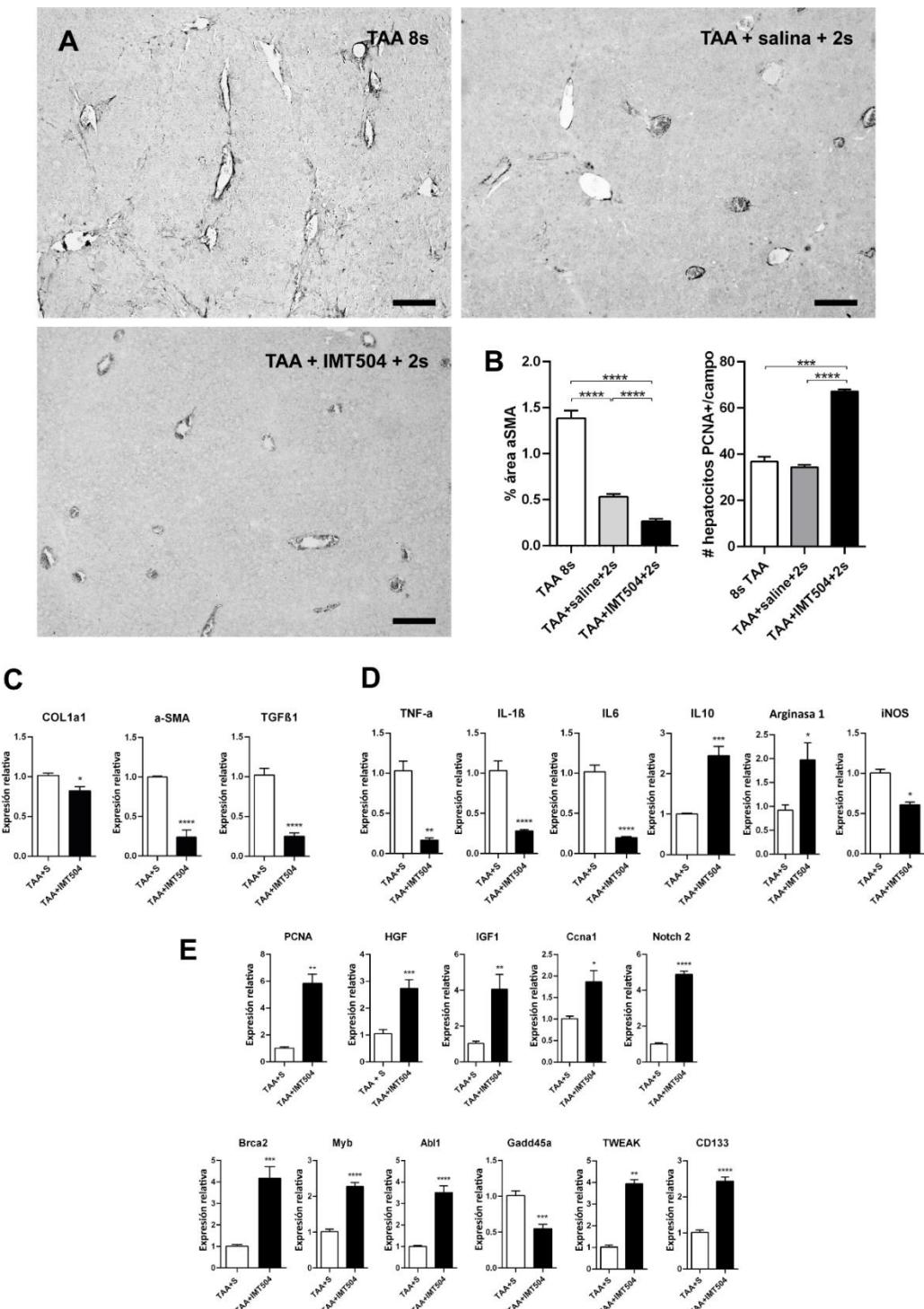
Asimismo, se analizó por qPCR el perfil de expresión de varios genes al final del experimento (**Figura 12D**). Comparado con el grupo control tratado con vehículo, el tratamiento con IMT504 redujo significativamente los marcadores profibrogénicos y proinflamatorios. Incluso, *Tgfb1* e *Il1b* alcanzaron niveles normales de expresión. *Il10* mostró una sobreexpresión significativa, mientras que *Nos2* (gen que codifica para iNOS) se redujo, en comparación con los grupos control, incluidos los ratones naïve. Además, se observó un aumento en marcadores de proliferación y funcionalidad hepática.

En conjunto, estos datos respaldan la conclusión de que IMT504 acelera la recuperación de la fibrosis hepática.

Para investigar los mecanismos tempranos que subyacen a la aceleración de la regresión de la fibrosis hepática mediada por IMT504, se realizaron nuevos análisis. Nuevos animales CD1 fueron tratados con TAA durante 8 semanas, seguidos de la administración de IMT504 o solución salina, y sacrificados transcurrido este tiempo y sacrificados 24 horas después. Las muestras de hígado fueron procesadas para análisis mediante qPCR (**Figura 13C-E**).



**Figura 12: IMT504 mejora la regresión de la fibrosis hepática.** (A) Representación gráfica del diseño experimental. (B) Microfotografías representativas que muestran la tinción con rojo sirio en secciones de hígado obtenidas de ratones CD1 de diferentes grupos experimentales. Barras de escala: 200  $\mu$ m. (C) Comparaciones estadísticas entre grupos. \*p<0.05; \*\*\*p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Dunn; n=4. (D) Comparaciones estadísticas de los niveles de expresión por qPCR de marcadores profibrotícos, inmunes/inflamatorios y de proliferación/función parenquimática en tejido hepático completo, 14 días después de la aplicación de salina/IMT504. Medido en porcentaje de cambio, relativizado a Naïve. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Tukey; n=3.



**Figura 13: IMT504 acelera la regresión de la fibrosis hepática.** (A) Microfotografías representativas que muestran la inmunorreactividad de  $\alpha$ -actina de músculo liso en secciones de hígado obtenidas de animales CD1 tratados con TAA durante 8 semanas, y otros inyectados con vehículo o IMT504 y dejados sin más aplicaciones de TAA por dos semanas adicionales. (B) Comparaciones estadísticas del % de área de  $\alpha$ -SMA y hepatocitos PCNA $^{+}$  entre grupos. \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Dunn; n=4. (C-E) Comparaciones estadísticas de los niveles de expresión por qPCR en el experimento de 8 semanas con TAA, tratamiento con IMT504 y sacrificio 1 día después del ODN. Medido en porcentaje de cambio, relativizado a TAA+S. Marcadores profibrogénicos e inmunomoduladores en tejido hepático completo (C, D), y de proliferación, reparación de ADN, función de hepatocitos, estrés celular y marcadores de progenitores hepáticos en la fracción parenquimática (E). \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001; \*vs. TAA+S; prueba de Mann-Whitney; COL1a1, TNF- $\alpha$ , iNOS, PCNA y Ccna1; prueba t de Student no apareada: todos los demás marcadores.

Los resultados obtenidos fueron muy similares a los que observados cuando IMT504 fue administrado a las 2 semanas de tratamiento con TAA. Específicamente, los marcadores relacionados con la fibrosis hepática, la inflamación, la proliferación de hepatocitos y los progenitores hepáticos mostraron patrones de expresión comparables, lo que sugiere que IMT504 tiene efectos consistentes en la modulación de estos procesos, independientemente del tiempo de tratamiento con TAA.

### **5.1.3. Aumento en la contribución de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs con células similares a endoteliales y células similares a hepatocitos durante la fibrogénesis mediado por IMT504.**

Previamente hemos demostrado que los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, una subpoblación de células estromales perisinusoidales, se movilizan a la sangre periférica y contribuyen con ELCs y HLCs después de una lesión hepática (Sierra et al., 2020). Considerando que IMT504 es un conocido inductor de la movilización de células estromales de médula ósea hacia sangre periférica (Hernando Insúa et al., 2007), nos propusimos determinar si este ODN podría actuar específicamente sobre los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs. De ser así, sería esperable que su aplicación estimule la contribución de esa subpoblación celular con células hepáticas, posiblemente a través de su diferenciación celular, durante la fibrogénesis.

Cruzamos a los ratones GLAST<sup>CreERT2</sup> con ratones Rosa26<sup>Tomato</sup>. Los descendientes doble transgénicos resultantes permiten la identificación de las células GLAST<sup>+</sup> en el momento de la inyección de tamoxifeno (Tx) mediante la expresión del gen reportero tdTomato (Tom). Esto nos facilita identificar las células GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en la médula ósea o, si son movilizadas a través del torrente sanguíneo, en los órganos a los que son reclutadas, y así determinar los tipos celulares a los que dan lugar.

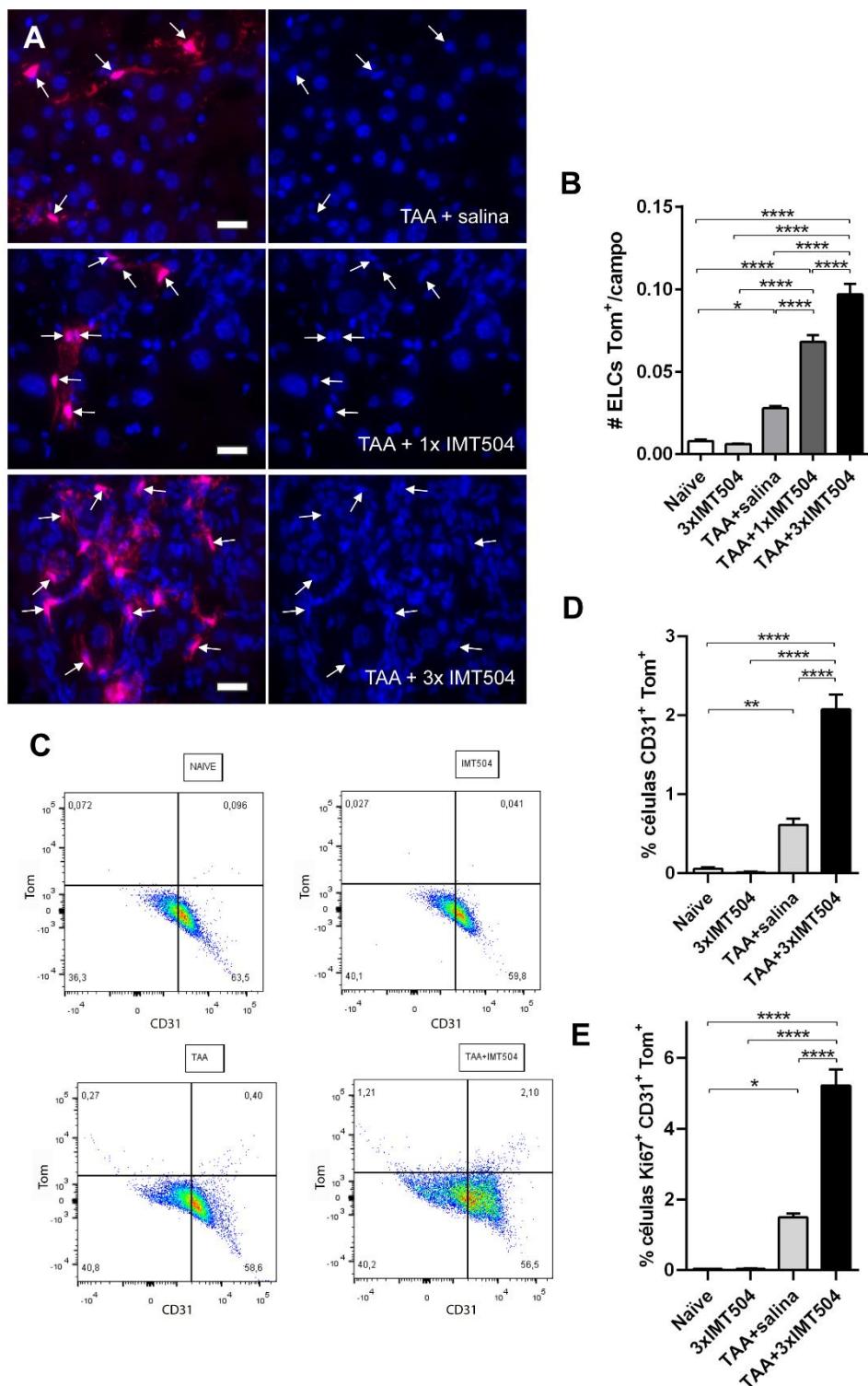
Para este propósito, ratones adultos GLAST<sup>CreERT2</sup>; Rosa26<sup>Tom</sup> en los que se activó la expresión del gen reportero a día postnatal 2, mediante inyección con tamoxifeno (TxP2), fueron tratados con TAA durante 8 semanas. Algunos animales fueron tratados con una sola dosis de IMT504 (tras dos semanas de

TAA) o tres inyecciones administradas a las 2, 4 y 6 semanas del modelo hepatotóxico.

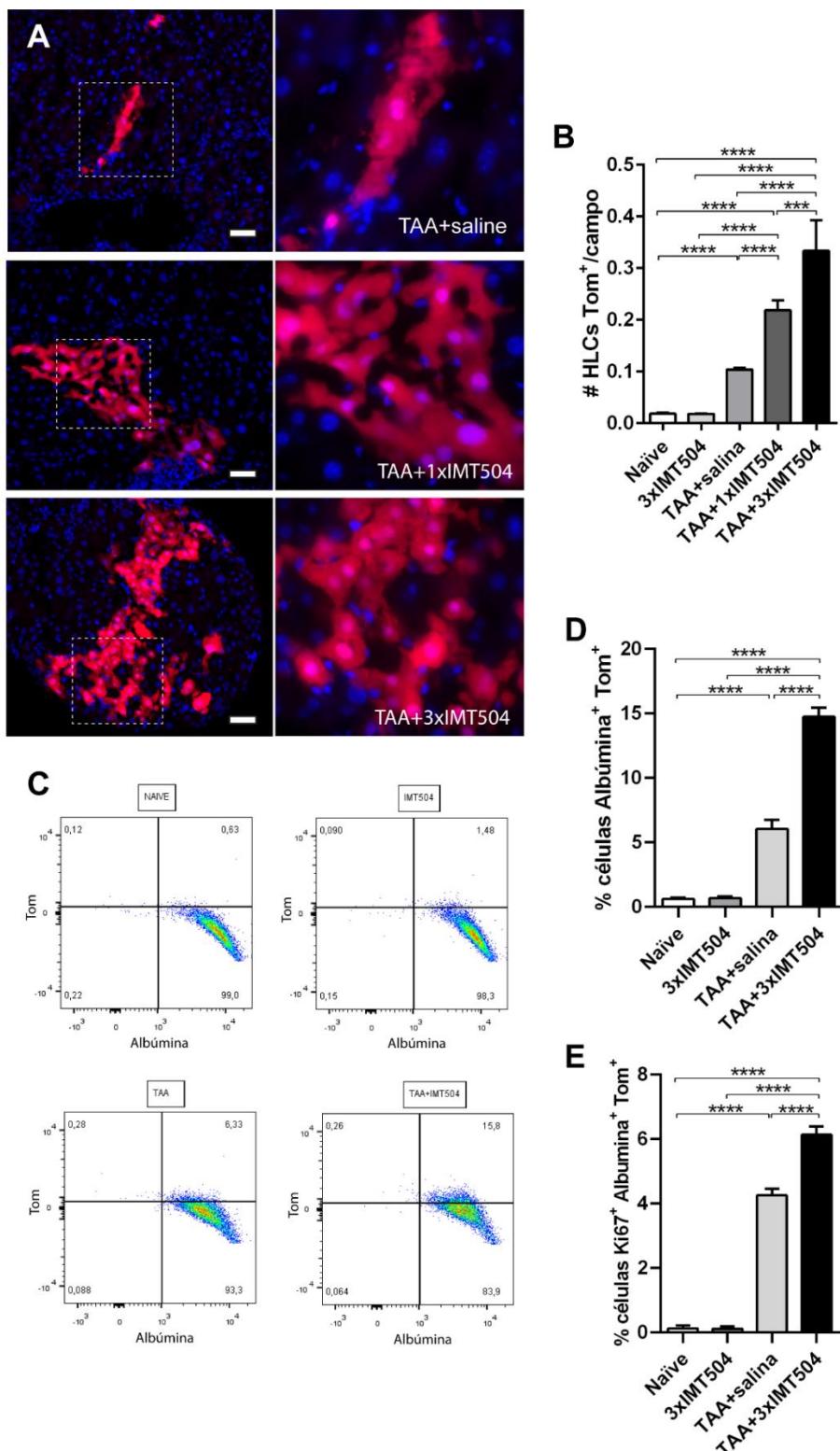
Consistente con nuestras hipótesis, en el grupo que recibió una sola dosis de IMT504 se observó un aumento en la proporción relativa de ELCs Tom<sup>+</sup> (**Figura 14**), y de HLCs Tom<sup>+</sup> (**Figura 15**). Este efecto fue aún más pronunciado en los animales tratados con tres dosis del ODN. Interesantemente, también se observó que IMT504 indujo un aumento significativo en la proporción relativa de las ELCs Tom<sup>+</sup> y HLCs Tom<sup>+</sup> que expresaron el marcador de ciclo celular Ki67 en el hígado, incluso después de 8 semanas de tratamiento con TAA (**Figura 14 y 15**). Algo similar fue observado en ratones que fueron tratados con el hepatotóxico durante 2 semanas y que fueron sacrificados al día siguiente del tratamiento con IMT504 (**Figura 17C-F**).

Además, al analizar muestras de médula ósea y sangre periférica de animales naïve o en el contexto de la fibrosis por TAA, se encontró en esas fracciones que virtualmente todas las células CD44<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> coexpresan CD133, un conocido marcador de células progenitoras (**Figura 16A-B**), independientemente del tratamiento con IMT504. Este marcador ha sido también asociado con progenitores hepáticos en células que coexpresan albúmina (Rountree et al., 2007a). Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs podrían contribuir a la población de progenitores hepáticos y, en el contexto del daño hepático, adquirir el fenotipo característico de las ELCs y HLCs.

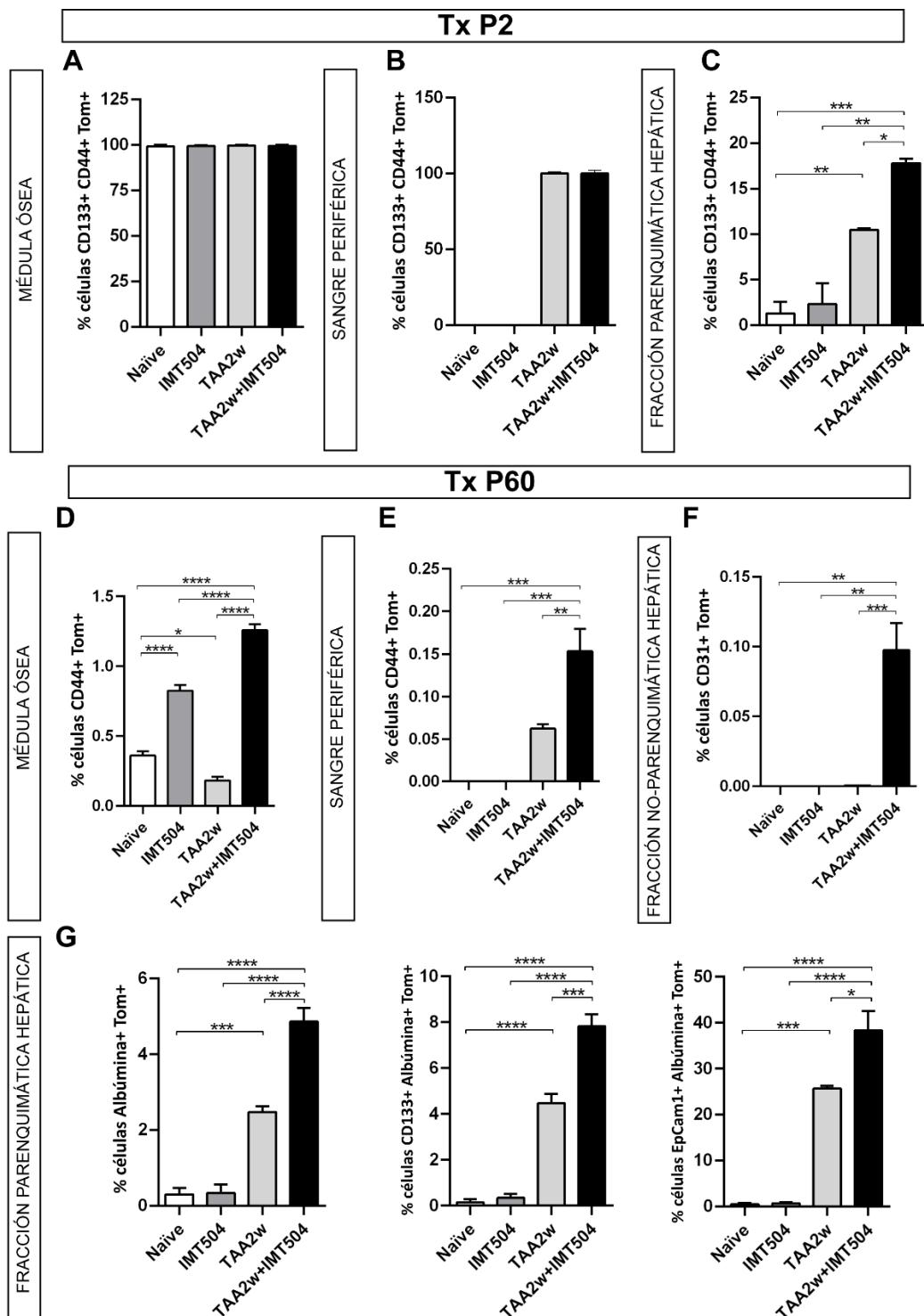
Considerando la posibilidad de que algunos progenitores de células endoteliales y/o hepatocitos GLAST<sup>+</sup> pudieran residir en el hígado sano, tratado o no con IMT504, realizamos un análisis detallado de la incidencia de células CD31<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> y de la coexpresión de los marcadores CD133 y albúmina en las células Tom<sup>+</sup>, utilizando citometría de flujo. En los ratones doble transgénicos naïve o sin lesión tratados con IMT504, que fueron inyectados con tamoxifeno en P60, no se detectaron ELCs Tom<sup>+</sup> en el hígado (**Figura 16F**).



