



# Nuevos mecanismos de regulación hepática mediados por miR-33 y el receptor de las lipoproteínas de baja densidad

Montse Pauta Puig

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**NUEVOS MECANISMOS DE REGULACIÓN HEPÁTICA  
MEDIADOS POR miR-33 Y EL RECEPTOR DE LAS  
LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD.**

Memoria presentada por

**MONTSE PAUTA PUIG**

Para optar al título de Doctora en Bioquímica por la Universitat de Barcelona

Trabajo realizado bajo la dirección del **Dr. Manuel Morales Ruiz** y la co-  
dirección del **Dr. Wladimiro Jiménez Povedano.**

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular

Hospital Clínic de Barcelona

Tesis inscrita en el programa de doctorado de Medicina

Departamento de Medicina, Facultad de Medicina



*Als meus pares*  
*¶ a l'Aró.*





## Abreviaturas

- ALT.- Alanina aminotransferasa.
- CCl<sub>4</sub>.- Tetracloruro de carbono.
- CCND1.- proteína ciclina D1.
- CDK.- proteínas quinasa dependientes de ciclinas.
- c-Met.- Receptor del HGF.
- DNA.- ácido dexosirribonucleico.
- EGF.- Factor de crecimiento epidérmico.
- GLP-1.- Péptido similar al glucagón tipo 1.
- HCC.- Hepatocarcinoma o Carcinoma hepatocelular.
- HDL.- Lipoproteína de alta densidad.
- HGF.- Factor de crecimiento de hepatocitos.
- HMG-CoA-reductasa.- hidroximetil-glutaril-CoA-reductasa.
- HMGCR.- HMG-CoA reductasa o 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase.
- HSC.- Células Hepáticas estrelladas.
- IL-6.- Interlequina-6.
- Insig.- Gen de inducción a insulina.
- LCAT.- Lecitin colesterol Acil transferasa.
- LDL.- Lipoproteína de baja densidad.
- LDLR.- Receptor de la lipoproteína de baja densidad.
- L-Fabp.- Proteína de unión a ácidos grasos.
- miRNA.- micro ácido ribonucleico.

- MMP.- Metaloproteinasas.
- NFκB.- Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
- PCNA.- Proteína de proliferación del antígeno nuclear.
- PCSK9.- Proteína convertasa subtilisin/kexin tipo 9.
- PDGF.- factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PHx .- Hepatectomía parcial.
- PMCA.- Ca<sup>2+</sup> ATPase.
- pRb.- Proteína del retinoblastoma.
- RISC.- complejo silenciador inducido por RNA.
- RNA\_ácido ribonucleico.
- SCAP.- proteína activadora a través del clivaje de SREBP.
- SER.- Elemento regulador de esteroides.
- SP1 y SP2.- Proteasas que procesan SREBP.
- SREBP.- Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides.
- STAT3.- Transductor de señal y activador de la transcripción 3.
- TGF.- Factor de crecimiento tumoral.
- TIMP.- Inhibidores de metaloproteinasas en tejido.
- TIMPs.- Inhibidores de metaloproteinasas.
- TNF-α.- Factor de necrosis tumoral.
- TUNEL.- Marcado del extremo libre por dUTP (por desoxi-transferasa terminal).
- uPA .- Activador del plasminógeno tipo uroquinasa.
- VEGF.- factor de crecimiento endotelial vascular.

# Índice

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>REGENERACIÓN HEPÁTICA.....</b>	<b>1</b>
<i>Introducción.....</i>	<i>1</i>
<i>Modelos animales.....</i>	<i>2</i>
<b>REGULACIÓN DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.....</b>	<b>5</b>
<i>Fases de la regeneración hepática.....</i>	<i>6</i>
<i>Fase de priming.....</i>	<i>6</i>
<i>Fase de proliferación.....</i>	<i>8</i>
<i>fase de terminación.....</i>	<i>9</i>
<b>CICLO CELULAR.....</b>	<b>11</b>
<b>MICRORNAs.....</b>	<b>15</b>
<i>papel de los miRNAs en enfermedades hepáticas.....</i>	<i>18</i>
<i>Papel de los miRNAs en regeneración.....</i>	<i>18</i>
<i>miR-33.....</i>	<i>19</i>
<b>FACTORES DE CRECIMIENTO Y CITOCINAS.....</b>	<b>21</b>
<i>Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF).....</i>	<i>21</i>
<i>Factor de Necrosis Tumoral-alpha (TNF-α).....</i>	<i>22</i>
<i>Interleucina-6 (IL-6).....</i>	<i>23</i>
<i>Factor de crecimiento transformante-beta (TGF-b).....</i>	<i>24</i>
<b>METABOLISMO LIPÍDICO.....</b>	<b>26</b>
<i>Lipid droplets.....</i>	<i>27</i>
<i>Lípidos.....</i>	<i>29</i>
<i>Regulación del colesterol.....</i>	<i>32</i>
<i>Función de los lípidos durante la regeneración hepática.....</i>	<i>33</i>
<i>Membrana celular.....</i>	<i>34</i>
<b>COMPLICACIONES DE LA RESECCIÓN HEPÁTICA TERAPÉUTICA CLÍNICA.....</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>PRIMER ESTUDIO.....</b>	<b>44</b>
<b>SEGUNDO ESTUDIO.....</b>	<b>45</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
PRIMER ESTUDIO.- MIR-33 REGULA LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR.....	49
SEGUNDO ESTUDIO.- EL RETRASO EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA EN RATONES DEFICIENTES EN EL GEN LDLR ESTÁ ASOCIADO A UNA ALTERACIÓN EN EL PERFIL DE CITOCINAS, FACTORES DE CRECIMIENTO Y LÍPIDOS.....	64
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>107</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO 1. MODELO DE 2/3 HEPATECTOMÍA PARCIAL EN RATÓN.....</b>	<b>121</b>
PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.....	121
<b>ANEXO 2. OTRAS PUBLICACIONES DERIVADAS.....</b>	<b>125</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>129</b>



## Índice de figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.-</b> Regeneración hepática	2
<b>Figura 2.-</b> Modelo de hepatectomía parcial de Higgins y Anderson	4
<b>Figura 3.-</b> Esquema de las fases de la regeneración hepática	6
<b>Figura 4.-</b> Esteatosis hepática transitoria	9
<b>Figura 5.-</b> Esquema del ciclo celular	13
<b>Figura 6.-</b> Esquema de la cinética de expresión tras la PHx	14
<b>Figura 7.-</b> Esquema de la síntesis de los miRNAs	17
<b>Figura 8.-</b> Implicaciones de los miRNAs en las enfermedades hepáticas	18
<b>Figura 9.-</b> Esquema de los <i>Lipid droplets</i>	29
<b>Figura 10.-</b> Esquema del transporte de colesterol	31
<b>Figura 11.-</b> Regulación del colesterol	33
<b>Figura 12.-</b> Complicaciones en la regeneración hepática terapéutica	39



# **INTRODUCCIÓN**





## Introducción

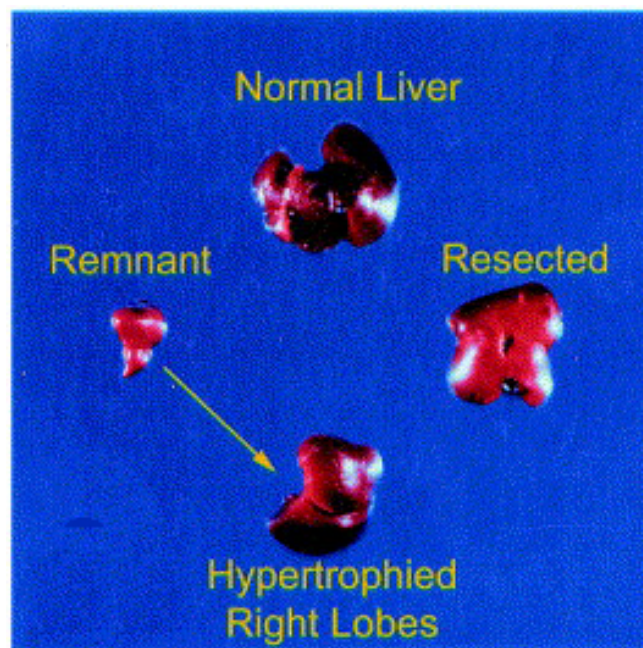
### REGENERACIÓN HEPÁTICA.

#### *INTRODUCCIÓN*

El hígado es un órgano que juega un papel importante en la homeostasis metabólica, síntesis, detoxificación, almacenaje de proteínas, redistribución de nutrientes, carbohidratos, ácidos grasos y vitaminas. Además, el hígado tiene una gran capacidad de regeneración que se ha mantenido evolutivamente en todos los organismos vertebrados. (Michalopoulos G.K. J Cell Physiol, 2007). Es probable que esta capacidad regenerativa haya evolucionado como estrategia de defensa para mantener la viabilidad de los organismos ante la pérdida de funcionalidad y masa hepática ocasionada por intoxicaciones alimentarias, traumas o infecciones. Históricamente, la capacidad regenerativa del hígado fue abordada por primera vez en el mito griego de Prometeo (Taub. R., Nat Rev Mol Cell Biol., 2004, Dina G.Tiniakos, J. hepatol. et al. 2010). Según este mito, Zeus tras un enfado con Prometeo privó a los hombres del fuego, Prometeo decidió robarlo del monte Olimpo y devolvérselo a los hombres. Tras este segundo enfado, Zeus, ordenó encadenar a Prometeo a una montaña y envió un águila que durante el día se comería su hígado el cual regeneraría durante la noche. De esta manera castigaba a Prometeo a sufrir día tras día (Power C. Ann intern Med., 2008).

La regeneración hepática es un proceso remarcable ya que en condiciones fisiológicas los hepatocitos se encuentran en la fase G0 del ciclo celular. Sin embargo, tras la pérdida de masa o funcionalidad hepática, los hepatocitos quiescentes activan su entrada en la fase replicativa del ciclo celular y proliferan hasta restaurar la funcionalidad basal, proceso conocido por hiperplasia. Adicionalmente, la hiperplasia coexiste con la hipertrofia hepatocitaria en estadios iniciales del proceso regenerativo. Durante la

etapa de hipertrofia los hepatocitos sufren un cambio en su volumen para compensar la pérdida de volumen hepático. Estos dos mecanismos compensatorios han sido ampliamente descritos en el modelo experimental de hepatectomía parcial en roedores (Higgins GM, Anderson RM. Arch Pathol. 1931) y en humanos. En ambos casos, la hepatectomía parcial activa estos dos mecanismos en los lóbulos hepáticos remanentes, posibilitando el crecimiento compensatorio de la masa hepática hasta restablecer los valores basales. En este contexto, es conveniente aclarar que, el término de "regeneración hepática" no hace referencia al restablecimiento anatómico de la arquitectura hepática, ya que los lóbulos reseccionados o dañados no recuperan su forma original.



**Figura 1.** Regeneración hepática Figura de extraída de Koniaris L.G. J. Am. Coll. Surg. 2003.

### MODELOS ANIMALES

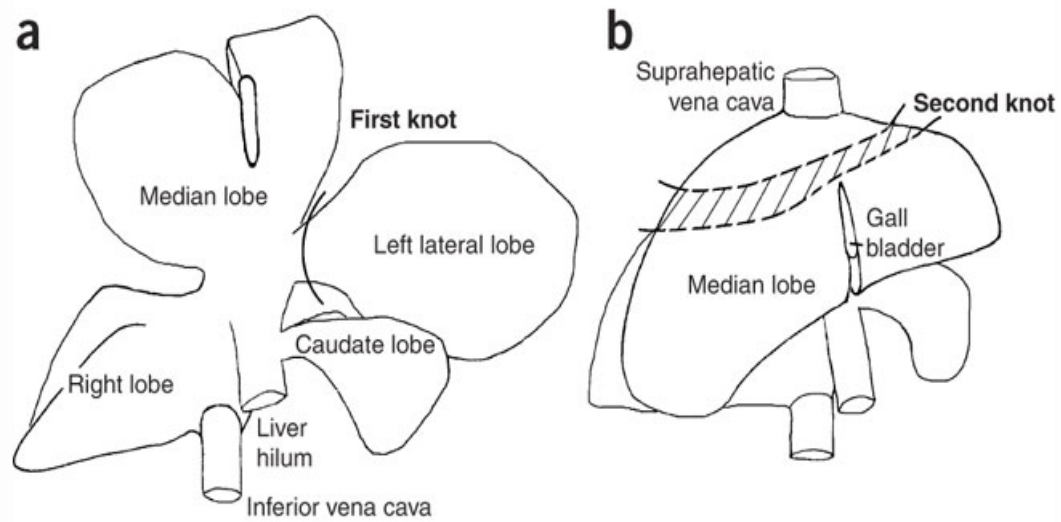
Como se ha descrito anteriormente, existen diferentes modelos para el estudio de la regeneración hepática. Sin embargo, el modelo experimental más empleado y mejor caracterizado es el modelo de hepatectomía parcial

(PHx) en roedores descrito por Higgins el año 1931. En este modelo experimental se practica la resección quirúrgica del lóbulo izquierdo y tres cuartas partes del lóbulo medio, dejando en el animal el lóbulo caudato y el lóbulo derecho (Higgins GM, Anderson RM. Arch Pathol. 1931).