**Figura 14: IMT504 potencia la contribución de las BMSPs GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> con las ELCs en el hígado durante la fibrogénesis.** (A) Microfotografías representativas que muestran las ELCs Tom<sup>+</sup> en ratones GLAST<sup>CreERT2</sup>,Rosa26<sup>Tom</sup> (Tx P2) de diferentes grupos experimentales. Rojo: Tom; azul: Hoechst; panel de la izquierda: combinado. Barras de escala: 20  $\mu$ m. (B) Comparaciones estadísticas del número de ELCs y Tom<sup>+</sup>; n=4. (C) Gráficos representativos de citometría de flujo que muestran la abundancia de CD31<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> en la fracción enriquecida no parenquimática del hígado. (D) Comparaciones estadísticas del porcentaje de CD31<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> ELCs en la fracción no parenquimatoso del hígado, a partir de análisis de citometría de flujo; n=5. (E) Comparaciones estadísticas del porcentaje de células Ki67<sup>+</sup> entre el total de CD31<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> ELCs, a partir de análisis de citometría de flujo; n=4. (B,D,E) \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.0001. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey.



**Figura 15: IMT504 potencia la contribución de las BMSPs GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> con las HLCs en el hígado durante la fibrogénesis.** (A) Microfotografías representativas que muestran las HLCs Tom<sup>+</sup> en ratones GLAST<sup>CreERT2</sup>;Rosa26<sup>Tom</sup> (TxP2) bajo diferentes tratamientos. Rojo: Tom; azul: Hoechst. Barras de escala: 20  $\mu$ m. (B) Comparaciones estadísticas del número de HLCs Tom<sup>+</sup>; n=4. (C) Gráficos representativos de citometría de flujo que muestran la abundancia de Albúmina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> en la fracción enriquecida parenquimática del hígado. (D) Comparaciones estadísticas del porcentaje de HLCs Albúmina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup>, a partir de análisis de citometría de flujo; n=4. (E) Comparaciones estadísticas del porcentaje de células Ki67<sup>+</sup> entre el total de HLCs Albúmina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup>, a partir de análisis de citometría de flujo; n=4. (B, D, E) \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001; Prueba de comparaciones múltiples de Tukey.



**Figura 16: Incidencia de células GLAST Tom<sup>+</sup> en la médula ósea, sangre periférica y hígado.** Gráficos de barras con comparaciones estadísticas del porcentaje de células Tom<sup>+</sup> correspondientes a diferentes fenotipos en la médula ósea (A,D), sangre periférica (B,E), fracción no parenquimática del hígado (F) y fracción parenquimática del hígado (C,G) obtenidas de ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>;Rosa26<sup>Tom</sup> Tx P2 (A-C) o P60 (D-G) en la médula ósea. \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Tukey; n=3.

Por otro lado, al analizar la fracción parenquimática del hígado, en algunos ratones *GLAST<sup>CreERT2</sup>; Rosa26<sup>Tom</sup>* (TxP2), tanto naïve como tratados con IMT504 sin lesionar, se observó una pequeña proporción de células CD133<sup>+</sup> Albúmina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> (0,012±0,0169% y 0,0237±0,0336% del total de células parenquimáticas, respectivamente). Sin embargo, este hallazgo no fue consistente en todos los individuos analizados ya que en algunos casos no se observaron células CD133<sup>+</sup> Albúmina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup>.

Cuando la recombinación CRE (expresión de Tom) se indujo a día postnatal 60 (P60), se detectó un patrón similar, aunque con una incidencia aún menor de estas células (0,0004±0,0008% y 0,0011±0,0001% en los grupos naïve e IMT504, respectivamente) (**Figuras 16C-G**).

En contraste, en todos los ratones tratados con TAA e IMT504, tanto en los grupos TxP2 como TxP60, se encontraron cantidades significativamente mayores de ELCs CD31<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> y HLCs CD133<sup>+</sup>/Ep-CAM<sup>+</sup> Albúmina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> en el hígado (**Figuras 16C-G**).

En conjunto, estos resultados sugieren que, aunque algunos progenitores hepáticos GLAST<sup>+</sup> podrían residir en el hígado, la mayoría de las células Tom<sup>+</sup> observadas tras una lesión probablemente corresponden a células no residentes, como los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, que se diferencian en ELCs, HLCs y progenitores hepáticos. Además, IMT504 parece desempeñar un papel clave en la expansión de estas subpoblaciones en respuesta al daño hepático.

#### **5.1.4. Aumento en la incidencia de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en la médula ósea en el contexto de la fibrosis inducido por IMT504**

En un estudio previo, demostramos que el tratamiento con TAA reduce la capacidad de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs para formar colonias densas en ensayos de unidades formadoras de colonias durante la fibrogénesis hepática temprana (Sierra et al., 2020). A partir de estos resultados, nos preguntamos si el tratamiento con IMT504 podría expandir el reservorio de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs y, finalmente, restaurar su capacidad para formar colonias densas nuevamente. Esto podría explicar, al menos en parte, el aumento en la

contribución de las células derivadas de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs a la regeneración hepática mediada por IMT504.

Para abordar esta cuestión, administramos IMT504 de forma sistémica a ratones *Wnt1<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>Tom</sup>* previamente tratados con TAA durante 2 semanas. Dieciocho horas después, realizamos un ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-Fs) utilizando la fracción BM-MNCs. Se observó un aumento significativo en la incidencia de CFU-Fs Tom<sup>+</sup> en el grupo tratado con IMT504 en comparación con el control *naïve* (no mostrado, incluido en la publicación relacionada con esta tesis).

De manera similar, cuando se aplicó IMT504 a ratones tratados con TAA, el número de CFU-Fs Tom<sup>+</sup> aumentó en comparación con los animales tratados con TAA que recibieron una inyección de vehículo. Curiosamente, el incremento en CFU-Fs inducido por IMT504 se limitó exclusivamente a la subpoblación de BMSPs Tom<sup>+</sup>. Notablemente, se observó que IMT504 restauró la capacidad de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs para formar colonias densas (no mostrado, incluido en la publicación relacionada con esta tesis).

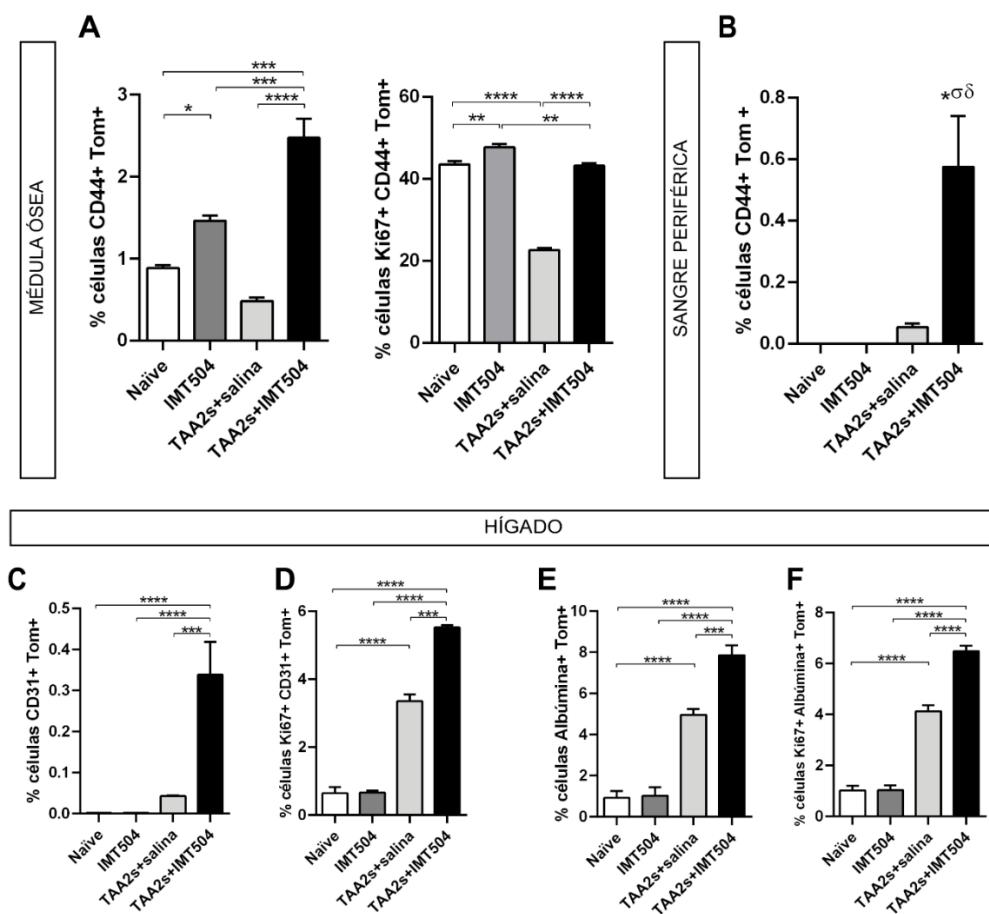
Para confirmar que IMT504 podría expandir el reservorio de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en el modelo de lesión por TAA, en esta tesis analizamos mediante citometría de flujo la incidencia de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en la médula ósea (BM) y la sangre periférica de ratones *GLAST<sup>CreERT2</sup>; Rosa26<sup>Tom</sup>* (Tx P2 o P60) tratados con TAA durante 2 semanas e inyectados con IMT504 o vehículo 24 horas antes. Se observó que la frecuencia de células CD44<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> aumentó significativamente en la médula ósea después del tratamiento con IMT504 (**Figura 16D y 17A**, izquierda). Más aún, este ODN indujo un aumento en la frecuencia relativa de células CD44<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> que coexpresan el marcador de proliferación Ki67 (**Figura 17A**, derecha).

Además, la lesión hepática promovió la movilización de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs hacia la sangre periférica, fenómeno que se potenció significativamente con IMT504 (**Figura 16E y 17B**). Por lo tanto, IMT504 parece estimular tanto la expansión como la movilización de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs *in vivo*.

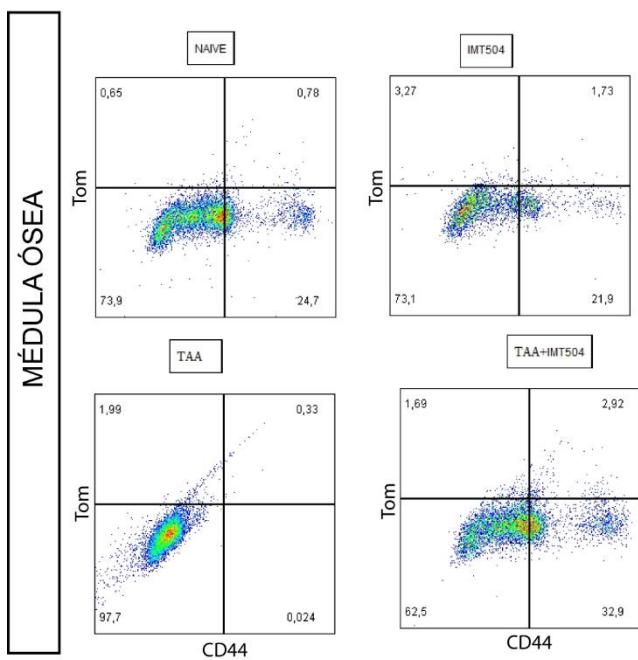
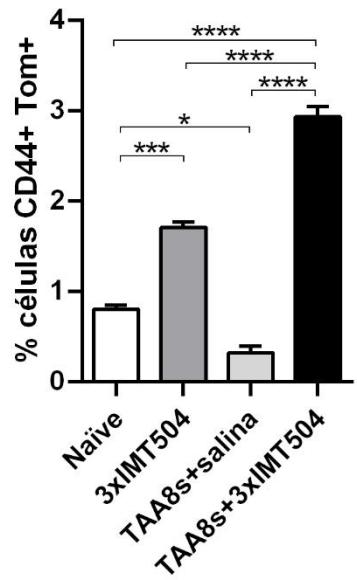
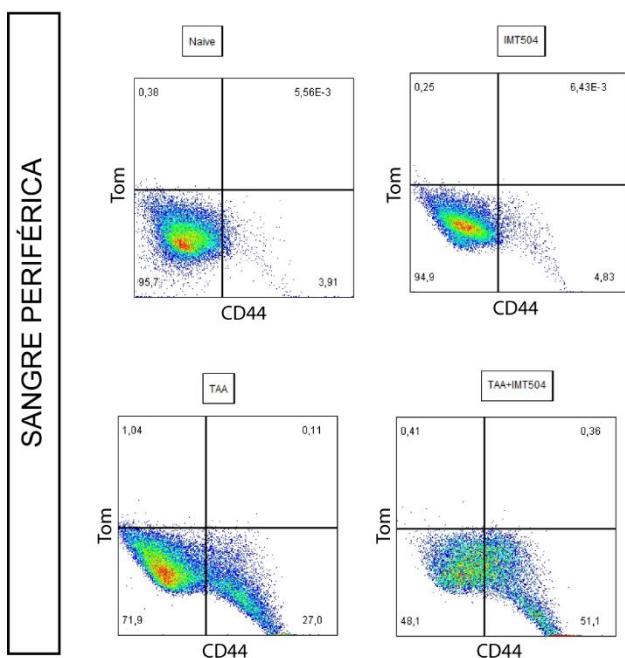
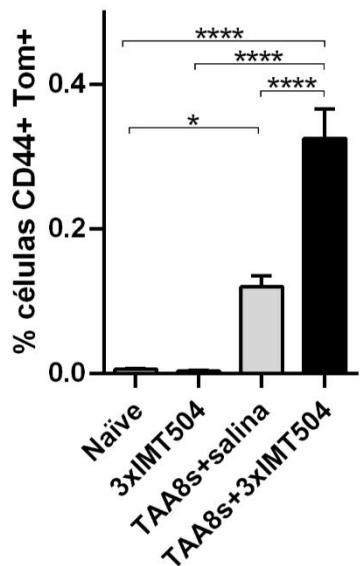
Se observaron resultados similares en muestras de médula ósea y sangre periférica obtenidas de ratones tratados con TAA durante 8 semanas, que

recibieron tres dosis de IMT504 a partir de la segunda semana de tratamiento con TAA, separadas por intervalos de 2 semanas (**Figura 18**).

En resumen, estos resultados sugieren que IMT504 induce la expansión de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs y restaura su capacidad para formar colonias densas en el contexto de la fibrosis hepática temprana mediada por TAA. Estos hallazgos nos llevan a concluir que IMT504 puede promover la expansión de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs *in vivo*, lo que probablemente contribuye al aumento en la incidencia de ELCs Tom<sup>+</sup> y HLCs Tom<sup>+</sup> durante la fibrogénesis hepática.



**Figura 17: Incidencia de las células Tom<sup>+</sup> en la médula ósea, sangre periférica y hígado después de 2 semanas con TAA, analizada por citometría de flujo en ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (TxP2).** (A, izquierda) Comparaciones estadísticas del porcentaje de células CD44<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> en la médula ósea. (A, derecha) Comparaciones estadísticas del porcentaje de células Ki67<sup>+</sup> entre el total de células CD44<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> en la médula ósea. (B) Comparaciones estadísticas del porcentaje de células CD44<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> dentro de la sangre periférica después de 2 semanas de tratamientos con TAA e IMT504/salina; n=4. (C) Comparaciones estadísticas del porcentaje de ELCs CD31<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> en la fracción no parenquimática del hígado; n=6. (D) Comparaciones estadísticas del porcentaje de células Ki67<sup>+</sup> entre el total de ELCs CD31<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup>; n=5. (E) Comparaciones estadísticas del porcentaje de HLCs Albúmina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> en la fracción parenquimática del hígado; n=6. (F) Comparaciones estadísticas del porcentaje de células Ki67<sup>+</sup> entre el total de HLCs Albúmina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup>; n=5. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

**A****B****C****D**

**Figura 18: Abundancia *in vivo* de células mononucleares CD44<sup>+</sup> trazadas con GLAST en la médula ósea y sangre periférica después de tratamientos con TAA (8 semanas) y/o IMT504 (3 dosis) en ratones GLAST<sup>CreERT2</sup>,Rosa26<sup>Tom</sup> (Tx P2). (A,B)** Gráficas representativas de citometría de flujo que muestran la abundancia de células CD44<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> en la médula ósea correspondientes a diferentes condiciones experimentales (A), y comparaciones estadísticas (B). **(C,D)** Gráficas representativas de citometría de flujo que muestran la abundancia de células CD44<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> en la sangre periférica correspondientes a diferentes condiciones experimentales (C), y comparaciones estadísticas (D). \*p<0.05; \*\*p<0.001; \*\*\*p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Tukey; n=4.

### 5.1.5. Los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, pero no los BMSPs Tom<sup>-</sup>, son estimulados a proliferar por IMT504 mediante la inducción de la vía de señalización Wnt

Todos los datos previamente expuestos sugieren que, *in vivo*, IMT504 induce la proliferación y la movilización de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs y también la proliferación de los ELCs Tom<sup>+</sup>, de progenitores de hepatocitos Tom<sup>+</sup> y de HLCs Tom<sup>+</sup>, que derivarían de esos GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs. Esos efectos del ODN explicarían la mayor incidencia de esas células Tom<sup>+</sup> en el hígado en el contexto de la fibrosis.

Para confirmar el papel de IMT504 en la promoción de la proliferación de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs y para analizar si las otras subpoblaciones de BMSPs podrían comportarse de manera similar, establecimos cultivos primarios de BM-MNCs *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (Tx P2) y expandimos por separado las fracciones enriquecidas en células Tom<sup>+</sup> y Tom<sup>-</sup>, al menos hasta 10 pasajes (P10) *in vitro*. En los cultivos enriquecidos en células Tom<sup>+</sup> a P7, el 79.97±1.29% de las células expresaron el gen reportero. Algunas de estas células Tom<sup>+</sup> silencian la expresión de GLAST durante el desarrollo postnatal y desconocemos si las células cultivadas expresan GLAST luego de varios pasajes *in vitro* (Sierra et al., 2020). Sin embargo, esta información no resulta relevante para los objetivos de este experimento, ya que el modelo genético *in vivo* permite identificar las células que se originaron a partir de aquellas que expresaban GLAST a día postnatal 2, momento en que se administró tamoxifeno a los animales doble-transgénicos.