Otros modelos de regeneración hepática inducen necrosis hepatocelular mediante exposición a fármacos o hepatotóxicos (p.ej: CCl<sub>4</sub>) provocando una respuesta regenerativa patológica que está asociada a inflamación crónica, activación de células profibrogénicas, angiogénesis patológica y fibrosis hepática. En contraste, el modelo de PHx se diferencia de la estrategia anterior en que el tejido hepático remanente es completamente sano. De manera que la respuesta regenerativa no está influenciada por ningún otro factor, posibilitando el estudio de regeneración hepática causada exclusivamente por la pérdida de volumen celular funcional. Por tanto, podemos concluir que el estudio de regeneración hepática en el modelo PHx reúne las siguientes ventajas con respecto otros modelos animales:

- Reproducibilidad.
- Mortalidad reducida asociada al procedimiento quirúrgico o a fallo hepático.
- Los lóbulos residuales no han sido manipulados, ni han sido sometidos a ningún tratamiento tóxico.

Gracias a este modelo se han podido describir algunos de los mecanismos principales que intervienen en la regeneración hepática, así como la secuencia temporal de la expresión de citocinas, factores de crecimiento y cambios metabólicos. Otra ventaja de este modelo experimental es su utilidad en el estudio del ciclo celular, ya que tras una PHx los hepatocitos se sincronizan y progresan en el ciclo celular para replicarse.



**Figura 2.** Modelo de Higgins y Anderson, 1931. Figura de Mitchell C. Nat Protoc. 2008.

## REGULACIÓN DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Existen muchas preguntas acerca de cómo se controla el proceso de regeneración hepática. En primer lugar, ¿Cuáles son los factores que desencadenan las primeras fases de regeneración?, ¿qué factor es el que finaliza el proceso? y ¿cómo se controla la regeneración e hiperplasia? Hay numerosos estudios que han enfocado estas cuestiones y que han posibilitado la obtención de un amplio conocimiento del proceso de regeneración. Gracias a estos estudios la comunidad científica ha consensuado que la regeneración hepática es un proceso que se realiza en varias fases:

- La fase inicial o “*priming*”;

Abarca todos los cambios que ocurren inmediatamente tras un daño hepático (Fausto N., J. Hepatol, 2000). Se considera que esta fase tiene una duración de aproximadamente 5 horas. El "priming" se caracteriza por el aumento de la expresión de genes no presentes (o con una modesta expresión) en el tejido quiescente.

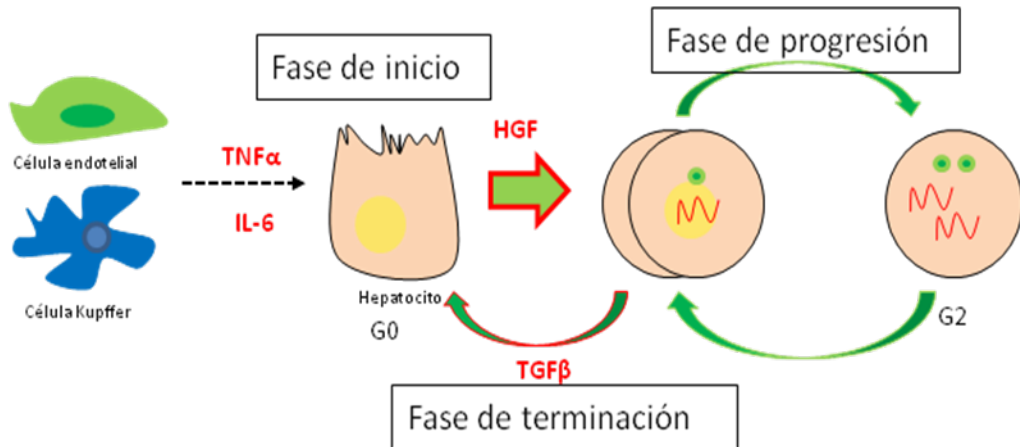
- Fase de proliferación;

Esta fase se caracteriza por un gran aumento de la actividad metabólica en las células del hígado remanente y una notable acumulación de lípidos en los hepatocitos. Un hecho destacable que diferencia a esta fase del resto es que durante este periodo las células hepáticas están sincronizadas en las etapas del ciclo celular.

- La fase de terminación;

La última fase, es la fase de terminación y es quizás la menos entendida. Se ha descrito que al final del proceso de regeneración hay un exceso de parénquima hepático que sobrepasa el volumen hepático

basal (previo a la pérdida de masa hepática). Sin embargo, se ha demostrado que en la etapa de terminación hay apoptosis hepatocitaria. Mediante este mecanismo correctivo el organismo consigue que el peso de los lóbulos remanentes se equipare al peso del hígado basal (Michalopoulos G.K. J Cell Physiol, 2007).



**Figura 3.** Esquema representativo de las diferentes fases de la regeneración hepática.

Figura adaptada de Taub R. et al. Nat Rev Mol Cell Biol., 2004

### FASES DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

#### FASE DE PRIMING.

Durante esta fase inicial, las células hepáticas expresan más de 100 genes que están reprimidos en condiciones basales. El silenciamiento aislado de alguno de estos genes mediante técnicas de biología molecular, ocasiona retraso en la regeneración hepática, pero no bloquea completamente el proceso regenerativo. Este hecho sugiere la existencia de una amplia redundancia génica en el control de la etapa de inicialización de la regeneración hepática (Latasa MU. et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 2007; Li J et al., Am J Pathol. 2009).

Muchos de los genes cuya expresión está aumentada en la fase inicial, están relacionado directamente o indirectamente con la progresión de los hepatocitos en el ciclo celular y, por tanto, con la proliferación hepatocitaria.

Uno de los cambios más tempranos descritos es el aumento de la actividad del uPA (Activador del plasminógeno tipo uroquinasa) que ocurre a los 5 minutos después de una PHx. Produciendo posteriormente la activación del plasminogeno a plasmina (a los 10 minutos) y la aparición de productos de la degradación de fibrinógeno. Además, la actividad proteasa de la uPA activa el factor HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) que se secreta por las células estrelladas como pro-HGF (Currier AR, et. al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003).

Otro de los eventos tempranos es la activación de proteasas que actúan sobre la matriz extracelular, como MMP2 y MMP9 (metaloproteinasa 2 y 9). Esta activación ocurre a los 30 minutos post-hepatectomía y finaliza en el periodo comprendido entre las 24 y las 48h. (Kim TH, et. al. *Hepatology*). El remodelado de la matriz extracelular contribuye a favorecer el contacto de los hepatocitos con ciertos factores de crecimiento. Ello se debe a que la rotura proteolítica de las fibras facilita la liberación y la maduración de factores del crecimiento retenidos en la matriz, como por ejemplo HGF y EGF (Mohammed FF, et. al. *Hepatology.* 2005). Por tanto, el conocimiento de la interacción entre señales mitogénicas y remodelado de matriz extracelular en el contexto de la progresión de los hepatocitos en el ciclo celular es relevante. Por ejemplo, el bloqueo del gen MMP9 en ratones ocasiona un retraso en la regeneración hepática (Olle E.W. et al., *Hepatology.* 2006). Por el contrario, TIMP1 (Inhibidor de metaloproteinasa en tejido) inhibe la proliferación de hepatocitos tras hepatectomía al atenuar la biodisponibilidad de los factores del crecimiento. Estudios con ratones genéticamente alterados han revelado que la pérdida de función de TIMP1 acelera la progresión de los hepatocitos en el ciclo celular (Mohammed FF, et. al. *Hepatology.* 2005). Por tanto, el remodelado de la matriz extracelular, desempeña una función altamente relevante durante la regeneración



hepática. A su vez, el remodelado de matriz extracelular requiere una coordinación compleja entre metaloproteinasas e inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs)

A nivel fisiológico, se observa el aumento de los niveles plasmáticos de otros factores claves en la regeneración hepática, como son; HGF (Stolz DB, et.al. Cancer Res. 1999), TNF $\alpha$  (Yamada Y, et.al. Am J Pathol. 1998), ácidos biliares (Huang W, et. al. Science. 2006) IL6 (Cressman DE, et. al. Science. 1996).y serotonina (Lesurtel M, et. al. Science. 2006)

Aparte de cambios extracelulares, también se han descrito cambios intracelulares en los hepatocitos de los lóbulos remanentes tras la PHx. Por ejemplo, los hepatocitos en fase G1 del ciclo celular son más sensibles a los cambios de concentración de factores de crecimiento. Este hecho contribuye a que la activación de ciclina D1 sea robusta y duradera en etapas iniciales del proceso regenerativo (Nelsen CJ, et. al. J Biol Chem. 2003).

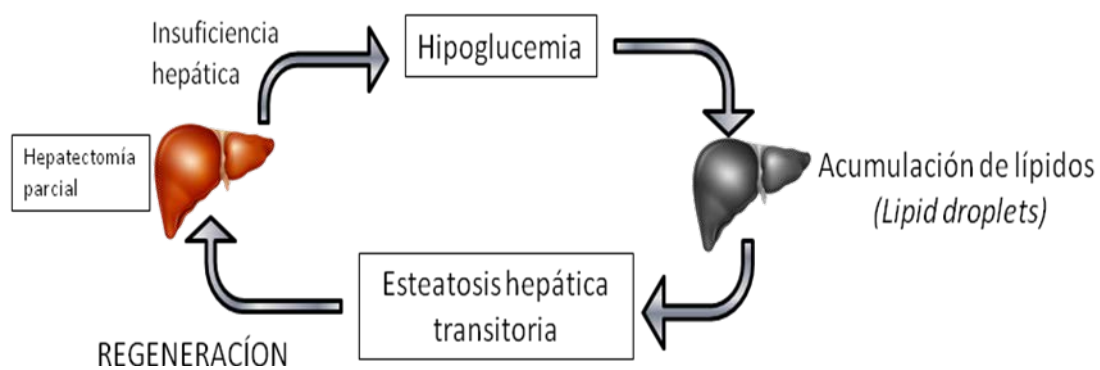
La expresión y activación de citocinas y factores de crecimiento están sincronizados espacial y temporalmente. Se ha observado que la activación de los receptores de factores de crecimiento (como por ejemplo el receptor de HGF, c-Met) ocurre a los 30 minutos tras PHx. IL-6 y TNF- $\alpha$  también son factores que se expresan en la fase inicial de la regeneración hepática. IL-6 mediante su receptor gp130 activa STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) (Streetz KL, et. al. Gut. 2000), y TNF- $\alpha$  activa NF $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) que favorece la expresión de genes relacionados con proliferación celular. (Fausto N., J. Hepatol, 2000)

### *FASE DE PROLIFERACIÓN*

La segunda fase abarca se caracteriza por mitosis generalizada de los hepatocitos y un incremento de la actividad metabólica.

Durante esta fase los hepatocitos comienzan a entrar en mitosis secretando, a su vez señales mitogénicas que permitirán la proliferación de otros tipos celulares no parenquimales, como las células de kupffer y las células endoteliales. En este contexto, se ha demostrado que HGF, EGF y TGF- $\alpha$  inducen proliferación de los hepatocitos. Además, el tratamiento *in vivo* de roedores (con el hígado intacto) con estos factores de crecimiento ocasiona hepatomegalia (Fujiwara K, et. al. Hepatology. 1993). Otros factores hepatoregenerativos descritos son TNF (Webber EM, et. al. Hepatology. 1998) norepinefrina, (Cruise JL, et. al. Science. 1985), estrógenos (Ni N and Yager JD. Hepatology. 1994;).

Por lo que respecta a los cambios metabólicos, la pérdida de tejido hepático tras PHx ocasiona hipoglucemia transitoria que induce lipógenesis en los hepatocitos seguido de una acumulación de *lipid droplets* (gotas de lípidos) en los hepatocitos (Thevananther S., Hepatology. 2010 y Gazit V. et al.,Hepatology, 2010).



**Figura 4.** Esteatosis hepática transitoria.

#### FASE DE TERMINACIÓN

La fase final es quizás la menos entendida del proceso de regeneración hepática. Tras la PHx, el peso de los lóbulos remanentes ya regenerados (con hiperplasia e hipertrofia) se asemeja al peso del

hígado inicial. El control estricto del volumen hepático dependiente de la masa corporal fue establecido en 1987 por estudios pioneros que abordaron el trasplante hepático en perros. En estos estudios, se establecieron dos grupos experimentales con diferencias significativas en tamaño corporal. El grupo donante tenía mayor tamaño corporal que el grupo receptor. En estas condiciones experimentales, el hígado trasplantado llegó a reducir su volumen consiguiendo restablecer el cociente "masa hepática/masa total corporal" en los animales receptores. A pesar de la publicación de estos relevantes resultados, todavía se desconocen los mecanismos que intervienen en esta regulación. (Van Thiel DH. et al., *Gastroenterology*, 1987, Kam I. et al. *Hepatology*, 1987).

Aunque se desconoce el mecanismo de regulación del volumen hepático se ha demostrado que los factores TGF $\beta$  y activinas regulan el crecimiento hepático. Estos dos factores inhiben la síntesis de DNA en los hepatocitos. (Nakamura T, et. al. *Hepatology*. 2000).

## CICLO CELULAR

El ciclo celular se divide en 2 estadios bien diferenciados; interfase y mitosis. Durante la interfase la célula se prepara para la división celular incrementando el volumen plasmático, aumentando de tamaño y acumulando nutrientes (fase G1). Todos estos cambios posibilitarán el inicio de la replicación del DNA (fase S). Una vez replicado el material genético, la célula entra en fase G2, en la que sigue incrementando su volumen celular y se prepara para el proceso de división nuclear o mitosis. La mitosis se divide en cuatro fases bien diferenciadas: profase, metafase, anafase y telofase. Los diferentes estadios aseguran una correcta redistribución del material genético que ha sido previamente replicado en la interfase (Norbury C y Nurse P. *Annu. Rev. Biochem.*, 1992).

La regulación del ciclo celular está mediada por las diferentes interacciones entre las proteínas quinasa dependientes de ciclinas (CDKs), una familia de enzimas serina/treonina quinasa, y las ciclinas, proteínas que mediante la unión con las CDKs activan su función.

Así como las CDKs mantienen unos niveles citoplasmáticos estables durante todo el ciclo celular, la expresión de sus proteínas activadoras presentan grandes variaciones. Esta expresión diferencial de ciclinas es característica de la fase del ciclo en la que se encuentre la célula (Pines J. *Cell Growth Differ.* 1991). Las ciclinas presentan una secuencia PEST (secuencia rica en prolina, glutamato, serina y treonina) que actúa como péptido señal de ubiquitinación a tiempos específicos. El equilibrio entre síntesis y degradación de las ciclinas regulan en ciclo celular. Una célula no entra en la siguiente fase del ciclo hasta que no se inicie la degradación de las ciclinas reguladoras de la fase anterior y se inicie la síntesis de la siguientes (Jeffrey PD. et al. *Nature*, 1995).

Existen varios tipos de ciclinas (A, B, D y E) que, además, presentan especificidad por diferentes CDKs.

-Ciclina D: En humanos se han descrito tres tipos de ciclina D: D1, D2 y D3 que forman conjuntamente con CDK4 o CDK6 el complejo CDK-Ciclina D. La formación de este complejo es necesaria para que la célula entre en fase G1 (Assoian RK. et al. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997).

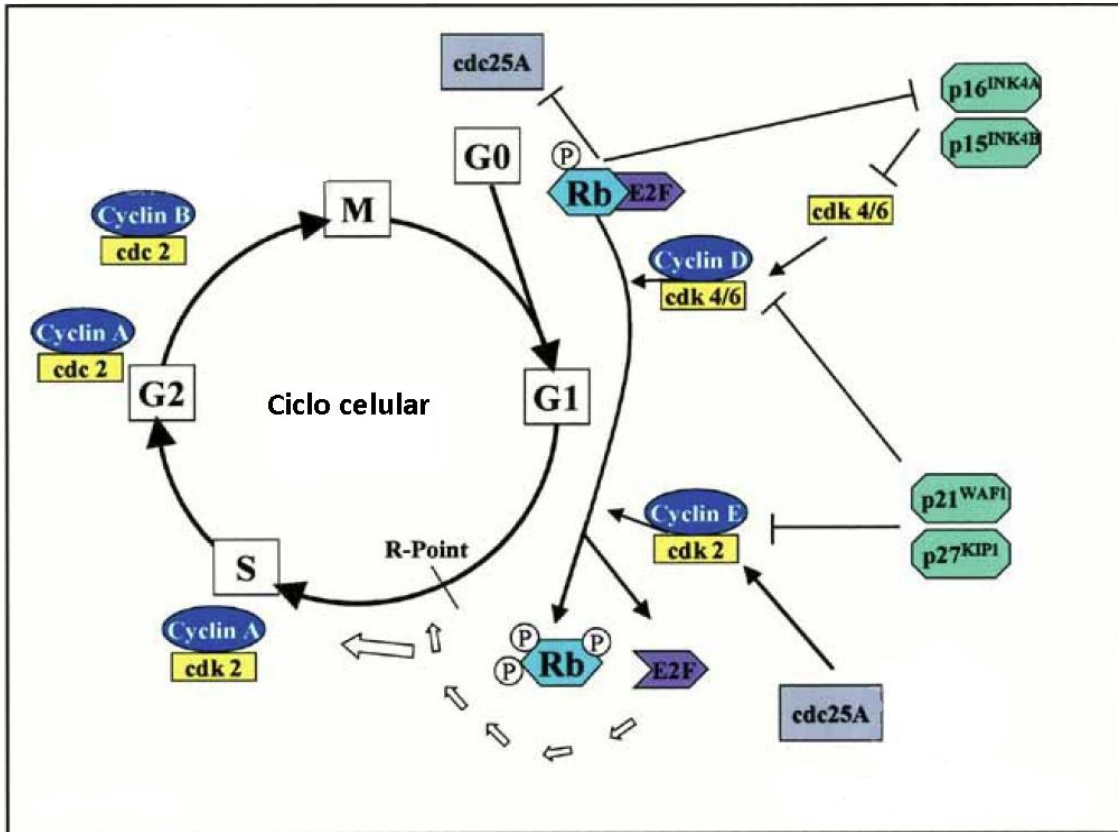
- Ciclina E: La ciclina E es esencial durante la fase G1, cuya asociación con CDK2 forma el complejo CDK2-CiclinaE. Este complejo fosforila la proteína del retinoblastoma en múltiples residuos, previniendo su unión al factor de transcripción E2F. Cuando E2F no forma complejo con Rb, activa la transcripción de proteínas necesarias para la progresión hacia la fase S (Schafer K.A., *Vet. pathol.*, 1998).

- Ciclina A y ciclina B: La ciclina A forma complejo con CDK1 y su actividad es necesaria durante la fase S. Posteriormente, ciclina A forma complejo con CDK2 al final de la fase G2 y promueve la mitosis. Una vez que la célula se encuentra en división celular, el ciclo es regulado mediante la asociación ciclina B y CDK1 (Figura 5).

La actividad de las CDKs también está regulada mediante fosforilación en los residuos conservados de treonina-15 y serina-14 que induce cambios conformacionales que interfieren con la unión de las ciclinas (Jeffrey PD. et al. *Nature*, 1995). Por ejemplo, las quinasas Wee 1 y Myt1 fosforilan CDK1 en la treonina-15 y/o serina-14, inactivándola. Para revertir el proceso es necesaria la actividad enzimática de Cdc25 que mediante la desfosforilación en estos residuos activa nuevamente a CDK1.

Paralelamente, la actividad de las CDKs se puede ver alterada por factores inhibidores, los cuales o se unen a las CDK o al complejo CDK-Ciclina. Existen dos tipos de inhibidores de las CDKs: miembros de la familia de INK4 y miembros de la familia de Cip/Kip. En la familia de INK4 se encuentran los inhibidores del ciclo p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) y p19 (INK4d). Estos inhibidores inactivan específicamente a las CDKs que participan en la fase G1, CDK4 y CDK6. La segunda familia de inhibidores incluye el p27 (Cip2) y p57 (kip2) y p21 (Waf1, Cip1). P27 y p57 inactivan el

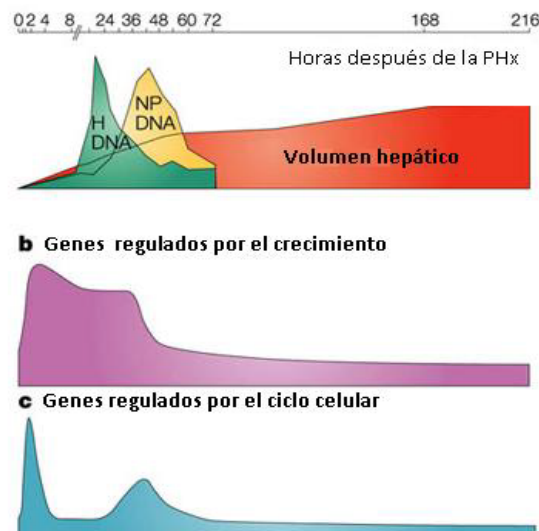
complejo CDK-Ciclina de la fase G1. En contraste, P21 inhibe la síntesis de DNA mediante unión e inhibición de la proteína de proliferación del antígeno nuclear (PCNA) (Waga S. et al., Leukemia. 1997).



**Figura 5.** Esquema del ciclo celular

Las células hepáticas de un hígado en estado quiescente se encuentran en la fase G0 del ciclo celular. Sin embargo, bajo diferentes estímulos, el 95% de las células hepáticas entran en fase replicativa (G1/S). Este proceso está coordinado por diferentes moléculas que actúan secuencialmente para promover la división celular. Esta secuencia temporal comienza con la participación de las citocinas que estimulan a la célula para hacerla sensible a cambios en las concentraciones de factores de crecimiento. (Fisher RP. Cancer. 2012) A continuación, los factores de crecimiento y cambios en señales metabólicas posibilitan la proliferación celular. En las ratas, la síntesis de DNA en los hepatocitos empieza 12h después de la PHx, llegando a observarse un máximo a las 24h. En el ratón, estos sucesos se han

observado con un retraso de 6h con respecto a la rata, pero conservan el mismo patrón de secuencia temporal (Michalopoulos G.K. and DeFrances, Science., 1997). Se estima que tras una PHx es necesario 1,6 ciclos de replicación por hepatocito de media para alcanzar la completa regeneración tisular. Las células no parenquimales inician la fase S del ciclo celular más tarde que los hepatocitos. La replicación del DNA en las células Kupffer y en las células biliares ocurre a las 48h post-PHx. Por su parte, las células endoteliales entran en fase S a las 96h post-PHx. Algunos autores postulan que este fenómeno se debe a que los hepatocitos secretan factores de crecimiento que estimulan de forma paracrina la replicación de los otros tipos celulares hepáticos (Mohammed FF, Khokha R. Trends Cell Biol. 2005) Como se observa en la figura inferior, durante los dos primeros días tras la PHx se observa un aumento de la expresión de los genes regulados por el crecimiento (como la  $\beta$ -actina). Sin embargo, los genes regulados por el ciclo celular, siguen un patrón cíclico, como se muestra en color azul (Taub R. et al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2004)



**Figura 6.** Esquema de la cinética de síntesis de expresión de DNA de los hepatocitos (verde) y de las células no parenquimales (amarillo). La recuperación del volumen hepático se representa en rojo. b) Esquema de la cinética de expresión de los genes regulados por el ciclo celular, y c) esquema de los genes regulados por el ciclo celular. Figura adaptada de Taub R. et al. Nat Rev Mol Cell Biol., 2004

## MICRORNAs

Los miRNAs se describieron por primera vez en 1993 en estudios realizados en nematodos *C.Elegans*. (Lee RC. et al. Cell, 1993). Estas moléculas de RNA son pequeñas secuencias de unos 22 nucleótidos no codificante que regulan la expresión del RNAm. Se ha descrito que esta regulación puede llevarse a cabo por varios mecanismos: 1) por deadenilación de los mRNAs, 2) represión/activación transcripcional o 3) otros mecanismos aún no conocidos.

No se conoce el número exacto de miRNAs que pueden ser codificados por un genoma. Según los últimos datos publicados por *miRNA.org* (<http://www.microrna.org>) existen 1100 miRNAs en *Homo sapiens* y 717 en *Mus musculus*. En cambio, en *MirBase* (<http://www.mirbase.org/>) se describen del orden de 2042 en humanos y 1281 en ratón (Chamorro-Jordanes, A. et al. Pharmacol Res., 2013). Está ampliamente aceptado que los miRNAs desempeñan una función relevante en la regulación del desarrollo y en la fisiología animal. Sin embargo, de la totalidad de los miRNAs codificados por un genoma solo se conoce la función biológica de un pequeño porcentaje (Ambros V. Nature. 2004).

La síntesis y mecanismos de acción de los miRNAs se desarrolla en 6 pasos: transcripción, procesamiento mediado por Drosha, exportación hacia el núcleo, procesamiento mediado por Dicer y selección de la cadena e interacción con el mRNA diana. Alteraciones en estos pasos pueden contribuir al desarrollo de diferentes enfermedades (Wang X. et al. Gastroenterology, 2012).