Para evaluar el impacto de IMT504 en la proliferación de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs a P8, las fracciones Tom<sup>+</sup> y Tom<sup>-</sup> fueron pretratadas con IMT504 durante 2 horas. Después de otras 4 horas, el análisis por citometría de flujo del marcador Ki67 mostró un aumento significativo en la frecuencia relativa de células en proliferación, exclusivamente en las células Tom<sup>+</sup> tratadas con IMT504. Este incremento pasó de aproximadamente el 30% al 75% en los cultivos analizados (**Figura 19A-B**).

Siendo que podemos identificar las células derivadas a partir de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs por la expresión temprana de Wnt1 en esos progenitores (a P2),

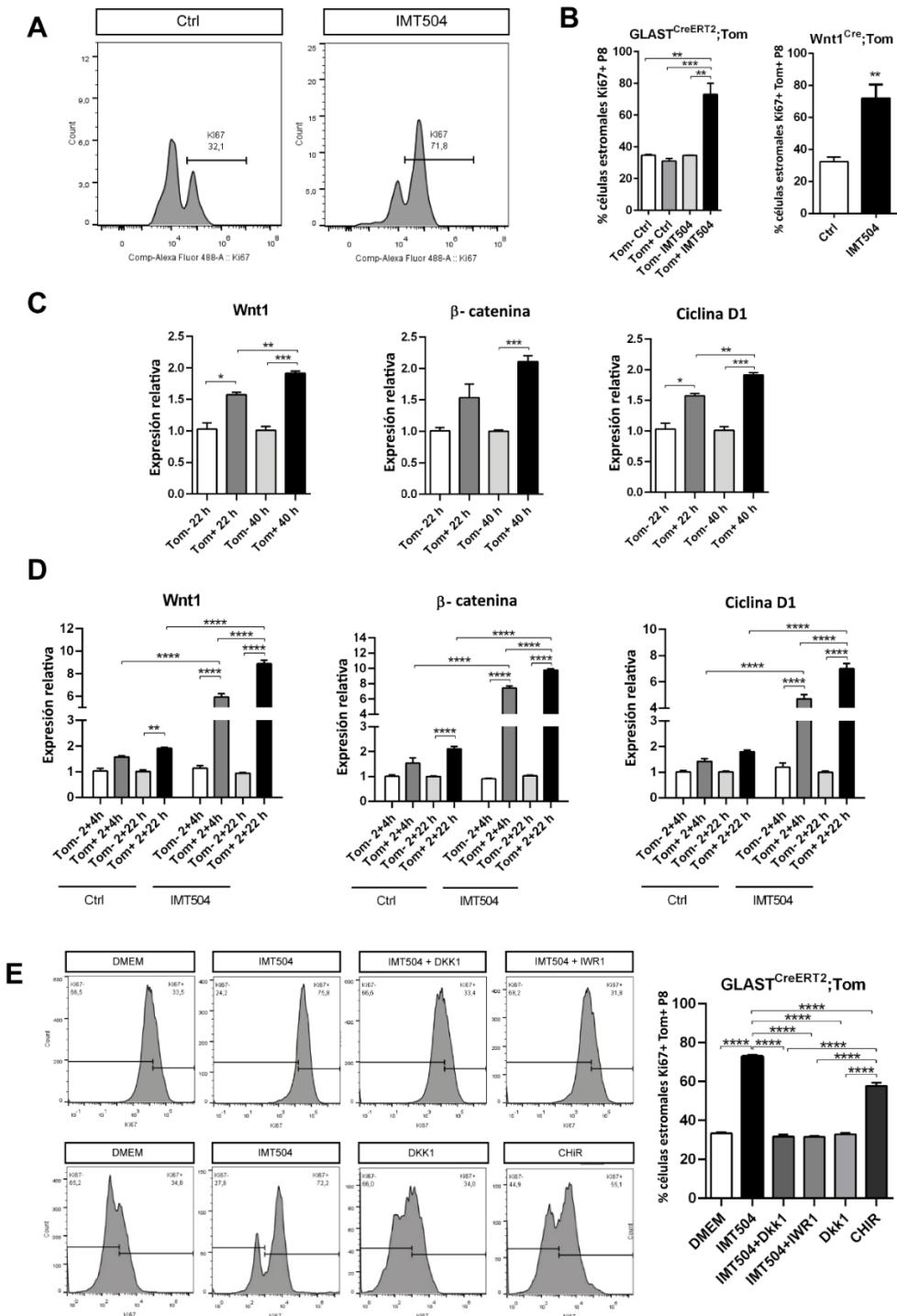
y considerando que la señalización Wnt es conocida por inducir la proliferación y movilización de diversos progenitores, nos planteamos si, en el adulto, los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs podrían aún expresar niveles más altos de Wnt1 y/o marcadores asociados a la vía de señalización Wnt en comparación con los BMSPs Tom<sup>-</sup>.

Para analizar esa posibilidad, se cultivaron células Tom<sup>+</sup> o Tom<sup>-</sup> a P8 en condiciones de semiconfluencia y se privaron de suero durante 22 o 40 horas. Posteriormente, las muestras fueron procesadas para análisis de qPCR. Notablemente, los niveles de expresión de ARNm de Wnt1 (ligando de la vía de Wnt),  $\beta$ -catenina (proteína que media la señalización nuclear de Wnt) y Ciclina D1 (gen blanco de la vía de señalización canónica de Wnt) (Tetsu & McCormick, 1999) fueron significativamente más altos en los BMSPs Tom<sup>+</sup> en comparación con los Tom<sup>-</sup> (**Figura 19C**). Además, los niveles de expresión aumentaron aún más tras tiempos prolongados de incubación en condiciones sin suero, mientras que permanecieron sin cambios en las células Tom<sup>-</sup>.

Sabiendo que la vía de señalización Wnt está activada específicamente en los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, nos preguntamos si esa vía podría ser modulada por IMT504 en dichos progenitores.

Para explorar esta hipótesis, las células Tom<sup>+</sup> o Tom<sup>-</sup> a P8 se incubaron con IMT504 o vehículo durante 2 horas, seguidas de un período adicional de 4 o 22 horas en un medio de cultivo sin suero, pero sin IMT504. Posteriormente, las muestras fueron recolectadas y procesadas para análisis de qPCR. Mientras que los niveles de ARNm de Wnt1 permanecieron sin cambios en las células Tom<sup>-</sup>, en las células Tom<sup>+</sup> tratadas con IMT504 se observó un aumento de 400 veces en los niveles de expresión de ese gen tras el tratamiento de 2+4 horas, con valores significativamente superiores en la condición de 2+22 horas (**Figura 19D**).

Un patrón similar se observó en los niveles de  $\beta$ -catenina y Ciclina D1. Además, otros genes regulados positivamente por Wnt, incluidos Axina2, Lef1 y Sp5, también mostraron un incremento en su expresión, junto con un pequeño pero significativo aumento en la expresión del ligando Wnt3a (**Figura 20**).

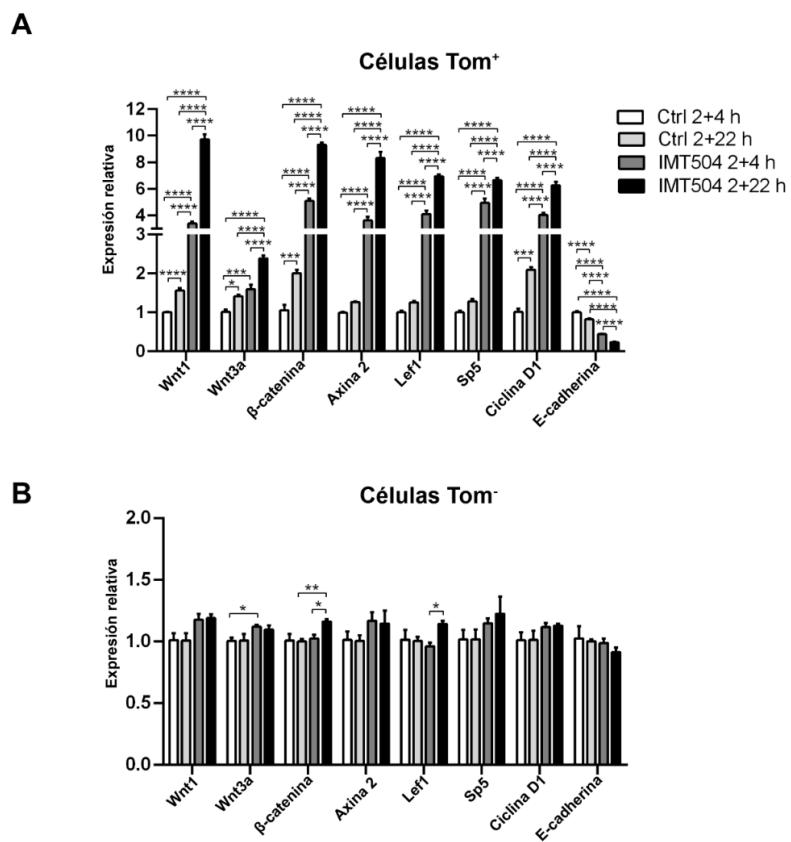


**Figura 19: Efecto de IMT504 en la proliferación de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs P8.** (A) Histogramas representativos de los análisis de citometría de flujo de células Tom<sup>+</sup> o Tom<sup>-</sup> inmunomarcadas para Ki67, y (B) comparaciones estadísticas entre diferentes condiciones experimentales. (C) Comparaciones estadísticas que muestran cambios en los niveles de expresión de ARNm de Wnt1, β-catenina y Ciclina D1, obtenidos mediante análisis de qPCR, entre las células Tom<sup>+</sup> y Tom<sup>-</sup>. Medido en porcentaje de cambio, relativizado a Tom<sup>-</sup> 22h. (D) Comparaciones estadísticas que muestran cambios en los niveles de expresión de Wnt1, β-catenina y Ciclina D1, obtenidos mediante análisis de qPCR, entre las células tratadas con vehículo (Ctrl) o IMT504. Medido en porcentaje de cambio, relativizado a Tom<sup>-</sup> 2+4h. (E) Figura esquemática experimental; histogramas representativos de los análisis de citometría de flujo de células Tom<sup>+</sup> inmunomarcadas para Ki67 y comparaciones estadísticas entre diferentes condiciones experimentales. (B-E) \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Tukey; n=6.

Para analizar si la vía de señalización Wnt está involucrada en la inducción de la proliferación de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs por IMT504, tratamos estas células con IMT504 y una combinación de Dkk1 (un antagonista de Wnt) o IWR1 (un inhibidor de Wnt). Este tratamiento bloqueó el efecto proliferativo de IMT504 (**Figura 19E**).

Además, la capacidad de IMT504 para inducir la proliferación de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs a través de la vía de Wnt se confirmó al incubar las células con CHIR, un activador específico de Wnt, lo que resultó en un aumento significativo en los niveles de proliferación de esos progenitores ( $57.83 \pm 2.8$  vs.  $33.41 \pm 1.19$ ; CHIR vs. DMEM;  $p < 0.0001$ ;  $n=3$ ; prueba t de Student).

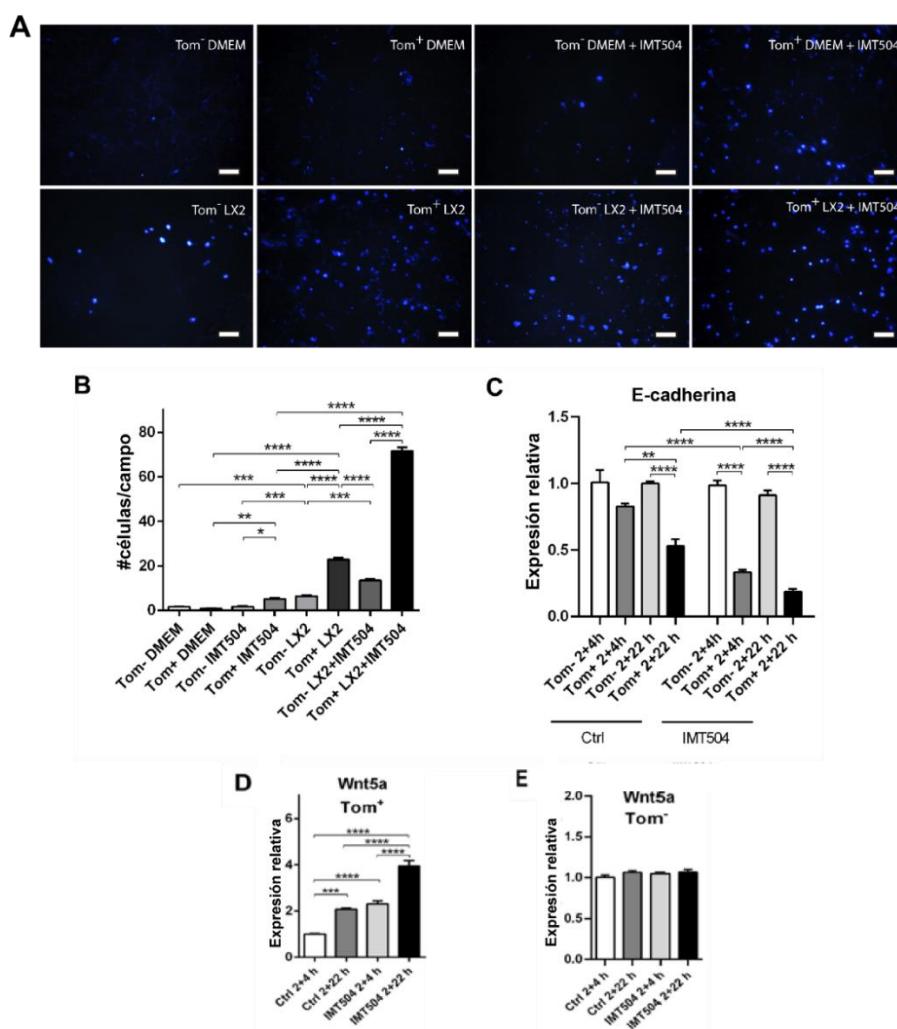
En conclusión, nuestros resultados sugieren que IMT504 estimula la proliferación de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs a través de la inducción de la vía de señalización Wnt.



**Figura 20: IMT504 induce la vía de señalización de Wnt en los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> BMSPs, pero no en los BMSPs Tom<sup>-</sup>, a P8. (A,B)** Análisis de las comparaciones estadísticas individuales de diferentes genes implicados en la vía de Wnt en células Tom<sup>+</sup> (A) y Tom<sup>-</sup> (B). Medido en porcentaje de cambio, relativizado al valor de Ctrl 2+4 h para cada gen. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; prueba de comparaciones múltiples de Tukey (o prueba de comparaciones múltiples de Dunn, en los análisis de CiclinaD1 y Lef1, en B);  $n=3$ .

### 5.1.6. Inducción de la movilización de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs expandidos *in vitro* mediante tratamiento con IMT504

Para evaluar si IMT504 podría aumentar la motilidad de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs a P8, realizamos un ensayo de cámara de Boyden *in vitro*. Los resultados mostraron que las células Tom<sup>+</sup> tratadas con IMT504 presentaron, en general, una mayor capacidad de movilización en comparación con las células Tom<sup>-</sup> (**Figura 21**).



**Figura 21: Efecto de IMT504 sobre la movilización de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs a P8.** (A) Imágenes representativas que muestran células teñidas con DAPI que atravesaron los poros de la membrana durante 4 horas en el ensayo de cámara de Boyden; en el compartimento inferior se colocó DMEM o medio condicionado de células LX2 (aHeSCs humanas). barras de escala: 50  $\mu$ m. (B) Comparaciones estadísticas; prueba de comparaciones múltiples de Tukey; n=5. (C) Comparaciones estadísticas de los cambios en los niveles de expresión de E-cadherina, medidos mediante qPCR, en células Tom<sup>+</sup> y/o Tom<sup>-</sup> pretratadas o no con IMT504; n=3. Medido en porcentaje de cambio, relativizado a Ctrl Tom<sup>-</sup> 2+4h. (D,E) Comparaciones estadísticas de los niveles de expresión de Wnt5a, medidos mediante qPCR, en células Tom<sup>+</sup> (D) y Tom<sup>-</sup> (E), tratadas con IMT504 o con el vehículo (control); n=3. Medido en porcentaje de cambio, relativizado a Ctrl 2+4h. (B-E) \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001; prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Notablemente, los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs tratados con IMT504 mostraron una mayor motilidad incluso en ausencia de quimioattractantes en el pocillo inferior, alcanzando niveles de motilidad similares a los de las células Tom<sup>+</sup> expuestas a medio condicionado de células LX2, una condición conocida por inducir la migración de células progenitoras estromales (Bayo et al., 2014). Por otro lado, la condición que mostró el mayor índice de movilización celular fue la de los BMSPs Tom<sup>+</sup> tratados con IMT504 y con medio condicionado de LX2 en el pocillo antes de colocar el filtro.

Es sabido que la vía de señalización canónica de Wnt regula la motilidad celular al disminuir la expresión de E-cadherina (Yue et al., 2018). De manera consistente, la incubación de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs con IMT504, seguida de una recuperación de 4 horas, redujo los niveles de expresión génica de E-cadherina en comparación con las células Tom<sup>+</sup> control. Esta reducción fue aún más pronunciada cuando las células Tom<sup>+</sup> fueron recolectadas 22 horas después de la estimulación con IMT504 (**Figura 21C**).

Además, el tratamiento prolongado de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en medio sin suero resulta en un aumento en los niveles de expresión de Wnt5a (ligando que estimula la vía no canónica de Wnt), e IMT504 indujo una mayor sobreexpresión de este mismo gen (**Figura 21D**).

Por otro lado, las células Tom<sup>+</sup> no mostraron cambios significativos en la expresión de E-cadherina ni de Wnt5a, independientemente del tratamiento con IMT504 (**Figura 20B y 21E**).

En resumen, los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs expandidos *in vitro* muestran mayor motilidad que otras subpoblaciones de BMSPs, y el tratamiento con IMT504 potencia significativamente esta propiedad. Esto podría explicar su mayor incidencia en la sangre periférica ante el daño hepático y el tratamiento con el ODN en animales *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup>.

### 5.1.7. Efecto de IMT504 y del medio condicionado obtenido a partir de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs sobre el perfil de expresión de varios tipos celulares hepáticos

Considerando el efecto antifibrótico observado del ODN y que los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs pueden secretar factores prorregenerativos (E. J. Fiore et al., 2015), investigamos si IMT504 y/o el medio condicionado (MC) de las células Tom<sup>+</sup> pretratadas con IMT504 podrían alterar de manera directa y específica el perfil de expresión génica de diferentes tipos celulares hepáticos implicados en la fibrosis.

Para ello, cultivamos macrófagos primarios aislados de hígados fibróticos y los incubamos con IMT504 o con MC de células Tom<sup>+</sup> o Tom<sup>-</sup> tratadas previamente con IMT504, incluyendo otros controles adicionales. Solo el tratamiento con IMT504 o el MC de las células Tom<sup>+</sup> tratadas con IMT504 lograron modificar el perfil de expresión de estos macrófagos. Estos pasaron de un fenotipo inflamatorio a uno tolerogénico, caracterizado por una reducción en los niveles de *Tnfa* y *Nos2* (iNOS), junto con un aumento en los niveles de ARNm de *Il10* y/o *Arg1*. Además, adquirieron un fenotipo prorregenerativo, evidenciado por el incremento en la expresión de HGF, siendo el tratamiento con IMT504 el que mostró un efecto más pronunciado en comparación con el MC de las células Tom<sup>+</sup> tratadas con IMT504 (**Figura 22**).

Bajo las mismas condiciones experimentales, tanto IMT504 como el MC de células Tom<sup>+</sup> tratadas con IMT504 fueron los únicos estímulos capaces de reducir el perfil de activación de las HeSCs CFSC-2G (**Figura 22**). Además, se observó un aumento en los niveles de expresión de HGF e IGF-I en hepatocitos primarios obtenidos de ratones CD1 naïve (**Figura 22**), lo que sugiere que estos factores podrían contribuir a favorecer la regeneración hepática.