Estos pequeños RNAs pueden encontrarse en las secuencias no codificantes de diversos genes, en genes propios de miRNAs, o en transcritos policistronicos. El transcrito primario resultante, llamado pri-miRNA, se caracteriza por su forma de horquilla y por estar poliadenilado (Lee Y, et al. The EMBO J., 2004). Este transcrito primario (pri-miRNA) es procesado en el núcleo por la ribonucleasa III (*Drosha*) en colaboración con la proteína de



unión a dsRNA llamada DGCR8 (*DiGeorge critical region8* o también llamada *Pasha*), manteniendo su forma de horquilla (o *hairpin*) (Yates L.A. et al., Cell, 2013). Esta forma procesada forma un precursor de unos 70 nucleótidos, llamado pre-miRNA. El transportador Exportina-5, una proteína dependiente de GTP, exporta el pre-miRNA al citoplasma. Fuera del núcleo es procesada por la proteína *Dicer* a una secuencia de unos 22 nucleótidos de doble cadena (miRNA/miRNA\*).

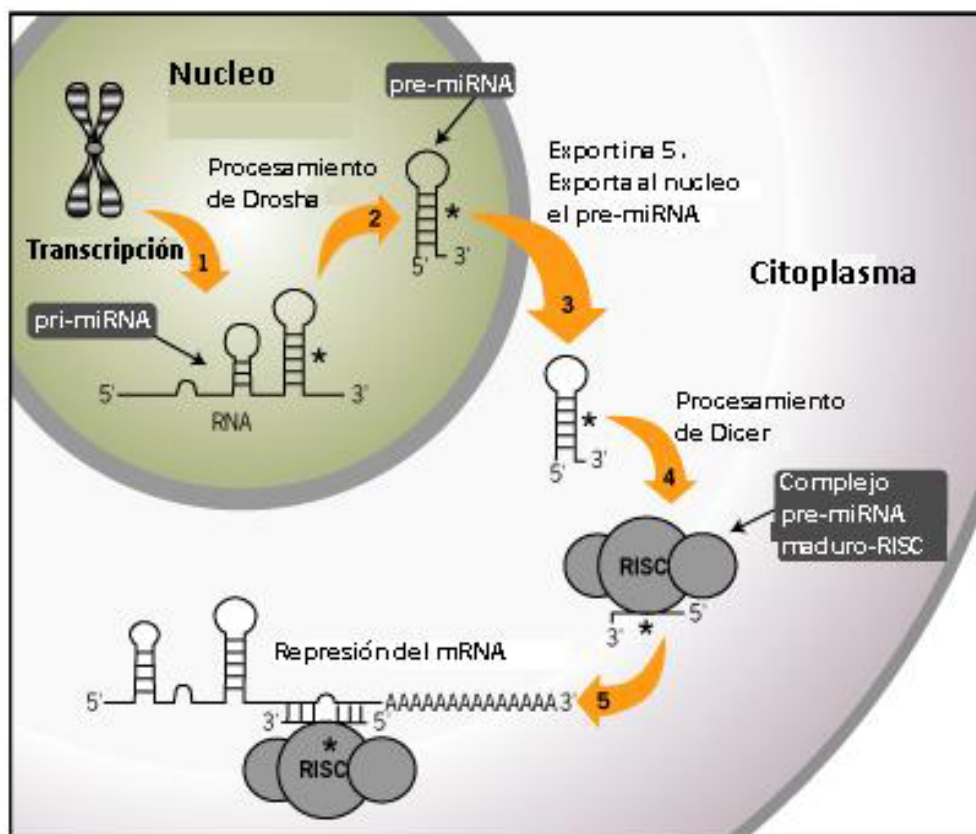
A pesar de que se sintetizan cantidades equimolares de miRNA y de miRNA\*, abunda más el miRNA maduro que los miRNA\*. Este fenómeno se debe a que la parte 5' del miRNA\* es más inestable y se degrada más rápidamente.

El miRNA procesado de doble cadena es incorporado al complejo silenciador inducido por RNA (*RISC*). A continuación, el complejo es guiado hacia su diana de mRNA por las proteínas de la familia *Argonaute* (Ago 1-4 o Ago2) y se posibilita la unión del miRNA con la cadena complementaria del mRNA diana, llamada cadena guía. La cadena no complementaria, llamada cadena pasajera, es degradada. Por tanto, en el complejo solo queda una cadena simple de mRNA unida a la proteína RISC (miRISC). Este complejo media la unión de la región 3'UTR del miRNA con su mRNA diana (Yates L.A. et al., Cell, 2013). Para que el miRNA regule la abundancia del mRNA diana es necesario que los nucleótidos situados entre las bases 2-8 del miRNA (llamada secuencia "*seed*") sean perfectas o casi perfectamente complementarios a la región 3'UTR de su mRNA diana (Fig. 7) (Lai EC. Nature Genet., 2002).

Diversos estudios muestran que los miRNA codificados por plantas y por animales difieren en general en el grado de homología que presentan hacia sus respectivas dianas de mRNA. Un estudio en la revista *Science* publicado en 2002 demostró que en las plantas, los miRNAs se unen de manera precisa o casi precisa con su cadena complementaria de mRNAs diana (Hutvagner, G. y Zamore, P. D. Science, 2002). Por otro lado, otro estudio publicado dos años más tarde demostró que los miRNAs animales se complementan de manera poco precisa a su mRNA diana. Sin embargo, los

miRNAs codificados por animales también pueden inhibir la síntesis de la proteína y, en ciertos casos, pueden estabiliza la cadena del mRNA (Meister G, Tuschl T. Nature 2004.). El mecanismo por el que el miRNA puede regular la síntesis proteica y la estabilidad del mRNA se desconoce en la actualidad.

Los miRNA son necesarios en el desarrollo y la organogénesis. La pérdida de Dicer en ratones resulta letal en la fase E7.5. Además, no se han podido obtener células madre embriónicas de estos ratones, sugiriendo que Dicer es necesario para mantener la pluripotencia celular (Bernstein E, et. al. Nat Genet. 2003).

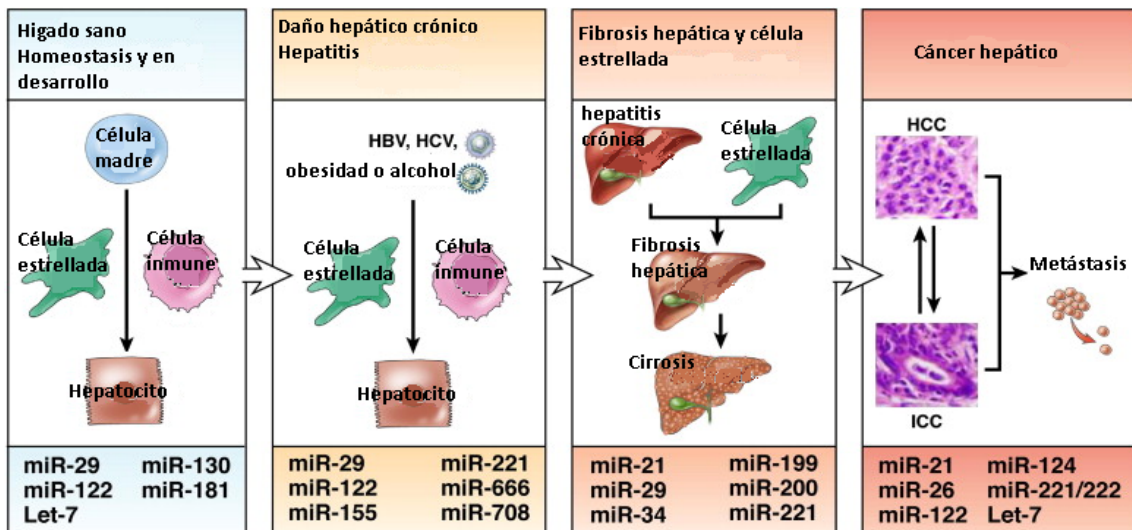


**Figura 7.** Esquema de la síntesis de los miRNAs

*PAPEL DE LOS MIRNAS EN ENFERMEDADES HEPÁTICAS*

El papel de los miRNAs en las diferentes enfermedades hepáticas es un campo poco explorado. Sin embargo, existen diversos estudios que han demostrado la importancia de los miRNAs en el desarrollo embrionario del hígado (Zaret KS. Nat Rev Genet. 2002, Stefani G, et. al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008).

Además, se ha descrito la función fisiopatológica de varios miRNAs en la enfermedad hepática crónica de diferente etiopatogenia (Fig. 8) (Wang XW. et al., Gastroenterology, 2012).



**Figura 8.** Resumen de la implicación de los miRNAs en diferentes enfermedades hepáticas

Figura adaptada de Wang XW. et al. Gastroenterology., 2012

*PAPEL DE LOS MIRNAS EN REGENERACIÓN.*

Diversos estudios han demostrado la importancia de los miRNAs en el campo de la regeneración tisular. Estudios en *Danio rerio* (pez zebra) han demostrado que la supresión de miR-133 o de miR-203 es necesaria para la regeneración de la aleta (Thatcher EJ, et .al.. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008). En la regeneración hepática en mamíferos, concretamente en modelos

murinos, se demostró que durante la regeneración existe un cambio en la expresión de miRNAs. Además, se ha identificado a miRNA-21 y miRNA-378 como importantes reguladores de la regeneración hepática (Song G. et al., *Hepatology*, 2010 y Castro R.E. et al. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2010).

De los miRNAs específicos de hígado, la expresión de miR-122a representa un 70% de la expresión total de miRNAs hepáticos. Se ha demostrado que este miRNA desempeña una función destacada en el metabolismo del colesterol y en el metabolismo lipídico. Adicionalmente, se ha observado que miR-122a está implicado en la resistencia a la infección por virus de la hepatitis C (Sakurai F, et. al. *Virus Res.* 2012); y se correlaciona con la progresión del carcinoma hepatocelular (Hand. N.J. et al., *Hepatology*, 2009).

### *MIR-33*

MiR-33 es un miRNA intrónico altamente conservado entre diversas especies. En humanos, existen dos isoformas de miR-33: 1) miR-33a, cuyo locus se localiza en el intrón 16 del gen que codifica para la proteína SREBP-2 (Proteínas que se unen a elementos reguladores de esteroides) en el cromosoma 22 y 2) miR-33b cuyo locus se localiza en el intrón 17 del gen que codifica para la proteína SREBP-1. En los ratones, en cambio, solo se encuentra la isoforma ortóloga al miR-33a humano que está emplazada en el intrón 15 del gen *Srebp-2*. Debido al hecho de que miR-33 está emplazado en intrones del gen *Srebp*, su expresión se regula por moduladores de la expresión de *Srebp* (Rayner K.J. et al., *Science*. 2010). La proteína SREBP participa en la homeostasis del colesterol.

Los niveles hepáticos de miR-33 son inversamente proporcionales a los niveles de la proteína ABCA-1 (proteína transportadora de colesterol) y correlacionan positivamente con la expresión de SREBF2 en ratón. Adicionalmente, Rayner K.J. y cols. y Najafi-Shoushtari S.H. y cols, demostraron que miR-33 coordina la movilización del colesterol a través de

la regulación de las proteínas ABCA-1 (Najafi-Shoushtari S.H. et al. Science. 2010) y ABCG-1, regulando la homeostasis de colesterol. Una sobreexpresión de este miR atenúa el flujo de colesterol y disminuye la formación de la lipoproteína de alta densidad (HDL) (Rayner K.J. et al. Science. 2010 y Marquart T.J. et al, PNAS, 2010). Además, estudios publicados en 2011 demostraron que miR-33 es capaz de reducir el tamaño de la placa aterosclerótica (Rayner K.J. et al. J Clin Invest. 2011 y Rayner K.J. et al. Thromb Haemost. 2012). Estos estudios demuestran la potencial aplicabilidad clínica de miR-33 en el tratamiento de la arteroesclerosis.

El metabolismo del colesterol es a su vez una importante señal metabólica que regula la progresión del ciclo celular. Por ejemplo, se ha observado que la inhibición del colesterol frena el ciclo en la fase G2 (Martinez-Botas J. et al. FASEB, 1999). En este contexto, se ha demostrado también que la sobreexpresión de SREBP-1a activa la transcripción de inhibidores de CDKs, p21, p27 y p16 y reduce la actividad de CDK2 y CDK4 (Nakakuki. M. et al. FEBS J. 2007). Estos estudios sugieren una importante relación inexplorada entre miR-33 y la proliferación celular que ha sido objeto de estudio en esta tesis.

## FACTORES DE CRECIMIENTO Y CITOCINAS

Los hepatocitos en estado quiescente expresan gran variedad de receptores de factores de crecimiento como son los receptores de PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), factores de crecimiento de fibroblasto y citocinas, TNF, IL-6 y c-Kit. Estudios *in vitro* con hepatocitos primarios o con líneas celulares de hepatocitos han demostrado que, a pesar de la gran variedad de receptores que expresan, los ligandos de los receptores EGF, TGF- $\beta$ , HGF son los que realmente modifican la respuesta mitogénica (Block G.D. et al, J Cell Biol. 1996) y, por tanto, han acaparado el interés de los investigadores que estudian el proceso de regeneración hepática.

A continuación, y siguiendo el consenso bibliográfico, se describen los factores que contribuyen mayoritariamente al proceso de regeneración.

### *FACTOR DE CRECIMIENTO HEPATOCITARIO (HGF)*

El HGF se sintetiza mayoritariamente en las células hepáticas estrelladas (HSC) y, en menor medida, en las células endoteliales hepáticas. Su secreción se acumula en la matriz extracelular hepática incrementando notablemente su biodisponibilidad. El hígado no es el único reservorio de HGF ya que este factor de crecimiento también se acumula en otros órganos como los pulmones, el páncreas, la placenta, el cerebro, etc. Sin embargo, cuando es inyectado exógenamente se acumula principalmente en el hígado. El receptor de HGF se denomina c-Met y se expresa en células epiteliales, endoteliales y neuronas. La activación c-Met estimula señales mitogénicas y antiapoptóticas (Naldin et al. EMBO J. 1991). Por ejemplo, se ha descrito que c-Met interacciona con el receptor Fas previniendo su trimerización y, por tanto, inhibiendo la activación de vías de señalización pro-apoptóticas (Wang X. et. al. Mol Cell. 2002).

Numerosos estudios han relacionado el HGF con el proceso regenerativo, el correcto desarrollo y funcionamiento hepático:

- 1) La supresión de HGF o del gen que codifica para el receptor c-Met está asociado a letalidad embrionaria y a atrofia hepática fetal (Patijn GA. *Hepatology*, 1998).
- 2) Después de una hepatectomía parcial los niveles en plasma de HGF aumentan entre 10 y 20 veces (Lindros PM. et al. *Hepatology*, 1991).
- 3) HGF tiene robustas propiedades mitogénicas y estimula el rápido crecimiento de los hepatocitos *in vitro* (Block G.D. *J Cell Biol*, 1996).
- 4) El tratamiento intravenoso con HGF causa proliferación hepatocitaria y hepatomegalia en rata y ratón (Patijn GA. *Hepatology*, 1998).
- 5) La PHx ocasiona la temprana activación y fosforilación de c-Met (30-60 minutos) en el tejido hepático tras la PHx (Borowiak M. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004).
- 6) La supresión del gen que codifica para el receptor c-Met bloquea la regeneración hepática tras la PHx (Borowiak M. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, y Huh CG. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004).

El HGF es un claro iniciador de la respuesta hepatoproliferativa ya que es un agente mitógeno directo para los hepatocitos. Sin embargo, no existen evidencias de que la actividad de HGF sea suficiente en el proceso de regeneración hepática.

### *FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-ALPHA (TNF- $\alpha$ )*

El TNF- $\alpha$  es una citocina proinflamatoria que en el hígado se sintetiza mayoritariamente por las células de Kupffer. TNF- $\alpha$  ejerce su función a través de dos receptores: TNFR1 o TNFR2 y activa vías de señalización

relacionadas con supervivencia celular, apoptosis, respuesta inflamatoria y diferenciación celular (Kawasaki H, et. al. Nat Biotechnol. 2002).

TNF- $\alpha$  se considera un factor relevante durante la regeneración hepática ya que contribuye al inicio de la proliferación celular (Freimuth J, et. al. Hepatology. 2013). TNF- $\alpha$  activa el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB) y esta activación resulta en la expresión de genes mitogéticos (Diehl AM, et. Al. Am J Physiol. 1994). En el contexto de la regeneración hepática, el bloqueo de la actividad de TNF- $\alpha$  mediante tratamiento con anticuerpos específicos durante la hepatectomía parcial ocasiona un retraso en la regeneración hepática y disminuye la respuesta proliferativa (Akerman P. et. al. Am J Physiol, 1992). Además, ratones deficientes en el receptor I de TNF muestran una disminución de la síntesis de DNA que se traduce en una regeneración ralentizada tras la PHx (Yamada Y, et. al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997).

### *INTERLEUCINA-6 (IL-6)*

La IL-6 es una citocina producida mayoritariamente por los macrófagos. La IL-6 se asocia a su receptor soluble, formando un complejo que presenta afinidad por el receptor gp130, expresado por los hepatocitos.

Existe cierta controversia respecto a la relevancia de esta citocina durante el proceso regenerativo. Por ejemplo, estudios realizados con ratones manipulados genéticamente establecieron que la regeneración hepática requiere la intervención de IL-6 tras la PHx pero IL-6 no actúa como "factor suficiente" en este proceso (Cressman D.E. et al. Science, 1996). En otros estudios, se ha demostrado que a pesar de la deficiencia de IL-6 la regeneración hepática cursa con normalidad aunque se reduzca la activación de STAT3, un efector activado por la vía de señalización de IL-6. Paralelamente, se ha demostrado que la delección de gp130 en modelos murinos no modifica la cinética ni la eficiencia de la regeneración hepática. (Sakamoto T. et al. Hepatology. 1999). Sin embargo, se ha demostrado que la sobreexpresión de IL-6 y de su receptor soluble inducen hiperplasia y que



la IL-6 es necesaria para evitar la progresión de la necrosis hepatocelular y ayuda al inicio de la regeneración hepática (Hecht N, et. al Mol Ther. 2001).

A pesar de las discrepancias comentadas en el párrafo anterior, actualmente está establecido que la IL-6 es un factor que optimiza el proceso de regeneración hepática en los estadios iniciales de regeneración tras la PHx (Galun E, et. al. Methods Mol Biol. 2013).

#### *FACTOR DE CRECIMIENTO TRASNFORMANTE-BETA (TGF-B).*

En hígado, el TGF- $\beta$  se expresa mayoritariamente en las HSC. A grandes rasgos, su principal actividad biológica a nivel hepático es inhibir la proliferación de los hepatocitos y suprimir la producción de HGF y su liberación mediada por la uroquinasa. En dosis altas, bloquea la replicación de DNA en hepatocitos proliferativos tras PHx (Russell WE. et al. Proc Natl Acad Sci U S A., 1988). En un hígado quiescente, TGF- $\beta$  contribuye a mantener a los hepatocitos estancados en la fase G0 del ciclo celular, mientras que la inhibición de su actividad posibilita la progresión de los hepatocitos en el ciclo celular. En el contexto de la regeneración hepática, se ha demostrado que el tejido hepático contiene concentraciones elevadas de TGF- $\beta$ . La síntesis de TGF- $\beta$  se incrementa al cabo de 2-3 horas tras PHx y se mantiene elevada durante 72 horas, aproximadamente (Jakowlew SB, et. al. Cell Regul. 1991). Sin embargo, los hepatocitos de un hígado regenerativo presentan una disminución significativa de la expresión de los receptores TGFR1 y TGFR2 a las 48 horas tras la PHx. De esta forma, los hepatocitos no están expuestos a la acción apoptótica y anti-mitogénica inducida por TGF- $\beta$  (Chari RS, et. al. Am J Surg. 1995).

A pesar de las consideraciones realizadas y de la idea establecida de que TGF- $\beta$  actúa como señal de terminación en la regeneración hepática no existen estudios concluyentes que lo confirmen. Estudios realizados con ratones deficientes en TGF- $\beta$  o deficientes en uno de su receptores, presentan un volumen hepático similar a su basal tras PHx. Sin embargo, se

ha descrito que la supresión conjunta de TGF- $\beta$  y activina (un miembro de la familia de TGF- $\beta$  que actúa como agente anti-proliferativo en los hepatocitos) afecta a la fase de terminación de la regeneración hepática. Este dato sugiere que TGF- $\beta$  no actúa aisladamente y requiere de otros cofactores para regular apropiadamente los procesos de terminación hepatoproliferativa (Oe S. et. al. Hepatology, 2004).

## METABOLISMO LIPÍDICO

Diversos estudios realizados en ratones han demostrado que tras una hepatectomía parcial los animales padecen inmediatamente hipoglucemia y esteatosis transitoria. La acumulación de lípidos en los hepatocitos no acontece exclusivamente tras una hepatectomía parcial, sino que también ocurre en modelos experimentales de toxicidad hepática. En estos modelos, se ha observado una correlación directa entre acumulación lipídica y daño hepático (Gazit V. et al. *Hepatology*, 2010).

Utilizando la técnica de microarrays en tejido hepático, Shteyer y cols., demostraron que tras una hepatectomía parcial se observaba un aumento de genes relacionados con adipogénesis. La mayoría de genes sobreexpresados coincidieron con genes que regulan la diferenciación de los adipocitos. Estos resultados sugieren que la esteatosis transitoria, característica del proceso regenerativo en hígado, está altamente regulada por el transcriptoma del hepatocito en fase de proliferación (Shteyer E. et al, *Hepatology*. 2004).

A lo largo de los últimos años el uso de fármacos (clofibrato, leptina o propranolol) y de modelos transgénicos en ratón han permitido establecer que la interrupción de la acumulación lipídica perjudica la correcta regeneración hepática (Rudnick D.A. et al. *Int. J. Hepatol.* 2012). Por ejemplo, la modificación génica de proteínas que afectan la lipogénesis, causa lipodistrofia hepática e hipolipidemia en el tejido adiposo periférico, estos animales tras una hepatectomía parcial sufrían una menor hipoglucemia y una menor acumulación de lípidos, dando lugar a una menor regeneración hepática (Gazit V. et al. *Hepatology*, 2010). Estos estudios sugieren que la acumulación lipídica durante la regeneración hepática desempeña una función clave en el inicio de la proliferación celular.

Los mecanismos implicados en la inducción de esteatosis transitoria durante la regeneración hepática no están todavía completamente esclarecidos. Además, hay controversia en la literatura. En este contexto, hay un estudio que demuestra que la regeneración hepática tras PHx es completamente

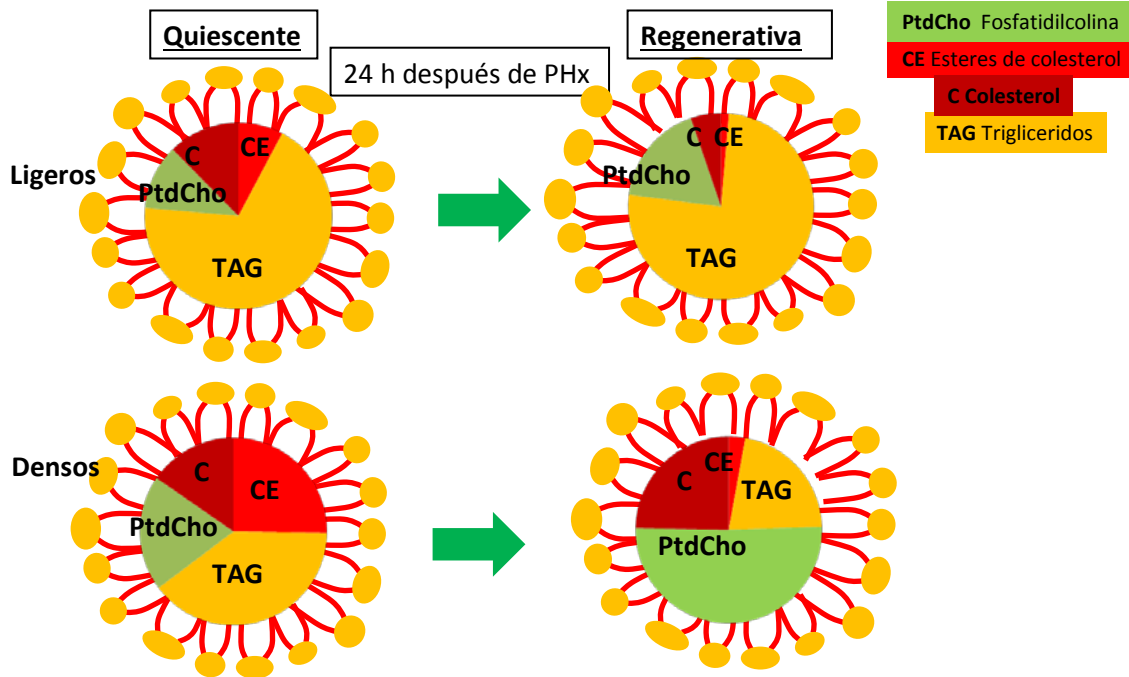
normal a pesar de la inhibición de la acumulación hepática de triglicéridos. Para llegar a esta conclusión, los investigadores utilizaron diferentes grupos experimentales de ratones modificados genéticamente, como por ejemplo el grupo experimental de ratones LFabp<sup>-/-</sup> (proteína de unión de ácidos grasos) (Newberry E.P. et al. Hepatology. 2008). Otros estudios han investigado la función del colesterol durante la regeneración hepática. La deficiencia de PCSK9 (proteína convertasa subtilisin/kexin tipo 9) (que en otros modelos experimentales patológicos está relacionada con la disminución de colesterol circulante), ocasiona una deficiente regeneración hepática tras practicar la PHx. Esta deficiencia se revierte cuando la dieta de los ratones *Pcsk9*<sup>-/-</sup> es suplementada con colesterol (Zaid A. et al. Hepatology, 2008). Otro estudio demuestra que el gen del receptor nuclear LXR, responsable del metabolismo del colesterol, disminuye tras una PHx. En este mismo estudio, la sobreexpresión de LXR se correlacionó con niveles bajos de colesterol circulante y menor regeneración hepática (Lo Sasso G. et al, Hepatology, 2010). A partir de estos resultados se puede inferir que la expresión de LXR podría inhibirse para garantizar la concentración intracelular de colesterol en los hepatocitos. Esta condición sería necesaria para la proliferación hepatocitaria.