Sin embargo, no se encontraron cambios en los niveles de ARNm de PCNA ni de  $\beta$ -catenina en estos hepatocitos, lo que indica que, aunque se produjo un aumento en la expresión de factores regenerativos en distintos tipos celulares, no hubo activación de la proliferación celular ni de las vías asociadas a  $\beta$ -catenina en las células hepáticas en las condiciones evaluadas.

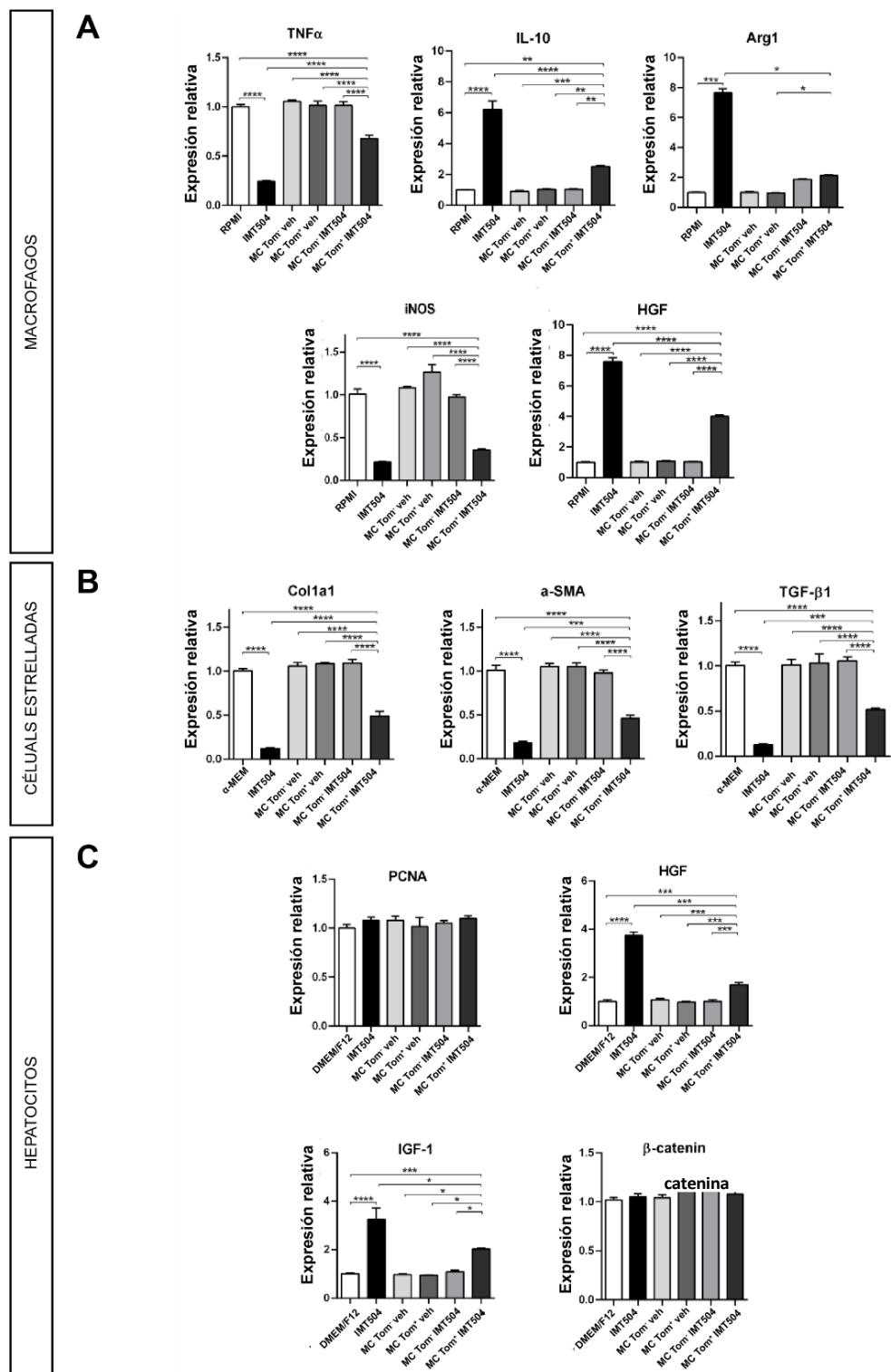
En conjunto, estos resultados sugieren que IMT504 tiene la capacidad de modular directamente el perfil de expresión de macrófagos, HeSCs y hepatocitos. Esto posiciona a IMT504 como una herramienta prometedora para mejorar la fibrosis hepática en modelos murinos. Además, la mayor prevalencia de células derivadas de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs inducida por el tratamiento con IMT504 podría desempeñar un papel relevante en este contexto, posiblemente mediado en parte por mecanismos parácrinos.

#### **5.1.8. IMT504 podría modular la expresión de genes profibrogénicos y proinflamatorios en el hígado de un paciente con cirrosis**

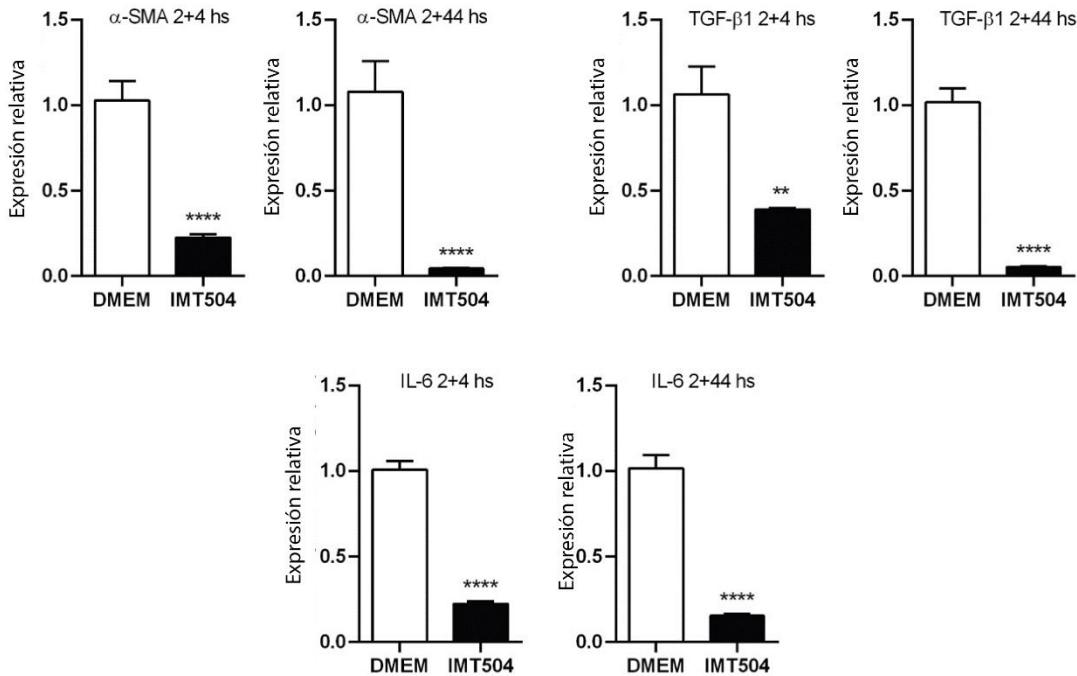
En colaboración con el servicio de Hepatología del Hospital Universitario Austral se analizó *ex vivo* el efecto del IMT504 en explantos de una muestra hepática obtenida de un paciente con cirrosis. La muestra fue fragmentada en piezas de 4 x 4 x 4 mm, que fueron colocadas en placas multiwell e incubadas con IMT504 (0,5 µg/mL) o vehículo por 2 horas, seguidas de un período de recuperación de 4 o 44 horas. Se realizaron análisis de expresión génica por qPCR para evaluar genes profibrogénicos y proinflamatorios.

A corto plazo, se observó una disminución significativa en los niveles de expresión de *ACTA2* (alfa-actina de músculo liso) y *TGFB1*, genes asociados con la activación de los miofibroblastos (**Figura 23**). Un patrón similar se detectó para *IL-6*, cuyos niveles elevados se correlacionan con inflamación crónica y, en consecuencia, con la activación de los miofibroblastos (**Figura 23**). A largo plazo, el efecto antifibrótico y antinflamatorio de IMT504 persiste, y su efecto pareciera ser incluso mayor.

Estos resultados indican que el tratamiento con IMT504 en explantos hepáticos de pacientes con cirrosis reduce significativamente la activación de miofibroblastos y la inflamación. Además, el efecto parece ser duradero, lo que sugiere una modulación sostenida de los procesos fibrogénicos y la proinflamatorios.



**Figura 22: Efecto de IMT504 o el medio condicionado de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs o de los BMSPs Tom- tratados con IMT504 o vehículo (veh) sobre el patrón de expresión de diferentes poblaciones celulares hepáticas. (A) Comparaciones estadísticas de los niveles de ARNm de TNF-α, IL-10, Arginasa 1, iNOS y HGF en macrófagos de cultivos primarios obtenidos de hígados fibrosos (TAA, 6 semanas) en los diferentes tratamientos experimentales, por qPCR. Medido en porcentaje de cambio, relativizado a RPMI. (B) Comparaciones estadísticas de los niveles de ARNm de colágeno 1a1, α-SMA y TGF-β en células CFSC-2G. Medido en porcentaje de cambio, relativizado a α-MEM. (C) Comparaciones estadísticas de los niveles de ARNm de PCNA, HGF, IGF-I y β-catenina en hepatocitos. Medido en porcentaje de cambio, relativizado a DMEM/F12. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001; prueba de comparaciones múltiples de Tukey; n=3.**



**Figura 23. IMT504 modula genes profibrogénicos y proinflamatorios en muestras de hígado cirrótico.** Comparaciones estadísticas de los niveles de expresión de *ACTA2*, *TGFB1* e *IL6* a corto (2+4 hs) y mediano (2+44hs) tiempo. Medido en porcentaje de cambio, relativizado a DMEM. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001; prueba de Mann-Whitney, n=3.

## 5.2. REGENERACIÓN HEPÁTICA

### 5.2.1. Aumento en la tasa de regeneración hepática después de una hepatectomía parcial inducida por IMT504

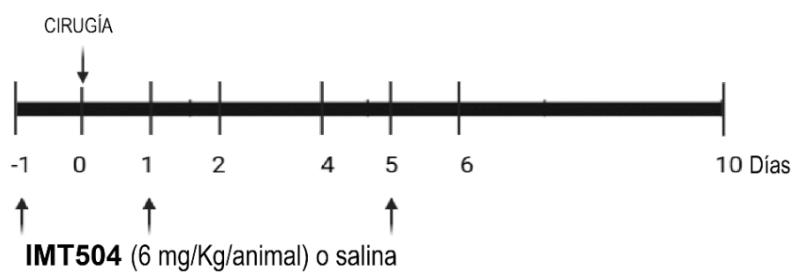
La regeneración hepática posterior a una hepatectomía parcial (PHx) es un proceso complejo y bien coordinado, en el que múltiples vías moleculares, celulares y factores de señalización interactúan para restaurar tanto la masa como la función del hígado (Fausto et al., 2006). Además de su capacidad para reducir o revertir la fibrosis hepática, como se ha descripto previamente en esta tesis, IMT504 ha demostrado un efecto significativo en la promoción de la regeneración hepática. Este oligonucleótido estimula la proliferación de hepatocitos y células endoteliales, posicionándose como un agente prometedor para favorecer la recuperación del tejido hepático dañado. Estas propiedades sugieren que IMT504 no solo regula la inflamación y la fibrosis, sino que también podría desempeñar un papel crucial en la restauración de la masa hepática tras eventos como una PHx.

Para evaluar el efecto de IMT504 sobre la tasa de regeneración hepática, se aplicó un modelo de PHx, en el que se resecó 2/3 de la masa hepática en ratones CD1 (aquellos que no heredaron los transgenes en los cruzamientos *GLASTCreERT2xRosa26Tom*). Estos ratones fueron tratados con IMT504 (0,4 mg/ml; 6 mg/kg/animal) o solución salina, y se evaluó la recuperación de la masa hepática a diferentes tiempos postcirugía. Se calcularon distintos parámetros de regeneración hepática y se realizaron análisis de expresión génica por qPCR.

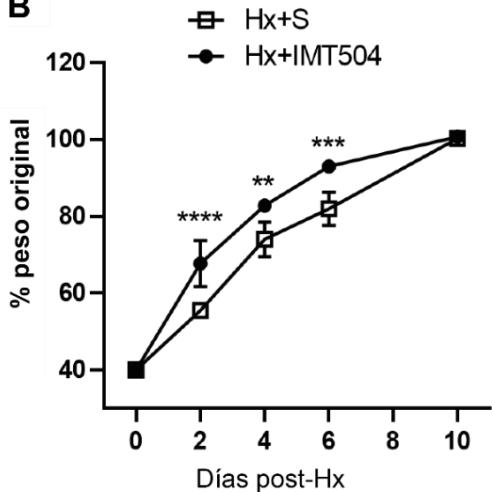
En primer lugar, se analizó al día 6º post-lesión el efecto del tratamiento de IMT504 sobre la ganancia de peso hepático, administrando el ODN un día antes o un día después de la cirugía. Ambas condiciones mostraron un efecto significativo en comparación con el control, pero el efecto fue ligeramente mayor, aunque no significativo cuando se administró postcirugía (**Figura 24C,E**). Por ese motivo, se adoptó este esquema para el análisis en los diferentes tiempos.

Los estudios de cinética de la recuperación de la masa hepática mostraron que la regeneración hepática fue mayor con IMT504 entre los días 2 y 6, en comparación con el grupo control (**Figura 24B**). A los 10 días, ambos grupos alcanzaron un valor aproximado del 100%, dado que entre los días 7 y 10 se recupera por completo la masa hepática en ratones (Zafarnia et al., 2019). En ambos grupos, la masa aumentó con el tiempo (comparando entre las distintas sobrevidas dentro de cada tipo de tratamiento; prueba de comparaciones múltiples de Tukey); sin embargo, en el grupo tratado con salina, la recuperación fue más lenta en comparación con el grupo tratado con IMT504. Este resultado se debe a la capacidad del hígado para regenerarse a sí mismo, ya que, incluso si se pierde una gran parte del órgano, las células progenitoras hepáticas pueden activarse, y los hepatocitos pueden entrar nuevamente en ciclo celular y restaurar su tamaño original (Pu & Zhou, 2022).

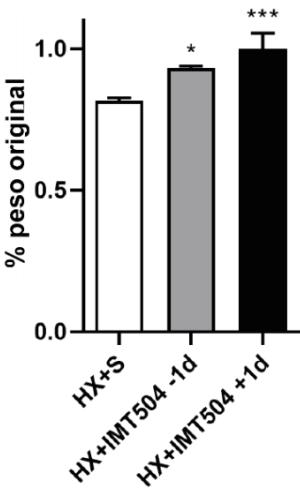
## A HEPATECTOMÍA PARCIAL



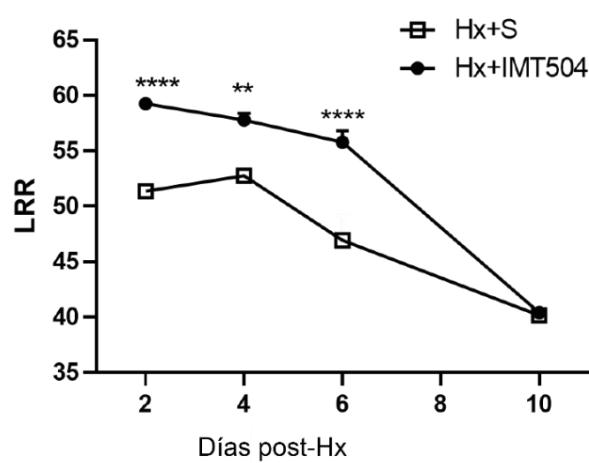
B



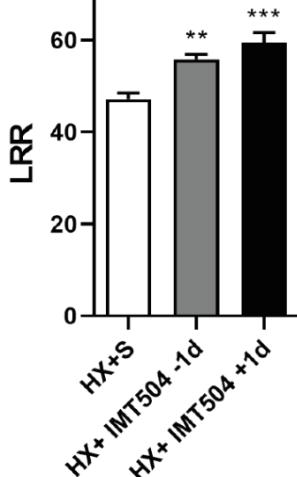
C



D



E



**Figura 24. IMT504 induce un aumento en la tasa de regeneración hepática después de una hepatectomía parcial.** (A) Representación gráfica del diseño experimental: la aplicación de IMT504 fue realizada en una dosis al día -1, 1 o 5 en relación con el momento de la lesión. (B) El gráfico muestra la recuperación de la masa hepática hasta el 100% después de la hepatectomía (Hx). \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Šidák; n=4. (C) Comparación gráfica de la proporción del tamaño original entre los grupos tratados con IMT504 1 antes o después de la cirugía. Note que la recuperación del peso original es mayor luego del tratamiento con el ODN. \*p<0,05; \*\*\*p<0.001; prueba t-student no apareada; n=4. (D) Tasa de regeneración hepática a distintos tiempos post-hepatectomía. \*\*\*p<0.01; \*\*\*\*p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Šidák; n=4. (E) Comparación gráfica de la tasa de regeneración hepática entre los grupos tratados 1 día antes o 1 día después de la cirugía. \*\*p<0.01; \*p<0.001; prueba t-student no apareada; n=4.

En cuanto al parámetro de la tasa de regeneración hepática, los índices fueron notablemente superiores entre los 2 y los 6 días post-lesión en el grupo tratado con IMT504 (**Figura 24D**). Interesantemente, se observó una reducción significativa en la tasa de regeneración hepática a los 6 días post-hepatectomía en el grupo control ( $p<0.001$ ; comparado con los días 2 y 4 post-lesión; prueba de comparaciones múltiples de Tukey). En cambio, este parámetro se mantuvo invariable en los primeros 6 días en la condición de IMT504 ( $p>0.5$ ). A los 10 días post-resección, las diferencias entre los grupos desaparecieron, alcanzando ambos valores similares. En resumen, el tratamiento con IMT504 acelera la recuperación de la masa hepática, logrando una regeneración más rápida de lo que ocurriría de manera natural. Por otro lado, el tratamiento con IMT504 no interfiere con la capacidad del organismo de regular la masa hepática necesaria.

### **5.2.2. Inducción de la proliferación de hepatocitos después de la hepatectomía parcial por tratamiento con IMT504**

La regeneración hepática tras una PHx es un proceso crucial que permite al hígado restaurar tanto su masa como su funcionalidad ante la pérdida de tejido (Yagi et al., 2020). En modelos murinos, este proceso es altamente eficiente, siendo los hepatocitos, gracias a su capacidad de autorrenovación, las principales células responsables de proliferar para reparar el tejido perdido. En estos modelos, los hepatocitos inician rápidamente la división celular, alcanzando su pico de proliferación entre el día 2 y día 3 postcirugía. Este proceso involucra sucesivas rondas de proliferación que aseguran una recuperación eficiente de la masa hepática, permitiendo que el órgano recupere su funcionalidad en un tiempo relativamente corto. Los hepatocitos preexistentes muestran una notable capacidad regenerativa, respondiendo de manera organizada y controlada al estímulo proliferativo, lo que resalta su papel central en la regeneración después de la resección parcial del hígado (Du et al., 2022; Pu & Zhou, 2022).

En el apartado anterior se constató que IMT504 acelera la recuperación de la masa hepática tras la resección quirúrgica del 60% del hígado en un modelo experimental en ratones. Para investigar los mecanismos subyacentes a este efecto, se realizaron análisis histológicos con el fin de evaluar si este ODN induce

un aumento en la división celular de los hepatocitos como parte del proceso regenerativo. Seis días después de la intervención quirúrgica, los ratones CD1 de ambos grupos experimentales, tratados con IMT504 y sus respectivos controles, fueron sacrificados para realizar estudios histológicos detallados. Estos análisis incluyeron la tinción con hematoxilina y eosina, utilizada para evaluar el índice mitótico mediante la cuantificación del número de células en mitosis por campo, y la inmunomarcación del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), que permite identificar los hepatocitos en fase de proliferación.

Los resultados obtenidos revelaron que, al sexto día post-hepatectomía, el tratamiento con IMT504 se asocia con un aumento significativo en la proliferación de hepatocitos. Esto se evidenció mediante un mayor índice mitótico y un incremento en la cantidad de núcleos positivos para PCNA por campo en los cortes histológicos analizados (**Figura 25A-D**). Estos hallazgos sugieren que IMT504 no solo acelera la recuperación de la masa hepática, sino que también estimula de manera efectiva la actividad proliferativa en las células hepáticas, contribuyendo a una regeneración más robusta en etapas avanzadas del proceso.

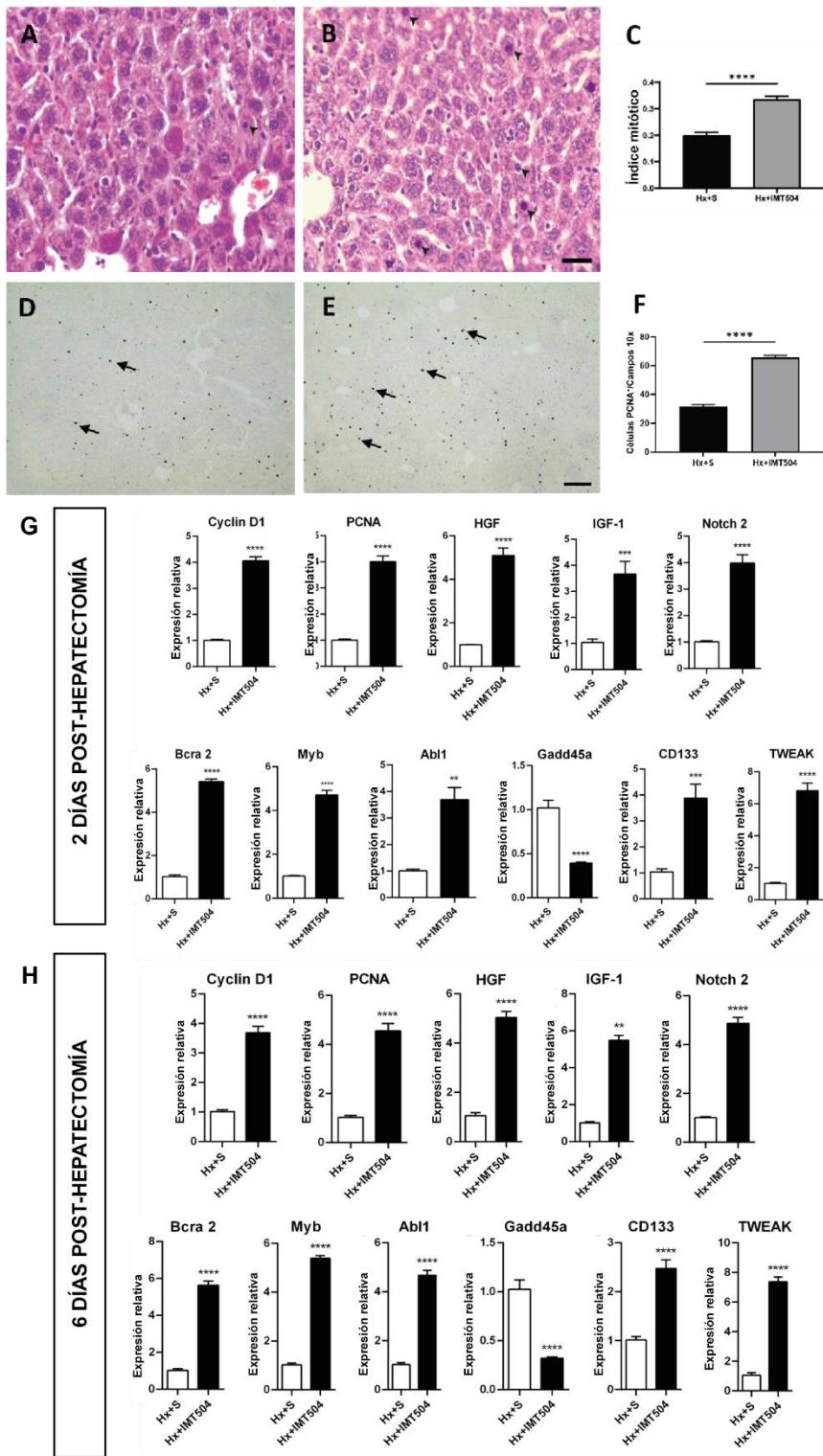
Paralelamente, se realizaron estudios moleculares por qPCR para analizar genes clave en la regeneración hepática. Estos estudios se llevaron a cabo en animales sometidos a hepatectomía y tratados con IMT504 o vehículo un día después de la cirugía, evaluándose los resultados a los 2 y 6 días posteriores a la resección. El tratamiento con el ODN indujo la sobreexpresión de varios marcadores involucrados en la regeneración hepática, observándose un patrón similar tanto en el tiempo temprano (día 2) como en el tiempo tardío (día 6) tras la hepatectomía (**Figura 25E-F**).

En cuanto a la proliferación de hepatocitos y hepatoblastos, se observó un aumento significativo en la expresión de *Pcna*, un marcador clave en la regeneración hepática (Kong et al., 2021); *Hgf*, que estimula la proliferación y activación de hepatocitos (Kong et al., 2021); *Ccnd1*, que regula la progresión del ciclo celular (Pu & Zhou, 2022), y *Notch2*, un gen que regula la regeneración hepática promoviendo la diferenciación celular de células progenitoras (Bedi et al., 2013; Ortica et al., 2014). Respecto a la función hepática, *Igf1*, un factor clave en la proliferación celular y la restauración de la función hepática, también mostró

un aumento consistente en ambos tiempos (E. Fiore et al., 2016). En relación con la síntesis y reparación del ADN, *Gadd45α* presentó una disminución, lo que es consistente con su función en la regulación de la reparación del ADN bajo condiciones de estrés y su participación en la apoptosis, siendo además un gen que regula negativamente la proliferación celular (Gramantieri et al., 2005). Otros genes relacionados con la reparación y la síntesis de ADN, como *Myb*, *Bcra2*, y *Alb1* (Asimakopoulos et al., 1999; Levenson et al., 2000; Patel et al., 1998), también aumentaron su expresión en ambos tiempos, sugiriendo un proceso continuo de restauración y funcionalidad hepática.

Finalmente, los genes *Prom1* (CD133) y *Tnfsf12* (TWEAK), que están asociados con las células progenitoras hepáticas (Rountree et al., 2007; Thomas et al., 2011), también mostraron una regulación positiva en ambos tiempos, lo que sugiere que IMT504 induce una mayor participación activa de estas células durante la regeneración hepática.

Estos resultados sugieren que una sola dosis temprana de IMT504 acelera la regeneración hepática, ejerciendo un efecto positivo sostenido en la proliferación de hepatocitos, la posible activación de progenitores hepáticos y la mejora en la función hepática durante las fases tempranas y tardías de la regeneración hepática.



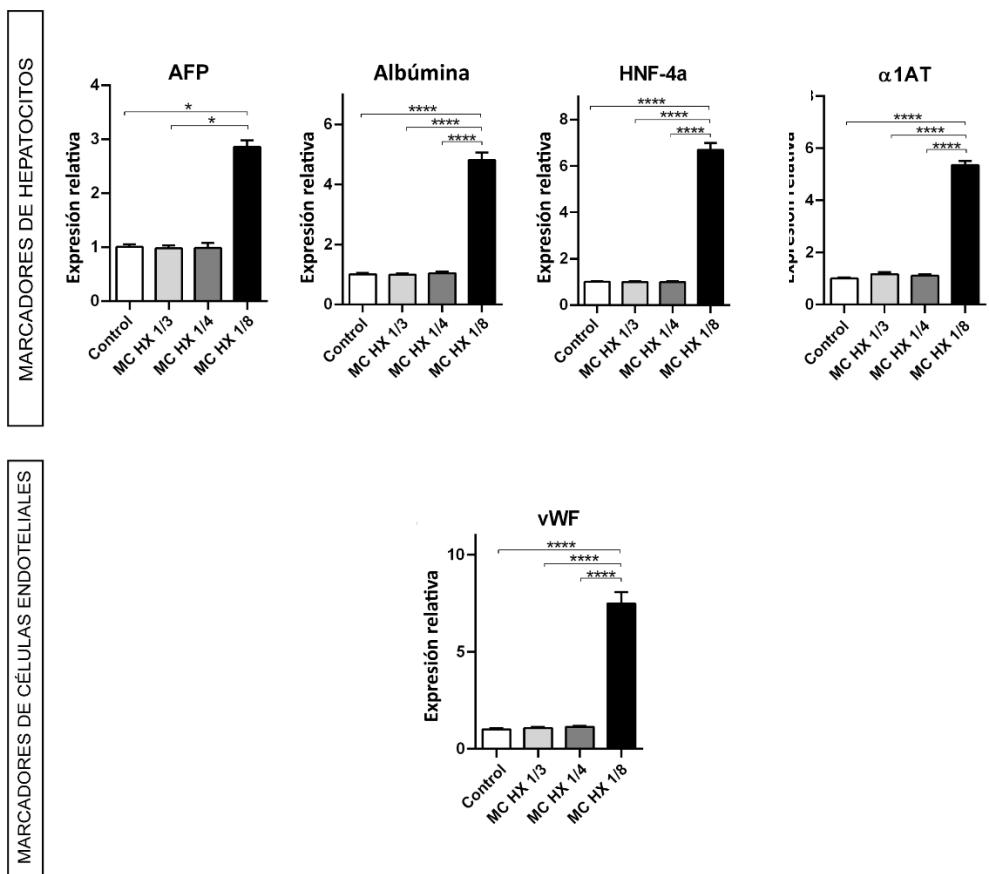
**Figura 25. IMT504 induce un aumento en la proliferación de hepatocitos tras la hepatectomía parcial.** **(A,B)** Microfotografías representativas (400x) correspondientes a secciones teñidas con hematoxilina y eosina que muestran figuras mitóticas en las condiciones Hx+S (A) y Hx+IMT504 (B). **(C)** Comparación estadística: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.0001; prueba t-student no apareada; n=4. Barra de escala: 100  $\mu$ m. **(D,E)** Microfotografías representativas (200x) de secciones inmunomarcadas para PCNA en las condiciones Hx+S (D) y Hx+IMT504 (E). **(F)** Comparación estadística: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.0001; prueba t-student no apareada; n=4. Barra de escala: 200  $\mu$ m. **(G,H)** IMT504 induce la expresión de genes asociados con la proliferación y con la activación de células progenitoras en el hígado a los 2 (G) y 6 días (H) después de la hepatectomía. Medido en porcentaje de cambio, relativizado a Hx+S. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,0001; prueba t no apareada; n=4.

### 5.2.3. Adquisición de marcadores de hepatocitos y células endoteliales por parte de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs *in vitro*

En una tesis doctoral previa de nuestro grupo de investigación, demostramos que, al inyectar por la vena de la cola la fracción mononuclear de la médula ósea de ratones *Wnt1*<sup>Cre</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> en ratones atípicos sometidos a PHx 5 días antes, estas células adquirieron marcadores específicos de células endoteliales y de hepatocitos en el hígado, según análisis de citometría (no mostrado). Al día siguiente del trasplante, las células Tom<sup>+</sup> presentes en la fracción no parenquimática adquirieron la expresión de CD31, mientras que la mitad de las células Fibronectina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> expresaron Albúmina en la fracción parenquimática. A los cinco días postrasplante, todas las células Fibronectina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> coexpresaron Albúmina.

Estos datos, junto con los presentados en esta tesis y los antecedentes del grupo, sugieren una gran plasticidad de estas células. Para avanzar en la evaluación del grado de plasticidad de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, aplicamos un protocolo de inducción de la expresión de marcadores de los linajes de hepatocitos y células endoteliales en cultivos enriquecidos en BMSPs Tom<sup>+</sup> obtenidos de ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (Tx P2), a pasaje 8, empleando medio condicionado de hepatectomías. Como primer enfoque, utilizamos diversas diluciones del medio condicionado de hígado hepatectomizado (1/2, 1/4 y 1/8; en DMEM baja glucosa+2% SFB+2mM L-glutamina+0,2% penicilina-estreptomicina) durante 7 días. Para evaluar posibles cambios en los perfiles de expresión, analizamos los marcadores de hepatocitos *Afp*, *Alb*, *Hnf4* y *Serpin1c* (alfa1 anti-tripsina), así como los marcadores endoteliales *Vwf* y *Pecam1*. Con la excepción de *Pecam1*, se observó un aumento en la expresión génica de todos los marcadores analizados, cuando se utilizó la dilución 1/8 de medio condicionado (**Figura 26**).

Estos resultados sugieren que, en un protocolo breve de 7 días, el medio condicionado de hígado hepatectomizado promueve la expresión de marcadores de hepatocitos en los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, incluyendo la albúmina, asociada con una funcionalidad hepática específica, y probablemente también favorece la expresión de marcadores de células endoteliales.



**Figura 26. Inducción de marcadores de hepatocitos y células endoteliales tras la incubación en medio condicionado de hígado hepatectomizado.** Comparaciones estadísticas de los análisis de qPCR. Medido en porcentaje de cambio con relación a Control. \* $p<0.05$ ; \*\*\*\* $p<0.0001$ ; prueba de comparaciones múltiples de Tukey;  $n=4$ .

#### 5.2.4. Aumento en la contribución de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs con HLCs y ELCs mediado por IMT504 tras una hepatectomía parcial

Como se describió anteriormente en esta tesis, IMT504 induce la movilización de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs desde la médula ósea hacia la sangre periférica, incrementando la presencia de células Tom<sup>+</sup> con fenotipo de hepatocitos y células endoteliales. Nuestros datos sugieren que este proceso contribuye a la regeneración hepática en modelos de fibrosis. Asimismo, tras una PHx en ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (TxP60), se han detectado células Tom<sup>+</sup> con características de hepatocitos y células endoteliales, las cuales presumiblemente derivan de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs (Sierra et al., 2020).

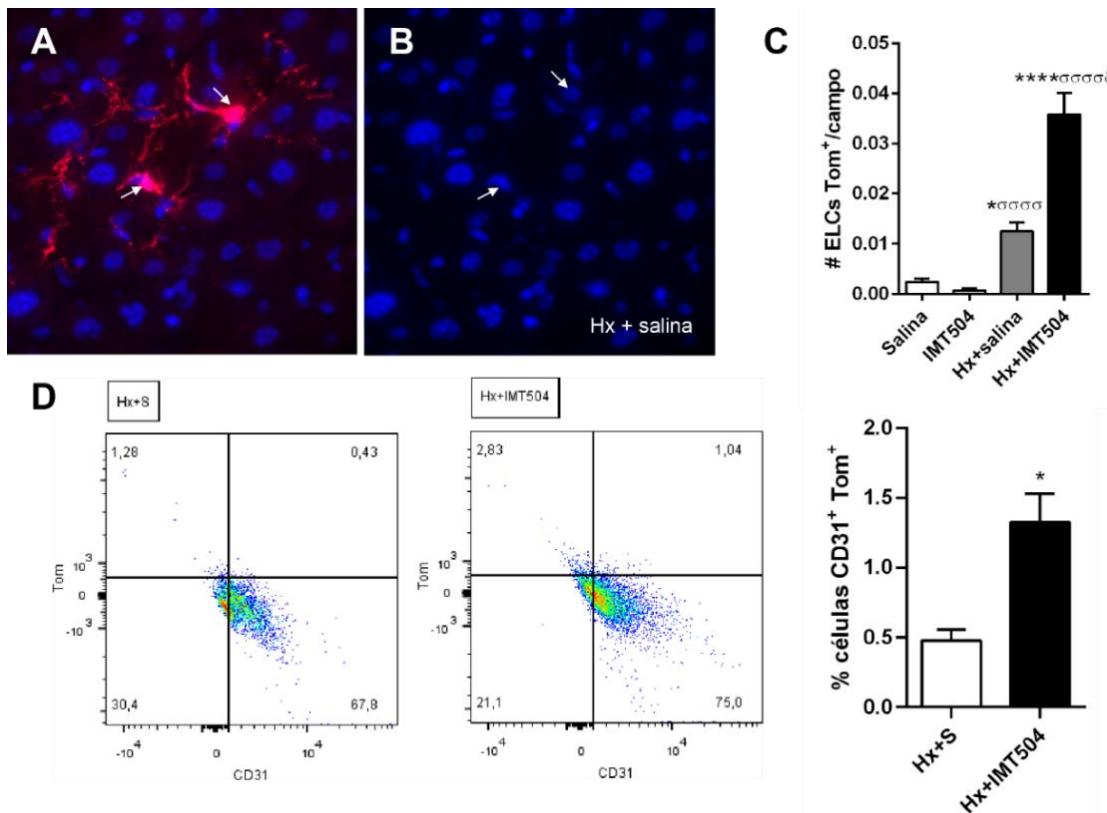
En este apartado, se busca analizar si IMT504 podría ejercer un efecto similar en la regeneración hepática tras una PHx en ratones doble transgénicos,

potenciando la contribución de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en la reparación del hígado.

En la tesis presentada anteriormente por la Dra. Romina Sierra, y en relación con el experimento descripto en el ítem anterior, se aplicó IMT504 a algunos ratones *Wnt1<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>Tom</sup>* seis horas antes de la obtención de las células mononucleares de la médula ósea (BM-MNCs). Posteriormente, estas células fueron inyectadas en la vena de la cola de ratones atípicos, sometidos a PHx cinco días antes. Al día siguiente del trasplante, el tratamiento con IMT504 indujo un aumento significativo en la proporción relativa de células CD31<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> en la fracción no parenquimática, así como de células Fibronectina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> en la fracción parenquimática (no mostrado).

En esta tesis, buscamos confirmar esos resultados realizando PHx del 60% en ratones *GLAST<sup>CreERT2</sup>; Rosa26<sup>Tom</sup>* (TxP60), siguiendo protocolos previamente establecidos (Mitchell & Willenbring, 2008; Sierra et al., 2020). Cinco días de la cirugía, se administró IMT504 (0,4 mg/ml; 6 mg/kg/animal) o solución salina como control. Los animales fueron sacrificados a los 10 días post-hepatectomía para llevar a cabo estudios histológicos y análisis por citometría de flujo, con el objetivo de evaluar el fenotipo y la incidencia de células Tom<sup>+</sup> en el hígado.