### *LIPID DROPLETS*

El hígado es un órgano clave en el mantenimiento de la homeostasis lipídica. Bajo determinadas condiciones de estrés, como ocurre durante la regeneración hepática, el hígado también actúa como reservorio de lípidos. Los lípidos en el hígado se acumulan en orgánulos localizados en el citoplasma que reciben el nombre de *lipid droplets*. Los *lipid droplets* están formados por lípidos neutros, como los triacilglicéridos, y por ésteres de colesterol. Estos componentes lipídicos están rodeados de una monocapa de fosfolípidos y colesterol unidos a proteínas. Esta composición suele ser

mayoritaria aunque varía dependiendo del tipo celular y del contexto proliferativo.

Después de una hepatectomía parcial se inician muchos cambios en la homeostasis del colesterol para permitir la correcta regeneración hepática. Por ejemplo, el hígado requiere colesterol que se incorporará a nuevas membranas plasmáticas formadas durante la proliferación hepatocelular. Además, la relación entre la síntesis *de novo* y su degradación se modifica para asegurar suficientes niveles de colesterol. Estos cambios también están acompañados por mecanismos de movilización del colesterol desde los *lipid droplets* hacia las membranas celulares. En el modelo experimental de la regeneración hepática, Garcia-Arcos y cols. demostraron que existían dos tipos de *lipid droplets*: ligeros y densos. Además, los autores documentaron que la composición de los *lipid droplets* se modificaba en los momentos iniciales del proceso regenerativo. Los *lipid droplets* considerados como ligeros contenían una menor concentración en ésteres de colesterol y los *lipid droplets* considerados como densos contenían una menor concentración de triglicéridos (Fig. 9). Estos resultados evidencian la importancia del metabolismo lipídico intrahepático durante la regeneración hepática (García-Arcos, I. et al., *Lipids*. 2010).



**Figura 9.** Esquema de los diferentes *lipid droplets*. Arriba se representan los *lipid droplets* considerados ligeros y abajo los densos, a la derecha los *lipid droplets* que se encuentran en un hígado en estado quiescente y a la izquierda los que se encuentran en hepatocitos en estado regenerativo. Figura adaptada de García\_Arcos et. al. *Lipids*, 2010.

## LÍPIDOS

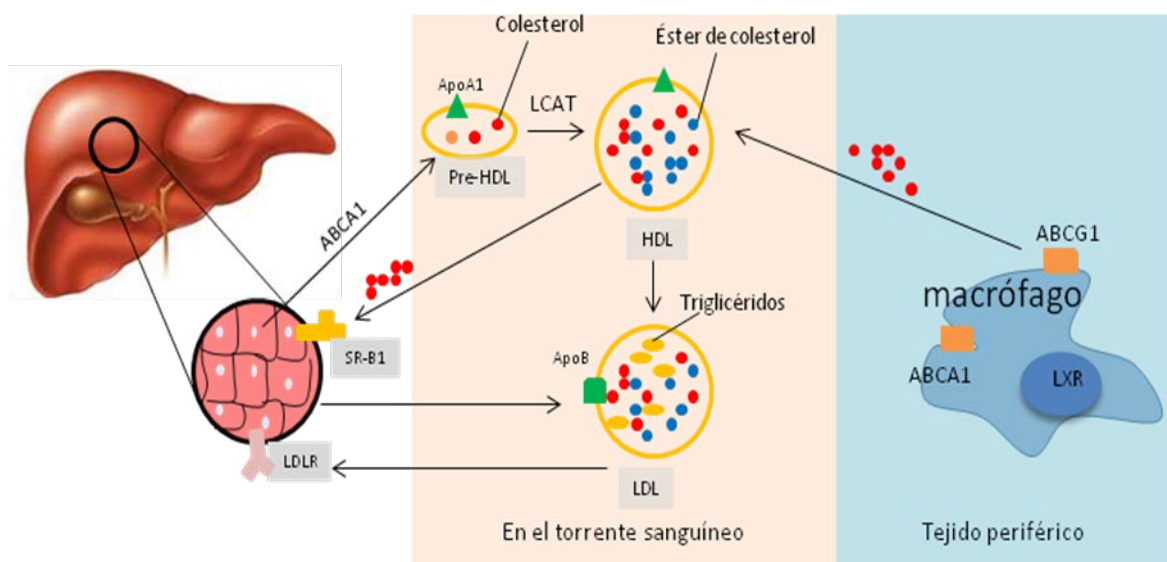
Se ha descrito que durante la regeneración hepática el lipidoma hepático y circulante se modifica notablemente. Los lípidos que ven modificada su concentración de forma más significativa son los ésteres de colesterol, el colesterol, la fosfatidilcolina y los triglicéridos (García-Arcos, I. et al., *Lipids*. 2010). El colesterol es esencial para la vida ya que está involucrado en múltiples funciones como el mantenimiento de las membranas celulares, producción de hormonas e interviene en la progresión del ciclo celular. La mayoría del colesterol se obtiene por ingesta ya que se ha descrito que la eliminación del colesterol en la dieta puede llegar a reducir el colesterol plasmático en un 62%. En el contexto clínico, un incremento de la concentración de colesterol en sangre se correlaciona significativamente con

la formación de placas arterioescleróticas. El colesterol es un lípido insoluble y, por tanto, forma parte en medio acuoso de un complejo micelar compuesto por diferentes proteínas y lípidos. Estos complejos se denominan lipoproteínas y tienen un tamaño, forma, función y composición heterogénea. Hay dos tipos mayoritarios de lipoproteínas: 1) las lipoproteínas de alta densidad (HDL), también conocidas popularmente como “colesterol bueno”, que participan en el transporte del colesterol desde los tejidos hacia el hígado y 2) las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que son las responsables del transporte del colesterol por el torrente sanguíneo (Kassim SH, et. al. Clin Lipidol. 2010). Su acumulación es responsable de la formación de placa (Besler C, et. al. EMBO Mol Med. 2012).

El principal componente de la lipoproteína HDL es la apolipoproteína Apo A1. Esta proteína consta de diez dominios transmembranales y desempeña una función clave en el transporte del colesterol hacia el hígado ya que tiene gran afinidad por los receptores hepáticos LCAT (*lecithin-cholesterol acyltransferase*) y ABCA1 (*ATP binding cassette A1*). La deficiencia de apoA1 provoca una formación anómala de HDLs que se traduce en una reducción del 70% de la concentración de HDL. Estudios en humanos han demostrado que mutaciones en apoA1 causan una formación acelerada y grave de placa aterosclerótica (Hovingh GK, et. al. Curr Opin Lipidol. 2005, Nguyen D, et. al. Biochemistry. 2013).

Las LDL son captadas específicamente por el receptor LDL (LDLR) que está formado por un zona extracelular de tres módulos que incluye: un dominio con siete dominios contiguos ricos en cisteína, una secuencia de 400 aminoácidos homóloga a EGFP (*epidermal growth factor precursor protein*) y 58 residuos ricos en treonina y serina (Tyler F.Daniels, et al., Int. J.Biol. Sci., 2009). El LDLR es el responsable de captar el colesterol-LDL hacia el hepatocito. La unión entre el receptor y la LDL es mediada por ApoB-100. Alternativamente, también se ha demostrado la participación de otros receptores de lipoproteínas, como los que median la endocitosis de HDL y VLDL, en la absorción de LDL. Una vez se ha producido la unión ligando

receptor, el complejo LDL-LDLR se internaliza en la célula mediante endocitosis (Figura 10). El receptor LDLR es reciclado y transportado de nuevo a la membrana plasmática. Paralelamente, las LDL son metabolizadas a sus componentes fundamentales por enzimas de la vesícula. La mayoría de los lípidos son transformados a ésteres de colesterol que a su vez son hidrolizados a colesterol libre, el cual es incorporado en la membrana plasmática (Jauhiainen M, et.al. J Biol Chem. 1986). Los niveles de LDL están directamente relacionados con el riesgo de sufrir accidentes cardiovasculares y es el principal foco de atención en las terapias antiateroscleróticas. Por ejemplo, pacientes con mutaciones en el gen del receptor LDL o en la apolipoproteína ApoB, proteína mayoritaria en las LDL y necesaria para su formación, presentan grandes cantidades de LDL circulante y una mayor incidencia de placa aterosclerótica. Este defecto es conocido como hipercolesterolemia familiar y afecta a 1 de cada 500 personas (Futema M, et. al. Atherosclerosis. 2013).

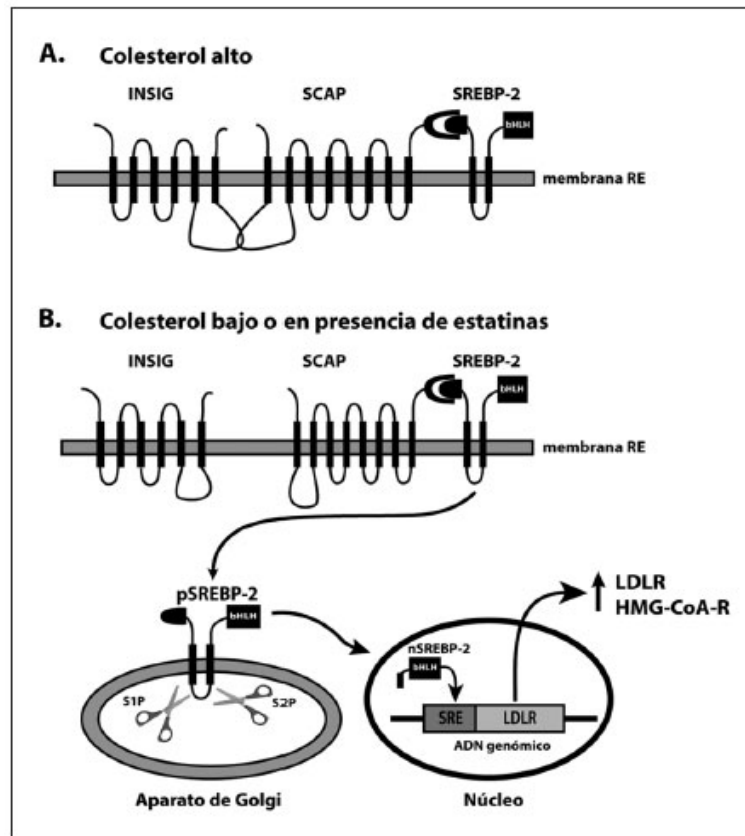


**Figura 10.** Esquema del transporte de colesterol



*REGULACIÓN DEL COLESTEROL*

La producción de colesterol está regulada directamente por la concentración de colesterol en el retículo endoplasmático de las células hepáticas e indirectamente por los niveles de colesterol presente en las LDL. La homeostasis del colesterol celular es regulada por un complejo de proteínas entre las que destaca SREBPs (Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides). Cuando la concentración de colesterol es normal o elevada, las proteínas SREBPs se encuentran formando complejo con las proteínas reguladoras SCAP (proteína activadora a través del clivaje de SREBP) (Hua X, et. al. Cell. 1996) e *Insig* (gen de inducción a insulina) 1 y 2 (Janowski BA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002). Cuando la concentración de colesterol en el retículo endoplasmático disminuye, las proteínas Insig se disocian del complejo SREBP/SCAP, y posibilitan su migración al aparato de Golgi, donde SREBP es procesado por las proteasas SP1 y SP2 (*site 1 and 2 proteases*) (Hua X, et. al. J Biol Chem. 1996, Sakai J, et. al. Cell. 1996). El SREBP procesado, migra al núcleo celular y actúa como factor de transcripción conjuntamente con SER (elemento regulador de esteroides). Entre los genes regulados por el sistema Insig/SCAP/SREBP destacan el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y la hidroximetilglutaril-CoA-reductasa (*HMG-CoA-reductasa*), que es la enzima limitante en la vía de síntesis del colesterol (Fig.11).