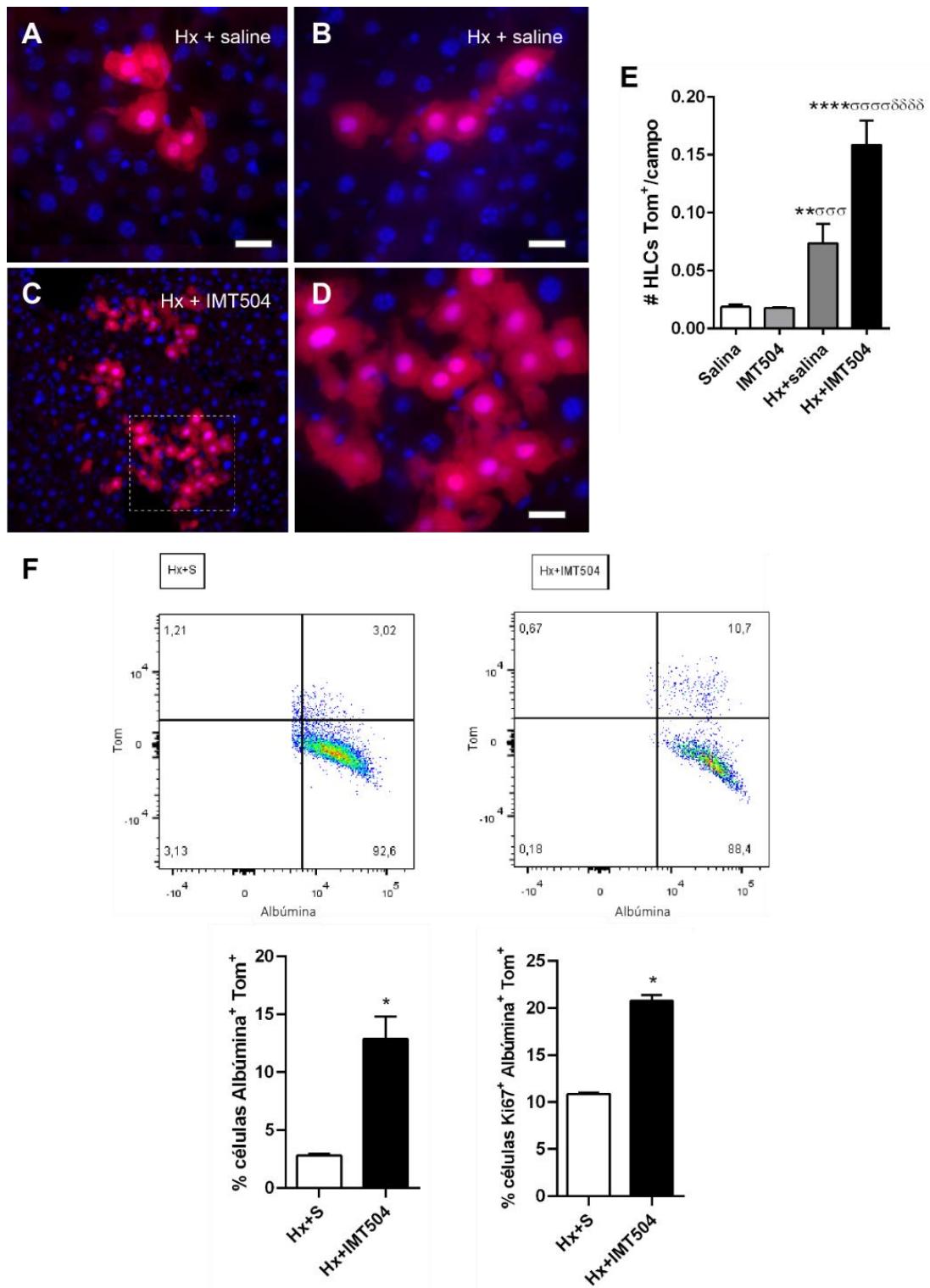
Los análisis histológicos revelaron una mayor incidencia de células Tom<sup>+</sup> en los hígados hepatectomizados de animales tratados con IMT504, presentando características de células endoteliales (**Figura 27A-C**) y hepatocitos (**Figura 28A-E**), en comparación con los controles. Por citometría de flujo, se observó un aumento significativo en la frecuencia relativa de ELCs CD31<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> (**Figura 27D**) y de HLCs Albúmina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> (**Figura 28F**) en los animales tratados con IMT504 en comparación con aquellos tratados con vehículo.



**Figura 27. IMT504 aumenta la contribución de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs con células de tipo endotelial después de una hepatectomía parcial. (A-B)** Microfotografías representativas que muestran ELCs Tom<sup>+</sup> en ratones hepatectomizados GLAST<sup>CreERT2</sup>; Rosa26<sup>Tom</sup> (TxP60); azul: tinción nuclear con Hoechst. **(C)** Comparaciones estadísticas. \*<sup>†</sup>p<0.05; \*\*\*\*, \*\*\*p<0.0001; \*vs. solución salina; <sup>†</sup>vs. IMT504; <sup>‡</sup>vs. HX+salina; prueba de comparación múltiple de Tukey; n=4. **(D, izquierda)** Dotplots representativos de estudios por citometría de flujo. **(D, derecha)** Comparaciones estadísticas, a partir de los resultados de las citometrías de flujo; n=4. \*p<0.05; prueba de Mann-Whitney.

El tratamiento con IMT504 indujo la proliferación de las HLCs Tom<sup>+</sup> a los 10 días post-hepatectomía (**Figura 28F**), cuando el hígado alcanzó el 100% de su masa original.

Los resultados indican que el tratamiento con IMT504 en ratones hepatectomizados aumenta significativamente la proporción relativa de las ELCs y HLCs Tom<sup>+</sup> en el órgano lesionado y estimula la proliferación tardía de las HLCs Tom<sup>+</sup>, destacando su rol en la regeneración hepática en este modelo experimental.



**Figura 28. IMT504 aumenta la contribución de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs con células similares a hepatocitos después de una hepatectomía parcial.** (A-D) Microfotografías representativas que muestran HLCs Tom<sup>+</sup> en ratones hepatectomizados *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (TxP60) inyectados con vehículo (A, B) o IMT504 (C, D); (D) es una mayor magnificación de una zona de (C). (E) Comparaciones estadísticas. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*, oooooooooooo p<0.0001; \*vs. solución salina; <sup>a</sup>vs. IMT504; <sup>b</sup>vs. HX+solución salina; prueba de comparaciones múltiples de Tukey; n=4. (F, izquierda) Dotplots representativos de los estudios por citometría de flujo. (F, derecha) Comparaciones estadísticas del porcentaje de células Albúmina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> HLCs; n=4. Y del porcentaje de células Ki67<sup>+</sup> entre el total de células Albúmina<sup>+</sup> Tom<sup>+</sup> HLCs, a partir de los análisis por citometría de flujo; n=4. \*p<0.05; prueba de Mann-Whitney.

# **DISCUSIÓN**

## 6. DISCUSIÓN

En los últimos años, se ha demostrado que IMT504 induce efectos beneficiosos en modelos experimentales de diversas enfermedades, como la diabetes, el dolor, la esclerosis múltiple y la sepsis (M. S. Bianchi et al., 2010; Casadei et al., 2021; Chahin et al., 2015; Mathieu et al., 2024). Estos efectos se atribuyen principalmente a su capacidad inmunomoduladora y a su potencial para promover procesos de regeneración tisular.

En este contexto, el presente estudio se centró en analizar el impacto de IMT504 en la fibrogénesis y la regeneración hepática, dos procesos en los que la modulación de la respuesta inmune desempeña un papel crucial (Lowe et al., 2023). Dado que la inflamación crónica y la activación de células inmunes son factores determinantes tanto en el desarrollo de la fibrosis hepática como en la capacidad regenerativa del hígado, se investigó cómo IMT504 podría influir en estos mecanismos para favorecer la reparación del tejido hepático. La evidencia presentada en este trabajo sugiere que el efecto beneficioso de IMT504 sobre la fibrosis hepática trasciende su papel inmunomodulador, como se discutirá a continuación.

Los resultados obtenidos en modelos murinos presentados en esta tesis demuestran que IMT504 inhibe el desarrollo de la fibrosis hepática al reducir la deposición de colágeno, fomentar la proliferación de hepatocitos y modular la respuesta inflamatoria. Este efecto se manifiesta mediante una disminución de los marcadores profibrogénicos y proinflamatorios, junto con un incremento en los marcadores tolerogénicos y la activación de células progenitoras hepáticas. Nuestros hallazgos sugieren que IMT504 no solo previene la fibrosis, sino que también promueve la regeneración hepática al aumentar la proliferación de hepatocitos en los distintos modelos experimentales estudiados.

Además, la administración del ODN en un modelo hepatotóxico inducido por tioacetamida acelera la regresión de una fibrosis hepática establecida, asociándose con cambios tempranos en el patrón de expresión de marcadores de inflamación, fibrosis y regeneración. Estos cambios son similares a los observados cuando el ODN se administró en estadios iniciales de la fibrosis

hepática. Algunos de estos parámetros alcanzaron niveles normales dos semanas después del tratamiento con IMT504.

Estos resultados refuerzan el efecto antifibrótico de IMT504 y su capacidad para promover la regeneración hepática a través de la modulación inflamatoria y la proliferación celular.

Los procesos desencadenados y los datos obtenidos en esta tesis sugieren un rol pleiotrópico de este ODN, que incluye, pero no se limita a, su capacidad de actuar directa y simultáneamente sobre los diversos tipos celulares involucrados en la fibrosis hepática. En particular, IMT504 podría influir sobre los macrófagos fibrogénicos, las aHeSCs, los hepatocitos y los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, modificando su perfil de expresión génica y sus propiedades fisiológicas. Esto contribuye a la modulación del microambiente hepático y a la promoción de la regeneración tisular. No se puede descartar la posibilidad de que IMT504 tenga efectos sobre otras células troncales no analizadas en este estudio, que expresen o no el gen reportero en los animales analizados.

Interesantemente, el tratamiento con IMT504 en explantos hepáticos obtenidos de un primer paciente, quien fue trasplantado debido a una cirrosis avanzada, resultó en una disminución significativa de entre un 80% y un 95% en marcadores de fibrosis e inflamación. Este efecto notable se observó a las 6 horas de haber iniciado el tratamiento, y su intensidad aumentó en las muestras después de 46 horas de incubación. Este resultado subraya que IMT504 tiene sobre el tejido hepático humano efectos al menos similares a los observados en modelos murinos. Estos hallazgos nos alientan a avanzar hacia una posible aplicación terapéutica experimental en pacientes con cirrosis y otras patologías que puedan involucrar mecanismos similares.

La persistencia del efecto sugiere que IMT504 podría contribuir a una mejora sostenida en el microambiente hepático de los pacientes, favoreciendo la regeneración y reduciendo los procesos fibrosis e inflamación asociados.

En tan solo un día después de la administración subcutánea de IMT504 en ratones, se observa un cambio notable en el perfil de expresión del hígado, pasando de un estado proinflamatorio a uno tolerogénico. Este cambio va acompañado de una disminución significativa en los marcadores asociados con

la fibrosis, lo que indica una reducción en los procesos que favorecen la formación de tejido cicatricial. Además, se aprecia un aumento considerable en la proliferación y funcionalidad de los hepatocitos, lo que sugiere que IMT504 no solo ayuda a reducir la inflamación, sino que también favorece la regeneración y el buen funcionamiento del hígado.

La evidencia presentada en este trabajo sugiere que el aumento en la proliferación de hepatocitos observado luego del tratamiento con IMT504 podría deberse al efecto de este ODN sobre los hepatocitos y macrófagos fibróticos, debido al aumento en la expresión de HGF y la reducción de las especies reactivas de oxígeno, conocidas por su papel en el microambiente proinflamatorio (Nishikoba et al., 2020; Sharma et al., 2023). Un equilibrio dinámico entre la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la enzima arginasa-1 (ARG1), regulado por el estado redox hepático, es crucial en estos procesos (Pesce et al., 2009). La iNOS cataliza la producción de óxido nítrico, una molécula con funciones proinflamatorias, mientras que la ARG1 metaboliza la L-arginina en urea y L-ornitina, modulando la respuesta inmune y promoviendo la proliferación celular (Iwakiri, 2015; M. Zhang et al., 2023). La actividad equilibrada de iNOS y ARG1 es crucial para mantener la homeostasis hepática y promover la regeneración. ARG1 reduce las especies reactivas de oxígeno (ROS) al limitar la disponibilidad de L-arginina para iNOS, cuya actividad desregulada puede generar un exceso de óxido nítrico (NO). Este exceso, combinado con ROS, favorece la formación de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), una molécula altamente reactiva y tóxica que contribuye significativamente al estrés oxidativo y al daño celular (Iwakiri, 2015). Este equilibrio reduce los niveles de ROS, lo que ayuda a mitigar el daño celular y favorece un ambiente menos proinflamatorio, contribuyendo a un entorno regenerativo.

Curiosamente, varios de los mecanismos descritos en esta tesis son muy similares a los reportados en nuestros estudios previos, en los que BMSCs murinas modificadas para expresar exógenamente IGF-I fueron aplicadas en el contexto de la fibrosis hepática (E. Fiore et al., 2016). Aunque los efectos observados para IMT504 parecen ser aún superiores, esto sugiere que ambas estrategias comparten mecanismos comunes para la regeneración hepática.

En el contexto de la regeneración hepática, hemos analizado el efecto de IMT504 en el modelo de PHx en ratones. Basándonos en su efecto inductor sobre la proliferación de hepatocitos, nos preguntamos si IMT504 podría ser útil en el futuro para tratar la problemática quirúrgica de la condición *small-for-size*. Nuestros resultados indican que este ODN acelera la recuperación de la masa hepática, promoviendo una regeneración más rápida en comparación con los procesos fisiológicos normales. Este efecto podría atribuirse principalmente a la capacidad de IMT504 para inducir un aumento en la proliferación celular post-hepatectomía.

De hecho, estudios previos han demostrado que ciertos compuestos pueden acelerar la regeneración hepática mediante la modulación de la proliferación de hepatocitos, lo que conduce a una recuperación más rápida de la masa hepática (Desbarats & Newell, 2000; Peters et al., 2000). Además, se ha observado que la activación de vías de señalización clave, como las de crecimiento y la reparación celular, facilita una regeneración hepática acelerada (Hora & Wuestefeld, 2023; Pibiri & Simbula, 2022; Zhao et al., 2022). Uno de los mecanismos más relevantes implicados en la aceleración de la regeneración observada podría ser el aumento significativo en los niveles de expresión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Se ha reportado que dosis altas de HGF estimulan un aumento en el tamaño del hígado, promoviendo la mitogénesis (Burr et al., 1998; Uchiyama et al., 1999).

La literatura actual sugiere que la médula ósea es la principal fuente de progenitores estromales circulantes, debido a las condiciones de bajos niveles de oxígeno que caracterizan su microambiente. Estas condiciones podrían favorecer una mayor capacidad esos progenitores para detectar y para activarse ante variaciones pequeñas en los gradientes de moléculas liberadas por órganos dañados o en proceso de remodelación. Además, dicho entorno podría favorecer que algunas subpoblaciones de BMSPs presenten una mayor plasticidad celular, lo que les permitiría originar hepatocitos, células endoteliales e incluso otros linajes celulares (Aquino et al., 2021; He et al., 2007; Hong et al., 2009). Esto facilitaría el acceso, en el adulto, a células potencialmente útiles para estrategias terapéuticas de reemplazo tisular o para el establecimiento de sistemas de organoides *in vitro* con potencial aplicación en estudios farmacológicos.

En una publicación previa de nuestro laboratorio, especulamos que los progenitores estromales circulantes Tom<sup>+</sup> en ratones *Wnt1<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>Tom</sup>* pueden originarse en la médula ósea. Esta hipótesis se basa en la observación de que las células estromales Tom<sup>+</sup> presentes tanto en la médula ósea como en la sangre periférica de esos ratones doble-transgénicos coexpresan GLAST, CD44 y fibronectina. Además, después de una lesión se observa una disminución en la proporción relativa de estas células en la médula ósea y un aumento en el torrente sanguíneo.

Por otro lado, previamente en nuestro laboratorio habíamos demostrado, al trasplantar BM-MNCs obtenidas de ratones *Wnt1<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>Tom</sup>* en ratones atípicos que habían sido hepatectomizados 5 días antes, que las células Tom<sup>+</sup> adquieren marcadores de hepatocitos y de células endoteliales. Además, el cultivo *in vitro* de GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs con medio condicionado de hígados hepatectomizados resulta en la adquisición de marcadores específicos de hepatocitos y de células endoteliales. Dado que estas células, al diferenciarse *in vivo* o *in vitro* en hepatocitos, expresan albúmina, al menos podemos afirmar que cumplen con algunas de las características funcionales de dichos hepatocitos.

Además, tras ocho semanas de tratamiento con TAA, se observaron números similares de células ELCs Tom<sup>+</sup> y HLCs Tom<sup>+</sup> en ratones *Wnt1<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>Tom</sup>* y en ratones *GLAST<sup>CreERT2</sup>; Rosa26<sup>Tom</sup>* (TxP2), lo que respalda aún más la idea de que la médula ósea desempeña un papel clave en la regeneración hepática al movilizar estos progenitores estromales hacia el órgano dañado (Sierra et al., 2020).

En este trabajo, se ha demostrado mediante ensayos de migración en una cámara de Boyen que los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs son significativamente más móviles (entre 3 y 5 veces) que los demás BMSPs. Esta mayor movilidad hace que estas células, dentro del grupo de BMSPs, sean muy probablemente las que más contribuyen a los procesos de reparación o remodelación tisular.

Por lo tanto, la capacidad diferencial de movilización y de plasticidad, facilitada por el microambiente particular en el que residen, podría resaltar la importancia de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en la regeneración hepática y en otros procesos de reparación tisular. Además, el IMT504 induce cambios en el secretoma de los

GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, el cual influye de manera simultánea sobre los macrófagos fibróticos, los miofibroblastos y los hepatocitos, de manera similar a los efectos que tiene el ODN por sí mismo.

Además, en esta tesis se presentan evidencias de que el tratamiento con IMT504 aumenta la frecuencia relativa y la proliferación de ELCs Tom<sup>+</sup> y HLCs Tom<sup>+</sup> en ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (TxP2) con hígado fibrótico, así como en ratones *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (TxP60) con PHx. También se demuestra que, al menos en el modelo de fibrosis, los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs contribuyen con progenitores hepáticos, un fenómeno que se ve potenciado por el tratamiento con el ODN. No obstante, no se descarta la posibilidad de que de algunos progenitores hepáticos locales y/u otras células provenientes de tejidos afectados por la lesión también contribuyan con hepatocitos.

Nuestros hallazgos muestran que el pretratamiento *in vivo* con IMT504 duplicó la proporción relativa de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en la médula ósea dentro de la fracción de progenitores estromales, lo que es consistente con un aumento similar en el número total de CFU-Fs, un resultado previamente presentado en otra tesis doctoral de nuestro laboratorio. Por otro lado, en el presente trabajo logramos expandir por primera vez, durante varios pasajes *in vitro*, los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs a partir de animales *GLAST*<sup>CreERT2</sup>; *Rosa26*<sup>Tom</sup> (TxP2). Este ODN mostró tener un efecto notable en las propiedades fisiológicas de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, especialmente en términos de proliferación y motilidad, mientras que tuvo un impacto mínimo en los BMSPs Tom<sup>-</sup>, lo que sugiere que el efecto de IMT504 previamente reportado en las MSCs sería específico para los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs en ratón (Hernando Insúa et al., 2007). Cabe recordar que las otras fracciones de BMSPs, que no expresan el gen reportero, son mínimamente afectadas por el tratamiento con IMT504 en su capacidad de proliferación y movilización.

Anteriormente, reportamos que la TAA inhibía la capacidad de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs para proliferar y formar colonias densas (Sierra et al., 2020). Posteriormente, demostramos que IMT504 puede restaurar la capacidad de estos progenitores estromales para generar colonias densas, un hallazgo también presentado en la tesis doctoral previa del laboratorio. En los resultados mostrados en esta tesis, observamos que las tres dosis del ODN, administradas

con un intervalo de 14 días, aumentan significativamente la contribución de estos BMSPs con ELCs Tom<sup>+</sup> y HLCs Tom<sup>+</sup>, a la regeneración hepática. Esto refuerza la idea de que este ODN favorece la activación y expansión de los progenitores estromales circulantes en el contexto de la lesión hepática, restaurando así la capacidad de estas células de formar colonias densas. Estos hallazgos son cruciales, ya que proporcionan una base sólida para seguir explorando el potencial terapéutico de IMT504 en la regeneración hepática, especialmente en modelos de fibrosis y otras afecciones hepáticas.

La vía de señalización Wnt desempeña un importante papel en la regulación de las propiedades de células progenitoras, y estudios previos han demostrado que la activación de la señalización Wnt canónica expande la población de CFU-Fs en los BMSPs humanos (Baksh & Tuan, 2007). En el caso de los BMSPs, especialmente en etapas postnatales tempranas, se ha observado que el promotor de *Wnt1* está activo únicamente en un subconjunto específico de GLAST<sup>+</sup> BMSPs (Sierra et al., 2020). Nuestros hallazgos actuales revelan que el tratamiento con IMT504 tiene un efecto selectivo sobre estos progenitores de médula ósea, induciendo un aumento en los niveles de expresión de los ARNm de *Wnt1*, *Wnt3a* y *Wnt5a*, así como en varios genes diana de la vía Wnt canónica. Este hallazgo es relevante porque indica que este ODN activa de manera significativa la señalización Wnt específicamente en los GLAST<sup>+</sup> *Wnt1*<sup>+</sup> BMSPs, un proceso esencial para la proliferación de BMSCs. De hecho, nuestros datos sugieren que la vía de señalización Wnt es indispensable para la inducción de la proliferación de los GLAST<sup>+</sup> *Wnt1*<sup>+</sup> BMSPs mediada por IMT504.

La vía Wnt también se ha asociado estrechamente con la adquisición de propiedades plásticas por parte de las células madre de la médula ósea. Investigaciones previas han demostrado que esta vía induce la expresión de miosina en una subpoblación de células madre multipotentes adultas de la médula ósea (mMASCs) de ratón, mejorando su capacidad para fusionarse con células musculares esqueléticas en cultivo, un comportamiento característico de los miocitos *in vitro* (Bedada et al., 2006). Además, se ha reportado que *Wnt1* promueve la expresión de factores proangiogénicos y favorece la diferenciación hacia células endoteliales (ELCs) en células madre de la pulpa dental con propiedades estromales (Z. Zhang et al., 2016). Asimismo, la activación de la vía

Wnt es necesaria para la diferenciación de células ovales en hepatocitos, un proceso clave en la regeneración hepática (Williams et al., 2010).

Aunque no se probó experimentalmente mediante estrategias de ganancia o pérdida de función, es razonable suponer que el aumento observado en la activación de la vía de señalización Wnt inducido por el tratamiento con IMT504 podría estar implicado en la mayor motilidad y la diferenciación de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs hacia células hepáticas y endoteliales. Este potencial vínculo entre la activación de Wnt y las propiedades funcionales de estas células podría destacar la relevancia de esta vía en los procesos regenerativos mediados por IMT504. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar esta hipótesis y entender su mecanismo subyacente.

Antes de la estimulación con IMT504, tanto las células Tom<sup>+</sup> como Tom<sup>-</sup> fueron privadas de suero fetal bovino durante la noche. Posteriormente, se sometieron a un pulso de dos horas con el ODN o vehículo, seguido de un período de recuperación por un periodo adicional de 4 o 22 horas sin suero. Es relevante destacar que las células Tom<sup>+</sup>, independientemente de si fueron pretratadas o no con IMT504, mostraron niveles más elevados de expresión de ligandos Wnt,  $\beta$ -catenina y diversos genes diana de la vía canónica de Wnt bajo condiciones de estrés, como la privación prolongada de suero. Este hallazgo es consistente con lo esperado, dado que los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, ubicados alrededor de los sinusoides de la médula ósea, se encuentran en un microambiente caracterizado por baja presión de oxígeno (Aquino et al., 2021; Sierra et al., 2020). La exposición frecuente a estas condiciones de estrés podría influir en los niveles de activación de la vía de Wnt, promoviendo así una mayor proliferación y/o movilización de estas células hacia la sangre periférica. Este comportamiento refuerza su papel en la respuesta adaptativa y en los procesos de reparación tisular mediados por IMT504.

Además, se observó que la incubación con IMT504 afecta directamente los perfiles de expresión de diversas poblaciones celulares involucradas en la fibrogénesis y regeneración hepática. Este ODN indujo un fenotipo tolerogénico y prorregenerativo en los macrófagos fibróticos, redujo la activación de las HeSCs y promovió un aumento en la expresión de factores clave, como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), esencial para la proliferación y

diferenciación de progenitores hacia hepatocitos, y el IGF-I, un marcador de la función hepática en los hepatocitos.

Por otro lado, los medios condicionados de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs tratados con el ODN también mostraron efectos similares, aunque para algunos genes de menor magnitud. En contraste, los medios condicionados de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs tratadas con vehículo (control) o de las células Tom<sup>-</sup>, independientemente de su exposición previa al ODN, no indujeron cambios significativos en los perfiles de expresión de macrófagos fibrosos, HeSCs o hepatocitos. Estos hallazgos, mostrados en el presente trabajo, evidencian que los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs responden de manera específica, mostrando un efecto distintivo que no se observa en otras poblaciones de BMSPs.

El impacto de IMT504 en el perfil de expresión de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs y sus efectos sobre su secretoma aún no han sido completamente caracterizados. En un entorno *in vivo*, estas células podrían jugar un papel crucial en la mediación de los efectos terapéuticos de IMT504 en lesiones hepáticas. Tal vez, incluso después de la eliminación del ODN del organismo, estas células podrían seguir siendo capaces de liberar factores bioactivos que regulan la inflamación y promueven la regeneración del tejido hepático, lo cual aún debe ser comprobado experimentalmente. Independientemente de ello, los hallazgos de esta tesis destacan el potencial terapéutico de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs, no sólo en términos de su contribución directa a la regeneración celular, sino también como mediadoras en la modulación de la respuesta inflamatoria asociada con el daño hepático crónico.

Cabe destacar que el tratamiento con IMT504 estimuló un aumento en los niveles de expresión de Myb, un oncogen, sin alterar los niveles de expresión de beta-catenina en muestras hepáticas enriquecidas con células parenquimáticas de ratones tratados con TAA durante 2 y 8 semanas. Esto sugiere que IMT504 no activa la señalización de Wnt en hepatocitos, un proceso que se ha relacionado previamente con la carcinogénesis (Khemlina et al., 2017; Lee et al., 2006; Xu et al., 2022). Sin embargo, es importante señalar que, aunque estos resultados iniciales son alentadores, el impacto potencial de IMT504 en mecanismos relacionados con el cáncer debe ser explorado con mayor profundidad. La evaluación de posibles efectos adversos en este contexto será clave para

confirmar la seguridad y viabilidad de IMT504 como agente terapéutico en enfermedades hepáticas.

# **CONCLUSIÓN**

## 7. CONCLUSIONES

En este trabajo, demostramos que el tratamiento con IMT504 ejerce un potente efecto terapéutico en modelos murinos de daño hepático, reduciendo significativamente la fibrogénesis y promoviendo la regeneración tisular. Este efecto se asocia estrechamente con su capacidad para modular el microambiente inflamatorio, favoreciendo un perfil tolerogénico y prorregenerativo en macrófagos.

IMT504 regula simultáneamente la expresión génica de macrófagos, HeSCs y hepatocitos, lo que contribuye a reducir la respuesta inflamatoria y la activación de HeSCs, y a inducir la proliferación de hepatocitos. Estos efectos sugieren que IMT504 podría mitigar la fibrosis hepática y favorecer la recuperación del hígado en contextos de daño tóxico o colestático.

Asimismo, se observó que IMT504 tiene un impacto significativo en la regresión de fibrosis preexistente, evidenciado por una reducción en la acumulación de colágeno fibrilar, la disminución de la activación de miofibroblastos y de marcadores proinflamatorios, junto con un aumento en la proliferación de hepatocitos y en los marcadores tolerogénicos en macrófagos. Este efecto fue consistente tanto en etapas tempranas como avanzadas, lo que subraya la robustez y consistencia de la acción de IMT504 en el tejido hepático.

En modelos de fibrosis hepática, IMT504 estimula la expansión y movilización de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs hacia la sangre periférica y el hígado, favoreciendo su diferenciación en hepatocitos y células endoteliales y/o la proliferación de estas células. Este efecto depende, al menos en parte, de la activación de la vía Wnt, como se demostró en cultivos primarios, donde IMT504 incrementó la proliferación celular y la expresión de genes clave de esta vía. La inhibición de Wnt bloqueó estos efectos, confirmando su relevancia central de esta vía en la acción del compuesto.

En explantos hepáticos humanos con cirrosis, IMT504 mostró una reducción sostenida en la activación de miofibroblastos y marcadores inflamatorios, reforzando su potencial terapéutico en contextos clínicos de fibrosis hepática. Estos hallazgos posicionan a IMT504 como un candidato prometedor para el

tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas y agudas, dada su acción pleiotrópica, que combina efectos antifibróticos, antiinflamatorios y prorregenerativos.

Finalmente, en un modelo de PHx, IMT504 aceleró significativamente la regeneración hepática, promoviendo una recuperación más rápida de la masa hepática y estimulando la proliferación de hepatocitos en todas las etapas del proceso. Además, aumentó la movilización de los GLAST<sup>+</sup> Wnt1<sup>+</sup> BMSPs hacia el hígado, favoreciendo su contribución a la generación de hepatocitos y células endoteliales.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aquino, J. B., Bolontrade, M. F., García, M. G., Podhajcer, O. L., & Mazzolini, G. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutic tools and gene carriers in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Gene Therapy* 2010 17:6, 17(6), 692–708. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.10>
- Aquino, J. B., Hjerling-Leffler, J., Koltzenburg, M., Edlund, T., Villar, M. J., & Ernfors, P. (2006). In vitro and in vivo differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells. *Experimental Neurology*, 198(2), 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.12.015>
- Aquino, J. B., Sierra, R., & Montaldo, L. A. (2021). Diverse cellular origins of adult blood vascular endothelial cells. *Developmental Biology*, 477, 117–132. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2021.05.010>
- Asimakopoulos, F. A., Shteper, P. J., Krichevsky, S., Fibach, E., Polliack, A., Rachmilewitz, E., Ben-Neriah, Y., & Ben-Yehuda, D. (1999). ABL1 Methylation Is a Distinct Molecular Event Associated With Clonal Evolution of Chronic Myeloid Leukemia. *Blood*, 94(7), 2452–2460. [https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.7.2452.419K23\\_2452\\_2460](https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.7.2452.419K23_2452_2460)
- Aydın, M. M., & Akçalı, K. C. (2018). Liver fibrosis. *The Turkish Journal of Gastroenterology : The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 29(1), 14–21. <https://doi.org/10.5152/tjg.2018.17330>
- Baksh, D., & Tuan, R. S. (2007). Canonical and non-canonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 212(3), 817–826. <https://doi.org/10.1002/jcp.21080>
- Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 209–218. <https://doi.org/10.1172/JCI24282>
- Bayo, J., Fiore, E., Aquino, J. B., Malvicini, M., Rizzo, M., Peixoto, E., Alaniz, L., Piccioni, F., Bolontrade, M., Podhajcer, O., Garcia, M. G., & Mazzolini, G. (2014). Human Umbilical Cord Perivascular Cells Exhibited Enhanced Migration Capacity towards Hepatocellular Carcinoma in Comparison with Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: A Role for Autocrine Motility Factor Receptor.

*BioMed Research International*, 2014, 837420.  
<https://doi.org/10.1155/2014/837420>

Bedada, F. B., Günther, S., Kubin, T., & Braun, T. (2006). Differentiation Versus Plasticity: Fixing the Fate of Undetermined Adult Stem Cells. *Cell Cycle*, 5(3), 223–226. <https://doi.org/10.4161/CC.5.3.2364>

Bedi, S. S., Hetz, R., Thomas, C., Smith, P., Olsen, A. B., Williams, S., Xue, H., Aroom, K., Uray, K., Hamilton, J., Mays, R. W., & Cox, C. S. (2013). Intravenous Multipotent Adult Progenitor Cell Therapy Attenuates Activated Microglial/Macrophage Response and Improves Spatial Learning After Traumatic Brain Injury. *STEM CELLS Translational Medicine*, 2(12), 953–960. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0100>

Bianchi, M. S., Hernando-Insúa, A., Chasseing, N. A., Rodríguez, J. M., Elías, F., Lago, N., Zorzopoulos, J., Libertun, C., Montaner, A. D., & Lux-Lantos, V. A. (2010). Oligodeoxynucleotide IMT504 induces a marked recovery in a streptozotocin-induced model of diabetes in rats: Correlation with an early increase in the expression of nestin and neurogenin 3 progenitor cell markers. *Diabetologia*, 53(6), 1184–1189. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1694-z>

Bianchi, S., Martínez Allo, V. C., Massimino, M., Heguy, M. D. R. L., Borzone, F. R., Gomez Bustillo, S., Chasseing, N. A., Libertun, C., Montaner, A. D., Rabinovich, G. A., Toscano, M. A., Lux-Lantos, V. A., & Bianchi, M. S. (2021). Oligonucleotide IMT504 Improves Glucose Metabolism and Controls Immune Cell Mediators in Female Diabetic NOD Mice. <Https://Home.Liebertpub.Com/Nat>, 31(2), 155–171. <https://doi.org/10.1089/NAT.2020.0901>

Blas-García, A., & Apostolova, N. (2023). Novel Therapeutic Approaches to Liver Fibrosis Based on Targeting Oxidative Stress. *Antioxidants 2023, Vol. 12, Page 1567*, 12(8), 1567. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX12081567>

Boland, G. M., Perkins, G., Hall, D. J., & Tuan, R. S. (2004). Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(6), 1210–1230. <https://doi.org/10.1002/JCB.20284>

Borda, M., Aquino, J. B., & Mazzone, G. L. (2023). Cell-based experimental

strategies for myelin repair in multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 101(1), 86–111. <https://doi.org/10.1002/JNR.25129>

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Buenrostro-Espinosa, M. E., Cisneros-Juvera, F., Oropeza-Duarte, C., & Buenrostro-Espinosa, R. (2022). Manejo perioperatorio de hepatectomía en paciente con cirrosis: reporte de caso y revisión de literatura. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 21(91). <https://doi.org/10.24875/j.gamo.22000080>

Burr, A. W., Toole, K., Chapman, C., Hines, J. E., & Burt, A. D. (1998). Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. *The Journal of Pathology*, 185(3), 298–302. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199807\)185:3<298::AID-PATH88>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199807)185:3<298::AID-PATH88>3.0.CO;2-B)

Casadei, M., Fiore, E., Rubione, J., Domínguez, L. M., Coronel, M. F., Leiguarda, C., García, M., Mazzolini, G., Villar, M. J., Montaner, A., Constandil, L., Romero-Sandoval, E. A., & Brumovsky, P. R. (2021). IMT504 blocks allodynia in rats with spared nerve injury by promoting the migration of mesenchymal stem cells and by favoring an anti-inflammatory milieu at the injured nerve. *Pain, Publish Ah*(00). <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002476>

Casadei, M., Miguel, B., Rubione, J., Fiore, E., Mengelle, D., Guerri-Guttenberg, R. A., Montaner, A., Villar, M. J., Constandil-Córdova, L., Romero-Sandoval, A. E., & Brumovsky, P. R. (2024). Mesenchymal Stem Cell Engagement Modulates Neuroma Microenviroment in Rats and Humans and Prevents Postamputation Pain. *The Journal of Pain*, 25(8), 104508. <https://doi.org/10.1016/J.JPAIN.2024.03.004>

Chahin, A., Opal, S. M., Zorzopoulos, J., Jobes, D. V., Migdady, Y., Yamamoto, M., Parejo, N., Palardy, J. E., & Horn, D. L. (2015). The novel immunotherapeutic oligodeoxynucleotide imt504 protects neutropenic animals from fatal *pseudomonas aeruginosa* bacteremia and sepsis. *Antimicrobial Agents and*

*Chemotherapy*, 59(2), 1225–1229. <https://doi.org/10.1128/AAC.03923-14/ASSET/79A87F36-B7A7-44AA-A958-BE1EFA9B446F/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0021537180006.JPG>

Cienfuegos, J. A., Rotellar, F., Baixauli, J., Martínez-Regueira, F., Pardo, F., & Hernández-Lizoáin, J. L. (2004). Revista española de enfermedades digestivas. *Revista Castellana de Enfermedades Digestivas*, 106(3), 171–194. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1130-01082014000300004&lng=es&nrm=iso&tlang=en](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082014000300004&lng=es&nrm=iso&tlang=en)

Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/β-Catenin Signaling and Disease. *Cell*, 149(6), 1192–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>

Converti, A., Bianchi, M. S., Martinez, M. D., Montaner, A. D., Lux-Lantos, V., & Bonaventura, M. M. (2023). IMT504 protects beta cells against apoptosis and maintains beta cell identity, without modifying proliferation. *Physiological Reports*, 11(15). <https://doi.org/10.14814/phy2.15790>

Cordero-Espinoza, L., & Huch, M. (2018). The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(1), 85–96. <https://doi.org/10.1172/JCI93562>

Czaja, A. J. (2014). Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(10), 2515–2532. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i10.2515>

De Boer, J., Wang, H. J., & Van Blitterswijk, C. (2004). Effects of Wnt Signaling on Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. [Https://Home.Liebertpub.Com/Ten](https://Home.Liebertpub.Com/Ten), 10(3–4), 393–401. <https://doi.org/10.1089/107632704323061753>

Desbarats, J., & Newell, M. K. (2000). Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nature Medicine* 2000 6:8, 6(8), 920–923. <https://doi.org/10.1038/78688>

Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H., Mimura, T., Kitada, M., Suzuki, Y., & Ide, C. (2004). Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *The Journal*

of Clinical Investigation, 113(12), 1701–1710. <https://doi.org/10.1172/JCI20935>

Diehl, A. M. (2000). Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunological Reviews*, 174(1), 160–171. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0528.2002.017411.X>

Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. (2013). Kupffer Cells in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 3(2), 785. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C120026>

Domínguez, M., Colmenero, J., & Bataller, R. (2009). Tratamiento de la fibrosis hepática. *Gastroenterología y Hepatología*, 32(9), 627–632. <https://doi.org/10.1016/J.GASTROHEP.2009.02.015>

Du, Y., Zhang, W., Qiu, H., Xiao, C., Shi, J., Reid, L. M., & He, Z. (2022). Mouse Models of Liver Parenchyma Injuries and Regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.903740>

Etheridge, S. L., Spencer, G. J., Heath, D. J., & Genever, P. G. (2004). Expression Profiling and Functional Analysis of Wnt Signaling Mechanisms in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 22(5), 849–860. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.22-5-849>

Fausto, N., Campbell, J. S., & Riehle, K. J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology*, 43(2 SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1002/HEP.20969>

Fiore, E. J., Domínguez, L. M., Bayo, J., García, M. G., & Mazzolini, G. D. (2018). Taking advantage of the potential of mesenchymal stromal cells in liver regeneration: Cells and extracellular vesicles as therapeutic strategies. *World Journal of Gastroenterology*, 24(23), 2427. <https://doi.org/10.3748/WJG.V24.I23.2427>

Fiore, E. J., Mazzolini, G., & Aquino, J. B. (2015). Mesenchymal stem/stromal cells in liver fibrosis: Recent findings, old/new caveats and future perspectives. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(4), 586–597. <https://doi.org/10.1007/S12015-015-9585-9>

Fiore, E., Malvicini, M., Bayo, J., Peixoto, E., Atorrasagasti, C., Sierra, R., Rodríguez, M., Gómez Bustillo, S., García, M. G., Aquino, J. B., & Mazzolini, G. (2016). Involvement of hepatic macrophages in the antifibrotic effect of IGF-I-

overexpressing mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13287-016-0424-Y/FIGURES/8>

Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological Reviews*, 88(1), 125–172. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00013.2007/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0010824540008.JPG>

Gao, Q., Wang, L., Wang, S., Huang, B., Jing, Y., & Su, J. (2022). Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: Identification, Classification, and Differentiation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.787118>

García-Porrero Pérez, J. A. (2020). *Anatomía Humana*.

Gasmi, B., & Kleiner, D. E. (2019). Liver Histology Diagnostic and Prognostic Features. *Clinics in Liver Disease*, 24(1), 61. <https://doi.org/10.1016/J.CLD.2019.09.004>

Gomez, G. A., Prasad, M. S., Sandhu, N., Shelar, P. B., Leung, A. W., & García-Castro, M. I. (2019). Human neural crest induction by temporal modulation of WNT activation. *Developmental Biology*, 449(2), 99–106. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2019.02.015>

Gonzalez, H. D. (2010). Small for size syndrome following living donor and split liver transplantation. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2(12), 389. <https://doi.org/10.4240/wjgs.v2.i12.389>

Gramantieri, L., Chieco, P., Giovannini, C., Lacchini, M., Treré, D., Grazi, G. L., Venturi, A., & Bolondi, L. (2005). GADD45- $\alpha$  expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma: relationship with DNA repair and proliferation. *Human Pathology*, 36(11), 1154–1162. <https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2005.07.017>

Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2019). *Tratado de Fisiología Médica*.