**Figura 11.** Esquema de la regulación de colesterol. Figura de V. Cortés. Rev Med Chile 2012.

#### *FUNCIÓN DE LOS LÍPIDOS DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.*

Los lípidos son componentes esenciales de la membrana plasmática celular y, además, desempeñan una función relevante en la regulación de vías de señalización que controlan procesos biológicos como la proliferación, la apoptosis o el reconocimiento célula-célula. Durante la regeneración hepática, diferentes moléculas lipídicas actúan como mensajeros o precursores de nuevos mensajeros que transmiten la señal biológica desde la membrana plasmática hacia el interior del núcleo. Entre estos lípidos hay que destacar la esfingomielina que es un esfingolípido constituyente de la membrana celular. Se ha demostrado que la esfingomielina sufre cambios en su concentración intracelular durante la progresión del ciclo celular, durante apoptosis y diferenciación (Levade T. et.al. Biochim Biophys Acta.

1999). Este hecho sugiere su relevancia durante el ciclo de vida celular. Además, durante el proceso se ha observado un aumento de esfingomielina y una disminución de ceramidas (Coroneos E, et al. J Biol Chem. 1995). Respecto a la función de las ceramidas, se ha demostrado que estos componentes lipídicos inhiben la actividad de la vía de señalización PI3K/AKT y, por tanto, disminuyen la viabilidad celular. Estos resultados son coincidentes con otros estudios que demuestran que al inhibir la formación de esfingomielina en cultivos primarios de hepatocitos, se observa un aumento de apoptosis (Osawa Y. et al. J. Biol Chem., 2005). Todos estos datos sugieren que la composición del lipidoma celular hepático está altamente regulada y que un cambio en su composición podría afectar al proceso de regeneración hepática.

#### *MEMBRANA CELULAR*

La fluidez de la membrana es un parámetro multifactorial que depende de la concentración de colesterol, del proteoma celular, del lipidoma celular, de la saturación de sus componentes, etc. Pero las alteraciones ocasionadas por una hepatectomía parcial no solo se aprecian en la membrana celular, sino también en la membrana microsomal (Deliconstantinos G, et. al. Biochem J. 1983) y nuclear (Tomassoni ML, et. al. Biochem Mol Biol Int. 1999).

Estudios en ratas han demostrado que entre las 15 y 24 horas después de una PHx disminuye el cociente colesterol/ fosfolípidos en la membrana plasmática. Este hecho causa un aumento de fluidez en la misma (Deliconstantinos G. et al. Biochem J., 1983 y Tomassoni ML. et al. Biochem Mol Biol Int, 1999).

Unas estructuras membranales que contribuyen notablemente al grado de fluidez de la membrana plasmática son las caveolas. Las caveolas son estructuras de membrana plasmática ricas en esfingomielina/colesterol que forman invaginaciones de 50 a 100 nanómetros de diámetro. Además, estos dominios están constituidos por un tipo mayoritario de proteínas denominado caveloninas (tipo 1, 2 y 3). En las células hepáticas existen dos

tipos de caveolas: un tipo soluble en tritónX-100 que está asociado al citoesqueleto y otro tipo no soluble en tritónX-100 que está asociado a la regulación de la endocitosis de moléculas de bajo peso molecular (Delgado-Coello B. et al. *Liver Int.*, 2011). La función de las caveolas está mayoritariamente relacionada con el transporte intracelular de colesterol (Fielding CJ, et. al. *J Lipid Res.* 1997). Sin embargo, numerosos estudios demuestran también su implicación en la regulación compartimentalizada de las vías de señalización. En el contexto de la regeneración hepática, ratones deficientes en caveolina-1 muestran una menor esteatosis transitoria y un 38% menos de regeneración hepática tras PHx. Además, la deficiencia de caveolina-1 está asociada a una disminución de la tasa de supervivencia en comparación con ratones control con el mismo background genético (Fernandez MA. et al. *Science*, 2006 y Frank PG. et al. *Cell Cycle*, 2007). En contraste, otros investigadores demostraron posteriormente que los ratones deficientes en caveolina-1 no presentaban diferencias en el índice de mortalidad tras una PHx y, además, la regeneración hepática era completamente normal (Mayoral R. et al. *Hepatology*. 2007). Por tanto, a pesar de la reconocida implicación de la caveolina en el metabolismo del colesterol y en la regulación de la señalización intracelular, todavía existe controversia sobre la función de la caveolina-1 en la regeneración hepática.

En resumen, todas estas evidencias indican que la composición lipídica (o la caracterización del lipidoma) es un parámetro que podría ser útil a la hora de prever el éxito o el fracaso de la regeneración hepática. Sin embargo, existe controversia en la literatura existente y, por tanto, se requieren más estudios que permitan evaluar la potencialidad de este parámetro en el contexto clínico.

## COMPLICACIONES DE LA RESECCIÓN HEPÁTICA TERAPÉUTICA CLÍNICA.

El carcinoma hepatocelular (HCC) constituye un 80% de los tumores hepáticos malignos (Song P, et. al. *Liver Int.* 2012). Si bien es el quinto tipo de cáncer con más incidencia entre hombres y mujeres, es el tercero con más defunciones anuales asociadas en el mundo (<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/liver.asp>). El hígado, además de sufrir tumores primarios es un órgano propicio para desarrollar tumores secundarios. Tal es su prevalencia que se estima que uno de cada tres pacientes con cáncer colorrectal desarrollará metástasis hepática. En este escenario, la supervivencia a cinco años tras la ocurrencia de metástasis en pacientes tratados con quimioterapia es del 1% (Gallinger S, et. al. *Curr Oncol.* 2013) y el tratamiento que presenta una tasa de supervivencia mayor es la resección hepática. Desafortunadamente, el porcentaje de pacientes candidatos a recibir este tratamiento es reducido. Por ejemplo, en los pacientes con metástasis hepática por cáncer colorectal este porcentaje se encuentra situado entre el 10 y el 20% (Scheele J, et. al. *Langenbecks Arch Surg.* 1999). Además, la resecabilidad en el HCC es de un 20-30% y este porcentaje se reduce sensiblemente en pacientes cirróticos (Farmer DG, et. al. *Ann Surg.* 1994).

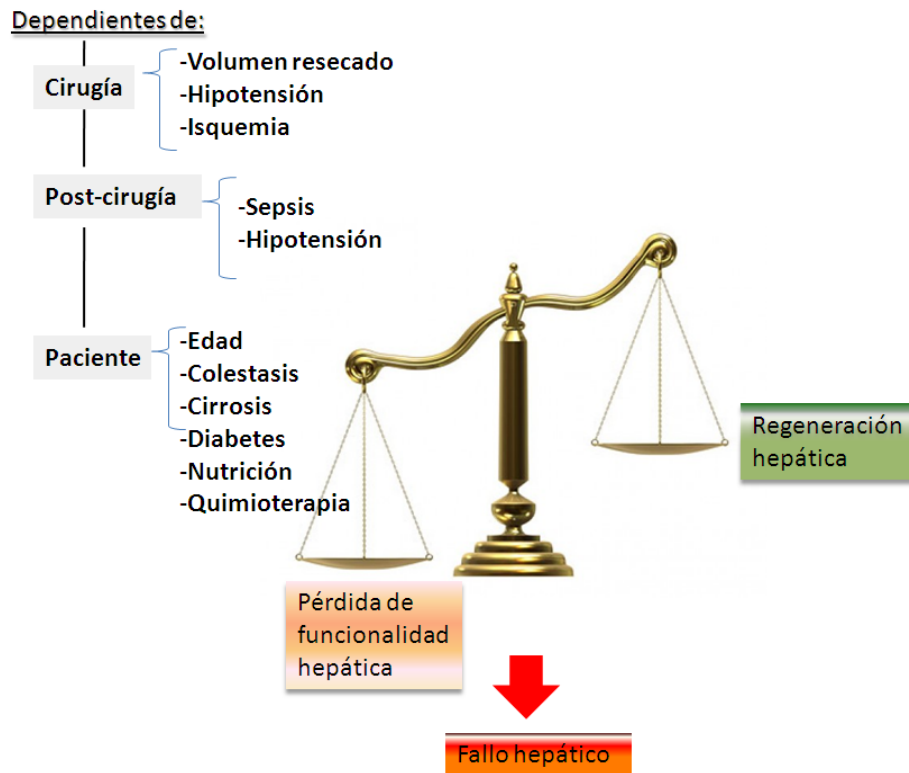
El procedimiento de la resección hepática consiste en la extracción del tejido hepático con signos macroscópicos de patología tumoral. Durante el procedimiento quirúrgico se persigue, a su vez, mantener un volumen de tejido suficiente que permita la correcta funcionalidad del órgano y que preserve la hemodinámica hepática. Estudios clínicos sugieren que la regeneración tras una resección hepática terapéutica es evidente a las dos semanas y se completa en un periodo aproximado de 3 meses (Nagasue N, et. al. *Ann Surg.* 1987 y Yamanaka N, et. al. *Hepatology.* 1993). La comunidad científica ha consensuado que es necesario dejar intacto un 20% del hígado total, lo que equivalente a dos segmentos (Garden OJ, et.al. 2006). Sin embargo, esta recomendación ha de ser contextualizada en presencia de enfermedades hepáticas preexistentes y de tratamientos que

puedan alterar la capacidad regenerativa. En estas condiciones clínicas, una resección hepática del 20% puede desembocar en fallo hepático caracterizado por el desarrollo de coagulopatías, hiperbilirrubinemia y encefalopatía hepática. La incidencia del fallo hepático tras la resección terapéutica puede llegar a ser de hasta un 30% (Van den Broek MA, et. al. *Liver Int.* 2008) y, por tanto, la causa del incremento substancial de mortalidad asociada al procedimiento quirúrgico (Simmonds PC, et. al. *Br J Cancer.* 2006). Por esta razón, en pacientes cirróticos, o pacientes con esteatosis es recomendable no reseccionar más de un 40-70%, o 60% del volumen hepático total, respectivamente (Pawlik TM, et. al. 2008). En estos contextos patológicos, los pacientes con cirrosis hepática establecida presentan alto riesgo de mortalidad tras la resección. Algunos estudios sitúan este riesgo en cifras superiores al 20% (Takenaka K, et. al. *World J Surg.* 1990). A su vez, los paciente cirróticos muestran una expresión hepática reducida de HGF (Kaibori M, et. al. *J Surg Res.* 2002) y de factores de transcripción (Zhao G, et. al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002). Estas deficiencias se traducen en una reducción significativa de la síntesis de DNA y en una regeneración hepática deficiente (Tiberio GA, et. al. *Cytokine.* 2008). Por lo que respecta a la esteatosis, su incidencia es cada vez mayor y su presencia está asociada a una regeneración hepática insuficiente y a un aumento significativo de la mortalidad asociada a la resección hepática (Selzner M, Clavien PA. *Hepatology.* 2000). Los pacientes con esteatosis tienen una probabilidad mayor de sufrir isquemia hepática (Sun CK, et. al. *Transplantation.* 2001) e hiperbilirrubinemia durante las primeras horas post-cirugía. A su vez, se ha correlacionado en pacientes el grado de esteatosis hepática con la mortalidad post-cirugía, siendo esta correlación positiva y significativa (Behrns KE, et. al. *J Gastrointest Surg.* 1998).

Todos estos datos sugieren que el conocimiento de los mecanismos implicados en la respuesta hepatoproliferativa normal y patológica, conjuntamente con las posibles estrategias terapéuticas que puedan

derivarse de este conocimiento, podrían contribuir a disminuir la mortalidad y/o morbilidad de los pacientes sometidos a recesión hepática terapéutica.

En la figura 12 se detallan alguno de los factores mencionados anteriormente que contribuyen a la interrupción de la regeneración hepática y al desencadenamiento del fallo hepático. Este esquema muestra que la correcta recuperación del hígado tras una hepatectomía o trasplante es el producto de un equilibrio entre una regeneración hepática satisfactoria y una baja incidencia de los factores de riesgo causantes de fallo hepático. El conocimiento, tanto del proceso regenerativo como de los factores de riesgo podría contribuir a la prevención de fracasos post-quirúrgicos.



**Figura 12.-** Posibles complicaciones durante la resección hepática. Esquema adaptado de Garcea G, Maddern GJ. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2009





## **OBJETIVOS**



## Objetivos

El hígado es un órgano que presenta una gran capacidad regenerativa. Para estudiar este fenómeno, el modelo de hepatectomía parcial en ratón es el más adecuado (Higgins GM, Anderson RM. Arch Pathol. 1931). Esta técnica, conjuntamente con el uso de modelos animales modificados genéticamente, nos puede facilitar el estudio de las diferentes moléculas o vías de señalización implicadas en el proceso de regeneración hepática.