He, Q., Wan, C., & Li, G. (2007). Concise Review: Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Blood. *Stem Cells*, 25(1), 69–77. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2006-0335>

Heaton, N. (2003). Small-for-size liver syndrome after auxiliary and split liver

transplantation: Donor selection. *Liver Transplantation*, 9(9), S26–S28. <https://doi.org/10.1053/jlts.2003.50197>

Hernando Insúa, A., Montaner, A. D., Rodriguez, J. M., Elías, F., Fló, J., López, R. A., Zorzopoulos, J., Hofer, E. L., & Chasseing, N. A. (2007). IMT504, the Prototype of the Immunostimulatory Oligonucleotides of the PyNTTTGT Class, Increases the Number of Progenitors of Mesenchymal Stem Cells Both In Vitro and In Vivo: Potential Use in Tissue Repair Therapy. *Stem Cells*, 25(4), 1047–1054. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0479>

Hong, H. S., Lee, J., Lee, E., Kwon, Y. S., Lee, E., Ahn, W., Jiang, M. H., Kim, J. C., & Son, Y. (2009). A new role of substance P as an injury-inducible messenger for mobilization of CD29+ stromal-like cells. *Nature Medicine* 2009 15:4, 15(4), 425–435. <https://doi.org/10.1038/nm.1909>

Hora, S., & Wuestefeld, T. (2023). Liver Injury and Regeneration: Current Understanding, New Approaches, and Future Perspectives. *Cells* 2023, Vol. 12, Page 2129, 12(17), 2129. <https://doi.org/10.3390/CELLS12172129>

Horner, A. A., & Raz, E. (2002). Immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide-based vaccination and immunomodulation: Two unique but complementary strategies for the treatment of allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(5), 706–712. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.129122>

Hu, C., Xu, Z., & Du, Y. (2024). A Mouse Model of the Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy Procedure Aided by Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, 203. <https://doi.org/10.3791/66098>

Huelsken, J., & Behrens, J. (2002). The Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science*, 115(21), 3977–3978. <https://doi.org/10.1242/jcs.00089>

Iwakiri, Y. (2015). Nitric oxide in liver fibrosis: The role of inducible nitric oxide synthase. *Clinical and Molecular Hepatology*, 21(4), 319. <https://doi.org/10.3350/CMH.2015.21.4.319>

Kahn, M. (2014). Can we safely target the WNT pathway? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(7), 513–532. <https://doi.org/10.1038/nrd4233>

Kandilis, A. N., Koskinas, J., Vlachos, I., Skaltsas, S., Karandrea, D., Karakitsos, P., Pantopoulou, A., Palaiologou, M., Nikiteas, N., Tiniakos, D. G., & Perrea, D. N. (2014). Liver regeneration: Immunohistochemical study of intrinsic hepatic innervation after partial hepatectomy in rats. *BMC Gastroenterology*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12876-014-0202-1/FIGURES/4>

Khemlina, G., Ikeda, S., & Kurzrock, R. (2017). The biology of Hepatocellular carcinoma: implications for genomic and immune therapies. *Molecular Cancer* 2017 16:1, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12943-017-0712-X>

Kisseleva, T., & Brenner, D. A. (2007). Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(SUPPL. 1), S73–S78. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1746.2006.04658.X>

Klinman, D. M. (2004). Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nature Reviews Immunology* 2004 4:4, 4(4), 249–259. <https://doi.org/10.1038/nri1329>

Klinman, D. M., Currie, D., Gursel, I., & Verthelyi, D. (2004). Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunological Reviews*, 199(1), 201–216. <https://doi.org/10.1111/J.0105-2896.2004.00148.X>

Kong, M., Dong, W., Xu, H., Fan, Z., Miao, X., Guo, Y., Li, C., Ye, Q., Wang, Y., & Xu, Y. (2021). Choline Kinase Alpha Is a Novel Transcriptional Target of the Brg1 in Hepatocyte: Implication in Liver Regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 705302. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.705302/BIBTEX>

Kretzschmar, K., & Watt, F. M. (2012). Lineage tracing. *Cell*, 148(1–2), 33–45. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.01.002/ASSET/E1637732-115E-4C85-93A4-612F37C0E8D8/MAIN.ASSETS/GR5.JPG>

Lee, H. C., Kim, M., & Wands, J. R. (2006). Wnt/frizzled signaling in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Bioscience*, 11(2 P.1591-2006), 1901–1915. <https://doi.org/10.2741/1933/PDF>

Leiguarda, C., Potilinski, C., Rubione, J., Tate, P., Villar, M. J., Montaner, A., Bisagno, V., Constandil, L., & Brumovsky, P. R. (2020). IMT504 Provides

Analgesia by Modulating Cell Infiltrate and Inflammatory Milieu in a Chronic Pain Model. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 2020 16:3, 16(3), 651–666. <https://doi.org/10.1007/S11481-020-09971-2>

Levenson, V. V., Davidovich, I. A., & Roninson, I. B. (2000). Pleiotropic resistance to DNA-interactive drugs is associated with increased expression of genes involved in DNA replication, repair, and stress response. *Cancer Research*, 60(18), 5027–5030. <https://aacrjournals.org/cancerres/article/60/18/5027/506722/Pleiotropic-Resistance-to-DNA-interactive-Drugs-Is>

Ling, L., Nurcombe, V., & Cool, S. M. (2009). Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene*, 433(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2008.12.008>

Lowe, K. O., Tanase, C. E., Maghami, S., Fisher, L. E., & Ghaemmaghami, A. M. (2023). Inflammatory Network of Liver Fibrosis and How It Can Be Targeted Therapeutically. *Immuno* 2023, Vol. 3, Pages 375-408, 3(4), 375–408. <https://doi.org/10.3390/IMMUNO3040023>

Mao, S. A., Glorioso, J. M., & Nyberg, S. L. (2014). Liver regeneration. *Translational Research*, 163(4), 352–362. <https://doi.org/10.1016/J.TRSL.2014.01.005>

Martins-Neves, S. R., Paiva-Oliveira, D. I., Fontes-Ribeiro, C., Bovée, J. V. M. G., Cleton-Jansen, A. M., & Gomes, C. M. F. (2018). IWR-1, a tankyrase inhibitor, attenuates Wnt/β-catenin signaling in cancer stem-like cells and inhibits in vivo the growth of a subcutaneous human osteosarcoma xenograft. *Cancer Letters*, 414, 1–15. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2017.11.004>

Mathieu, P. A., Sampertegui, Y. R., Elias, F., Silva, A. S., de Luján Calcagno, M., López, R., & Adamo, A. M. (2024). Oligodeoxynucleotide IMT504: Effects on Central Nervous System Repair Following Demyelination. *Molecular Neurobiology*, 61(7), 4146–4165. <https://doi.org/10.1007/S12035-023-03825-7/METRICS>

Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, 140(6), 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>

Michalopoulos, G. K. (2007). Liver regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 286–300. <https://doi.org/10.1002/jcp.21172>

Michalopoulos, G. K. (2020). Liver Regeneration. In *The Liver* (pp. 566–584). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119436812.ch45>

Michalopoulos, G. K., & Bhushan, B. (2021). Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(1), 40–55. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0342-4>

Michalopoulos, G. K., & DeFrances, M. C. (1997). Liver regeneration. *Science*, 276(5309), 60–65. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.276.5309.60>

Mitchell, C., & Willenbring, H. (2008). A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nature Protocols*, 3(7), 1167–1170. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.80>

Myaoka, Y., & Miyajima, A. (2013). To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell Division* 2013 8:1, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-8-8>

Moreno, R., & Berenguer, M. (2006). Post-liver transplantation medical complications. *Annals of Hepatology*, 5(2), 77–85. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)32022-8](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)32022-8)

Mori, T., Tanaka, K., Buffo, A., Wurst, W., Kühn, R., & Gotz, M. (2006). Inducible gene deletion in astroglia and radial glia—A valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia*, 54(1), 21–34. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20350>

Murad, Y. M., & Clay, T. M. (2009). CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: Therapeutic applications in cancer. *BioDrugs*, 23(6), 361–375. <https://doi.org/10.2165/11316930-000000000-00000>

Murata, H., Yagi, T., Iwagaki, H., Ogino, T., Sadamori, H., Matsukawa, H., Umeda, Y., Haga, S., Takaka, N., & Ozaki, M. (2007). Mechanism of impaired regeneration of fatty liver in mouse partial hepatectomy model. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(12), 2173–2180. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1746.2006.04798.X>

Nishikoba, N., Kumagai, K., Kanmura, S., Nakamura, Y., Ono, M., Eguchi, H.,

Kamibayashiyama, T., Oda, K., Mawatari, S., Tanoue, S., Hashimoto, S., Tsubouchi, H., & Ido, A. (2020). HGF-MET Signaling Shifts M1 Macrophages Toward an M2-Like Phenotype Through PI3K-Mediated Induction of Arginase-1 Expression. *Frontiers in Immunology*, 11, 563574. [https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.02135/BIBTEX](https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.02135)

Nusrat, S., Khan, M. S., Fazili, J., & Madhoun, M. F. (2014). Cirrhosis and its complications: Evidence based treatment. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(18), 5442. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I18.5442>

Ortica, S., Tarantino, N., Aulner, N., Israël, A., & Gupta-Rossi, N. (2014). The 4 Notch receptors play distinct and antagonistic roles in the proliferation and hepatocytic differentiation of liver progenitors. *The FASEB Journal*, 28(2), 603–614. <https://doi.org/10.1096/FJ.13-235903>

Paciejewska, M. M., Maijenburg, M. W., Gilissen, C., Kleijer, M., Vermeul, K., Weijer, K., Veltman, J. A., Von Lindern, M., Van Der Schoot, C. E., & Voermans, C. (2016). Different Balance of Wnt Signaling in Adult and Fetal Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells and Development*, 25(12), 934–947. <https://doi.org/10.1089/SCD.2015.0263>

Patel, K. J., Yu, V. P. C. C., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F. C., Evans, M. J., Colledge, W. H., Friedman, L. S., Ponder, B. A. J., & Venkitaraman, A. R. (1998). Involvement of Brca2 in DNA repair. *Molecular Cell*, 1(3), 347–357. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80035-0/ASSET/CCD35791-BD79-4A80-BA4B-2E158E7D4965/MAIN.ASSETS/GR8.JPG](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80035-0)

Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Mentink-Kane, M. M., Wilson, M. S., Kasmi, K. C. E., Smith, A. M., Thompson, R. W., Cheever, A. W., Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2009). Arginase-1-Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine-Driven Inflammation and Fibrosis. *PLOS Pathogens*, 5(4), e1000371. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000371>

Peters, M., Blinn, G., Jostock, T., Schirmacher, P., Meyer zum Büschenfelde, K. H., Galle, P. R., & RoseJohn, S. (2000). Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology*, 119(6), 1663–1671. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.20236>

Pibiri, M., & Simbula, G. (2022). Role of the Hippo pathway in liver regeneration and repair: recent advances. *Inflammation and Regeneration* 2022 42:1, 42(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/S41232-022-00235-5>

Pinzani, M., Rosselli, M., & Zuckermann, M. (2011). Liver cirrhosis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 25(2), 281–290. <https://doi.org/10.1016/J.BPG.2011.02.009>

Pu, W., & Zhou, B. (2022). Hepatocyte generation in liver homeostasis, repair, and regeneration. *Cell Regeneration*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13619-021-00101-8/FIGURES/2>

Puche, J. E., Saiman, Y., & Friedman, S. L. (2013). Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. *Comprehensive Physiology*, 3(4), 1473–1492. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C120035>

Qin, K., Yu, M., Fan, J., Wang, H., Zhao, P., Zhao, G., Zeng, W., Chen, C., Wang, Y., Wang, A., Schwartz, Z., Hong, J., Song, L., Wagstaff, W., Haydon, R. C., Luu, H. H., Ho, S. H., Strelzow, J., Reid, R. R., ... Shi, L. L. (2024). Canonical and noncanonical Wnt signaling: Multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk. *Genes and Diseases*, 11(1), 103–134. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.01.030>

Ramírez Tortosa, M. del C., Gálvez-Navas, J. M., Pérez-Ramírez, C., Gálvez-Navas, J. M., Pérez-Ramírez, C., & Ramírez-Tortosa, M. C. (2021). Secreted Frizzled – Related Protein 4 y el cáncer de mama. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 62(4), 438–450. <https://doi.org/10.30827/ars.v62i4.21740>

Ravichandra, A., & Schwabe, R. F. (2021). Mouse models of liver fibrosis. *Methods in Molecular Biology*, 2299, 339–356. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1382-5\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1382-5_23)

Riddiough, G. E., Christophi, C., Jones, R. M., Muralidharan, V., & Perini, M. V. (2020). A systematic review of small for size syndrome after major hepatectomy and liver transplantation. *HPB*, 22(4), 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2019.10.2445>

Rim, E. Y., Clevers, H., & Nusse, R. (2022). The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators. *Annual Review of Biochemistry*, 91(1),

571–598. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-040320-103615>

Rodriguez, J. M., Marchicio, J., López, M., Ziblat, A., Elias, F., Fló, J., López, R. A., Horn, D., Zorzopoulos, J., & Montaner, A. D. (2015). PyNTTTGT and CpG Immunostimulatory Oligonucleotides: Effect on Granulocyte/Monocyte Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Secretion by Human CD56+ (NK and NKT) Cells. *PLOS ONE*, 10(2), e0117484. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0117484>

Ross, M. H. ., & Pawlina, W. (2016). *Histology: A text and atlas*.

Rountree, C. B., Barsky, L., Ge, S., Zhu, J., Senadheera, S., & Crooks, G. M. (2007). A CD133-Expressing Murine Liver Oval Cell Population with Bilineage Potential. *Stem Cells*, 25(10), 2419–2429. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0176>

Rubione, J., Sbrascini, S. M., Miguel, B., Leiguarda, C., Coronel, M. F., McCarthy, C. J., Montaner, A., Villar, M. J., & Brumovsky, P. R. (2023). Modulation of the Inflammatory Response by Pre-emptive Administration of IMT504 Reduces Postoperative Pain in Rats and has Opioid-Sparing Effects. *The Journal of Pain*, 24(6), 991–1008. <https://doi.org/10.1016/J.JPAIN.2023.01.013>

Sharma, P., Nandave, M., Nandave, D., Yadav, S., Vargas-De-La-Cruz, C., Singh, S., Tandon, R., Ramniwas, S., & Behl, T. (2023). Reactive oxygen species (ROS)-mediated oxidative stress in chronic liver diseases and its mitigation by medicinal plants. *American Journal of Translational Research*, 15(11), 6321. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10703659/>

Sierra, R., Gómez Bustillo, S., Kameneva, P., Fiore, E. J., Mazzone, G. L., Borda, M., Blanco, M. V., Usuardi, C., Furlan, A., Ernfors, P., Alaniz, L., Montaner, A. D., Adameyko, I., & Aquino, J. B. (2020). Contribution of neural crest and GLAST + Wnt1 + bone marrow pericytes with liver fibrogenesis and/or regeneration. *Liver International*, 40(4), 977–987. <https://doi.org/10.1111/liv.14401>

Singh, J., Ebaid, M., & Saab, S. (2023). Advances in the management of complications from cirrhosis. *Gastroenterology Report*, 12. <https://doi.org/10.1093/gastro/goae072>

Soares, A., Govender, L., Hughes, J., Mavakla, W., de Kock, M., Barnard, C.,

Pienaar, B., Janse van Rensburg, E., Jacobs, G., Khomba, G., Stone, L., Abel, B., Scriba, T. J., & Hanekom, W. A. (2010). Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *Journal of Immunological Methods*, 362(1–2), 43–50. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2010.08.007>

Song, T. J., Wai Kit Ip, E., & Fong, Y. (2004). Hepatocellular carcinoma: Current surgical management. *Gastroenterology*, 127(5 SUPPL.). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.09.039>

Tag, C. G., Sauer-Lehnen, S., Weiskirchen, S., Borkham-Kamphorst, E., Tolba, R. H., Tacke, F., & Weiskirchen, R. (2015). Bile Duct Ligation in Mice: Induction of Inflammatory Liver Injury and Fibrosis by Obstructive Cholestasis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 96(96), e52438. <https://doi.org/10.3791/52438>

Tan, Z., Sun, H., Xue, T., Gan, C., Liu, H., Xie, Y., Yao, Y., & Ye, T. (2021). Liver Fibrosis: Therapeutic Targets and Advances in Drug Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 730176. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.730176/BIBTEX>

Tetsu, O., & McCormick, F. (1999).  $\beta$ -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398(6726), 422–426. <https://doi.org/10.1038/18884>

Thomas, J. A., Pope, C., Wojtacha, D., Robson, A. J., Gordon-Walker, T. T., Hartland, S., Ramachandran, P., Van Deemter, M., Hume, D. A., Iredale, J. P., & Forbes, S. J. (2011). Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function. *Hepatology*, 53(6), 2003–2015. <https://doi.org/10.1002/HEP.24315>

Tsochatzis, E. A., Bosch, J., & Burroughs, A. K. (2014). Liver cirrhosis. *The Lancet*, 383(9930), 1749–1761. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60121-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60121-5)

Uchiyama, H., Yanaga, K., Nishizaki, T., Soejima, Y., Yoshizumi, T., & Sugimachi, K. (1999). Effects of deletion variant of hepatocyte growth factor on reduced-size liver transplantation in rats. *Transplantation*, 68(1), 39–44. <https://doi.org/10.1097/00007890-199907150-00008>

van Sweringen, H. L., Sakai, N., Tevar, A. D., Burns, J. M., Edwards, M. J., &

- Lentsch, A. B. (2011). CXC chemokine signaling in the liver: Impact on repair and regeneration. *Hepatology*, 54(4), 1445–1453. <https://doi.org/10.1002/HEP.24457>
- Wang, H., Zhang, L., Hu, C., Li, H., & Jiang, M. (2024). Wnt signaling and tumors (Review). *Molecular and Clinical Oncology*, 21(1), 45. <https://doi.org/10.3892/mco.2024.2743>
- Wang, T., Chen, X., Wang, K., Ju, J., Yu, X., Wang, S., Liu, C., & Wang, K. (2023). Cre-loxP-mediated genetic lineage tracing: Unraveling cell fate and origin in the developing heart. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 10, 1085629. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2023.1085629/BIBTEX>
- Williams, J. M., Oh, S. H., Jorgensen, M., Steiger, N., Darwiche, H., Shupe, T., & Petersen, B. E. (2010). The role of the Wnt family of secreted proteins in rat oval “stem” cell-based liver regeneration: Wnt1 drives differentiation. *American Journal of Pathology*, 176(6), 2732–2742. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.080486>
- Wu, S. T., Wang, X. X., Xing, W. B., Li, F. Y., Liang, M., Li, K. S., He, Y., & Wang, J. M. (2023). An update on animal models of liver fibrosis. *Frontiers in Medicine*, 10, 1160053. <https://doi.org/10.3389/FMED.2023.1160053/BIBTEX>
- Xu, C., Xu, Z., Zhang, Y., Evert, M., Calvisi, D. F., & Chen, X. (2022).  $\beta$ -Catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(4). <https://doi.org/10.1172/JCI154515>
- Yagi, S., Hirata, M., Miyachi, Y., & Uemoto, S. (2020). Liver regeneration after hepatectomy and partial liver transplantation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21218414>
- Yue, Z., Yuan, Z., Zeng, L., Wang, Y., Lai, L., Li, J., Sun, P., Xue, X., Qi, J., Yang, Z., Zheng, Y., Fang, Y., Li, D., Siwko, S., Li, Y., Luo, J., & Liu, M. (2018). LGR4 modulates breast cancer initiation, metastasis, and cancer stem cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(5), 2422–2437. <https://doi.org/10.1096/FJ.201700897R>
- Zafarnia, S., Mrugalla, A., Rix, A., Doleschel, D., Gremse, F., Wolf, S. D., Buyel, J. F., Albrecht, U., Bode, J. G., Kiessling, F., & Lederle, W. (2019). Non-invasive

imaging and modeling of liver regeneration after partial hepatectomy. *Frontiers in Physiology*, 10(JUL), 380071.  
[https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.00904/BIBTEX](https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.00904)

Zhang, M., Wu, Z., Salas, S. S., Aguilar, M. M., Trillo-Almanza, M. C., Buist-Homan, M., & Moshage, H. (2023). Arginase 1 expression is increased during hepatic stellate cell activation and facilitates collagen synthesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 124(6), 808–817. <https://doi.org/10.1002/JCB.30403>

Zhang, Z., Nör, F., Oh, M., Cucco, C., Shi, S., & Nör, J. E. (2016). Wnt/β-Catenin Signaling Determines the Vasculogenic Fate of Postnatal Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 34(6), 1576–1587. <https://doi.org/10.1002/STEM.2334>

Zhao, Y., Ye, W., Wang, Y. D., & Chen, W. D. (2022). HGF/c-Met: A Key Promoter in Liver Regeneration. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 808855. [https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.808855/BIBTEX](https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.808855)