La resección hepática es una de las medidas terapéuticas más efectivas para el tratamiento del carcinoma hepatocelular. Uno de los problemas a los que se enfrentan estos pacientes es que la aparición de un hepatocarcinoma se asienta sobre un hígado fibrótico o cirrótico. En este contexto clínico, la técnica de la resección se ve comprometida debido a que el hígado cirrótico regenera deficientemente (Bège T, et al. J Gastrointest Surg. 2007). Por este motivo, el procedimiento quirúrgico está asociado a un índice muy elevado de mortalidad (entre el 20 y el 50% según diversos autores). Es por ello, que hipotetizamos que el estudio de la regeneración hepática y el hallazgo de nuevas vías de señalización implicadas en este proceso, posibilitarán el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad hepática crónica. En este contexto, creemos que el estudio de las vías de regulación del metabolismo lipídico hepático tienen más potencialidad terapéutica. Por ejemplo, se ha demostrado que el colesterol es importante en la proliferación celular y se conoce que su deficiencia evita la progresión de las células a través del ciclo celular. Se sabe que cuando hay una acumulación de esteroides, disminuye la actividad de la proteína HMGCR (HMG-coA reductasa), una enzima limitante en la síntesis del colesterol y la expresión del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Por el contrario, cuando disminuyen los niveles de colesterol las células mantienen la actividad de la proteína HMGCR y aumenta la expresión del receptor LDL (LDLR). Todo este proceso está regulado por el

factor de transcripción SREBP (Brown MS et al. Cell, 1997 y Espenshade PJ. J Cell Sci. 2006). A parte de la implicación del colesterol en la regulación del ciclo celular, también es conocido que durante la regeneración hepática se acumulan grandes cantidades de lípidos en forma de gotas llamadas *lipid droplets*, las cuales están compuestas mayoritariamente por colesterol y ésteres de colesterol (Garcia-Arcos I. et al. Lipids. 2010). Aún no se conocen con exactitud los mecanismos y la funcionalidad de esta esteatosis transitoria, ni los mecanismos a través de los cuales la célula es capaz de acumular lípidos durante el proceso regenerativo. Lo que si se ha observado es que tras la hepatectomía parcial existe un descenso de lípidos en el suero, y un aumento de la expresión del gen LDLR. Estos datos sugieren que este receptor estaría involucrado en el transporte de los lípidos hasta el interior de la célula (Bocchetta M. et al. J Cell Physiol. 1993).

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos, el objetivo general de la presente tesis doctoral fue el de investigar como afecta el metabolismo lipídico al ciclo celular y a la regeneración hepática. Específicamente, la tesis se ha dividido en dos estudios:

## PRIMER ESTUDIO

El miR-33 se encuentra en el mismo locus genómico que el gen *Srebp*, y se ha demostrado que este gen regula el ciclo celular. Por lo tanto el objetivo general del primer estudio fue:

- Estudiar el papel del miR-33 en la regulación del ciclo celular y su implicación en la regeneración hepática.

Objetivos específicos:

1. Estudiar la función de miR-33 en la regulación de las CDKs y las ciclinas y, por tanto, su papel en la regulación del ciclo celular.

2. Identificar posibles dianas de interacción de miR-33 con el 3'UTR de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs).
3. Caracterizar la función del miR-33 durante la regeneración hepática en ratones a los que se les ha practicado una hepatectomía parcial.

## SEGUNDO ESTUDIO

La hipótesis específica de este estudio plantea que la actividad del receptor de las LDL afecta al lipidoma del hepatocito durante el proceso de regeneración hepática. Por lo tanto el objetivo general del estudio fue:

- Analizar el efecto de la deficiencia del receptor LDL en la formación de *lipid droplets* y en la proliferación hepatocelular durante la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial.



## **RESULTADOS**





## RESULTADOS

PRIMER ESTUDIO.- MIR-33 REGULA LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR.

Los resultados obtenidos en el primer estudio fueron:

### **1.- El miR-33 regula la expresión post-transcripcional de la ciclina dependiente de quinasa CDK6 y de la ciclina D1.**

Utilizando programas informáticos de predicción de dianas, se observaron potenciales dianas del miR-33 involucrado en proliferación celular.

Se ha observado como posible sitio diana del miR-33 el 3'UTR de las proteínas quinasa dependiente de ciclinas ( cdk6, Cdk8 y cdk19), la ciclina Ccnd1 y ABCA1, p53, Pten, Myc y proteínas quinasa mitogénicas como; Map3k1, Map3k7, Mapk1, Mapk3, Mapk6, Mapk10 y Map14

Para determinar el efecto del miR-33 sobre la expresión del mRNA de CDK6, CDK8, CDK19, CCDND1 y CCNM1 se realizó una transfección a células Huh7 y se analizó los niveles de mRNA de estas células. Tras la transfección con miR-33 se observó una disminución significativa de los niveles de CDK6 y de ABCA1, previamente observados como dianas. Estos mismos resultados se reprodujeron en células A549 transfectadas con miR-33.

Por otra parte, la inhibición del miR-33 endógeno, utilizando una secuencia complementaria al miR-33; (anti-miR-33), provocaba la sobreexpresión de forma significativa de los niveles de CDK6 y de ABCA1 en estos dos tipos celulares.

Como los niveles de las ciclinas varían al largo del ciclo no podíamos observar cambios al transfectar el miR-33. Para poder observar cambios sobre estas posibles dianas, se sincronizaron las células utilizando el protocolo de sincronización por tratamiento doble con timidina. Una vez las células estaban sincronizadas, se realizó la transfección con el miR-33 y se observó una disminución significativa de

los niveles de mRNA de CCDN1, CDK6 y ABCA1 (Figura 1). Los niveles de proteína mostraron la misma disminución (Figura 2).

Por tanto estos datos sugieren que el miR-33 regula genes involucrados en el ciclo celular.

## **2.- miR-33 se une de manera directa al 3'UTR de los mRNA de *Cdk6* y *Ccnd1*.**

Utilizando programas informáticos se predijo que el miR-33 se podría unir a los 3'UTR de los mRNA de *Cdk6* y *Ccnd1* humano. Para valorar y confirmar estos resultados se realizaron unos constructos de la parte 3'UTR de las secuencias de estos genes. Se realizaron 3 constructos para valorar los 3 posibles sitios de unión del miR-33 para el mRNA del *Cdk6* y un constructo para el mRNA del *Ccnd1*.

Estos constructos, tras amplificarlos por PCR y clonarlos para que obtengan el gen de la luciferasa y el gen de la renilla, el cual se expresaría de manera constitutiva como control de la transfección, fueron transfectados en las células COS.

Tras el análisis de la intensidad de luciferasa se observó que en las células transfectadas con miR-33, disminuía la actividad luciferasa de los constructos *Cdk6* y *Ccnd1*. Además si en estos constructos se encontraba una mutación, que evita la unión del miR-33 al locus 3'UTR, esta actividad se revertía. Estos datos indican que el miR-33 se une de manera directa al mRNA de *Cdk6* y *Ccnd1* inhibiendo su expresión.

## **3.- El miR-33 regula la proliferación celular y la progresión del ciclo celular.**

Para observar cómo afecta el miR-33 en el ciclo celular, se transfectaron dos tipos celulares (Huh7 y A549) con miR-33 y se analizó el número de células viables a diferentes tiempos.

Como se puede observar en la figura 4, la sobreexpresión del miR-33 inhibe el crecimiento del ciclo celular en los dos tipos celulares.

Para comprobar estos resultados, se estabilizó la expresión del miR-33 utilizando un lentivirus en células HeLa y MCF-7. Se monitorizó la proliferación celular

utilizando el ensayo de MTT. Se observó que las células con sobreexpresión de miR-33 crecieron más lentamente que las células tratadas con el control. Por el contrario, la inhibición mediante un antagonista del miR-33 provocaba un crecimiento más rápido en las células.

En las células HeLa, con la expresión de miR-33 estable y tras 72 sin suero, se reintrodujo suero en el medio y como era de esperar, tras la aplicación de suero en el medio, las células empezaron a expresar CDK6 y CCND1, siendo esta expresión menor en las células que sobreexpresaban miR-33.

Para analizar cómo afecta el miR-33 en el ciclo celular se sincronizaron células Huh7 en la mitosis utilizando nocodazol, y se transfectaron con miR-33 o con el control. Como se observa en la figura 5 las células transfectadas con el miR-33 quedaron arrestadas en la fase G1 del ciclo celular. Estos datos indican que el miR-33 es importante en la progresión de las fases G1/S.

En estas mismas células Huh7 sincronizadas, se analizó la cinética de expresión durante el ciclo celular a diferentes tiempos. Se observó que, tanto el miR-33a y b como SREBP-1 y 2 disminuían su expresión durante el ciclo celular, tras la mitosis. Esta disminución del miR-33 a las 12h es inversamente proporcional a la expresión de CDK6, CCND1 y ABCA1 que se observa aumentada. Por otro lado, a partir de las 12h se observa un aumento de miR-33, proporcional a la inhibición de ABCA1, al aumento del receptor de apolipoproteína LDL (LDLR) y el receptor de la proteína involucrada en la biosíntesis del colesterol (HMGCR).

#### **4.- El antagonismo de miR-33 en ratones promueve la regeneración hepática.**

Se realizó un modelo de hepatectomía parcial para poder analizar el papel del miR-33 en un modelo animal de proliferación celular con ratones C57BL/6.

Tras el sacrificio de estos animales a diferentes tiempos tras la cirugía, se pesó el hígado y las muestras fueron guardadas y tratadas para su análisis. Como se observa en la figura 7A, en la tinción del ki67 (un marcador de proliferación celular), hay un aumento significativo del número de células que expresan ki67 a las 48h tras la PHx. Al analizar otro marcador como el PCNA se observó el mismo patrón.

Se analizó también la cinética de expresión de miR-33, SREBP2, y de las proteínas involucradas en el ciclo celular; CDK6 y CCND1. Se observó que la expresión del miR-33 disminuía a las 24 horas tras la PHx. Esta disminución era inversamente proporcional a la expresión de CDK6 y CCND1, tal como se observa también *in vitro*.

Estos datos sugieren que miR-33 tiene un papel durante la regeneración hepática.

Para observar el efecto inhibitorio del miR-33 durante la regeneración hepática tratamos estos ratones con 10mg/Kg *intra dermico* durante un mes una vez por semana, con un antagonista de miR-33; una secuencia complementaria de miR-33 que atrapa a miR-33 (miR-33-ASO), inhibiendo su actividad.

Este tratamiento ya se había realizado en ratones anteriormente en el grupo del Dr. Fernández Hernando y está demostrado que disminuye al 50% la actividad de miR-33 sin producir toxicidad.

En este estudio se valoró la expresión en los hígados de los ratones tratados con miR-33-ASO mediante PCR a tiempo real y se observó que la expresión de ABCA1, PCNA, CDK6, CCND1 aumentaban de manera significativa al inhibir el miR-33.

Para calcular como afecta esta inhibición en la regeneración hepática se realizó la hepatectomía parcial a estos ratones tratados y se calculó el porcentaje de regeneración hepática mediante una fórmula bien estandarizada; peso del hígado regenerado / peso total ratón.

Como se observa en la figura 8C, los ratones tratados con miR-ASO presentaban una aceleración en la regeneración hepática, sugiriendo que la terapia de tratamiento con el anti-miR-33 ayuda a la regeneración hepática y que el miR-33 está involucrado en este proceso.

# Mir-33 regulates cell proliferation and cell cycle progression

Daniel Cirera-Salinas,<sup>1,2†</sup> Montse Pauta,<sup>1,3†</sup> Ryan M. Allen,<sup>4</sup> Alessandro G. Salerno,<sup>1</sup> Cristina M. Ramírez,<sup>1</sup> Aránzazu Chamorro-Jorganes,<sup>1</sup> Amarylis C. Wanschel,<sup>1</sup> Miguel A. Lasunción,<sup>5</sup> Manuel Morales-Ruiz,<sup>3</sup> Yajaira Suárez,<sup>1</sup> Ángel Baldán,<sup>4</sup> Enric Esplugues<sup>2,6</sup> and Carlos Fernández-Hernando<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicine; Leon H. Chamey Division of Cardiology and Cell Biology and Marc and Ruti Bell Vascular Biology and Disease Program; New York University School of Medicine; New York, NY USA; <sup>2</sup>Deutsche Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ); A. Leibniz Institute and Cluster of Excellence; NeuroCure; Berlin, Germany; <sup>3</sup>Department of Biochemistry and Molecular Genetics; Hospital Clínic of Barcelona; August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS); Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd); Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Edward A. Doisy Department of Biochemistry and Molecular Biology; St. Louis University; St. Louis, MO USA; <sup>5</sup>Servicio de Bioquímica-Investigación; Hospital Ramón y Cajal; Madrid and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria; Universidad de Alcalá; Madrid and CIBER de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN); Palma de Mallorca, Spain; <sup>6</sup>Immunology Institute; Mount Sinai School of Medicine; New York, NY USA

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

**Key words:** CDK6, cyclin D1, miR-33, cell cycle, microRNA

Cholesterol metabolism is tightly regulated at the cellular level and is essential for cellular growth. MicroRNAs (miRNAs), a class of noncoding RNAs, have emerged as critical regulators of gene expression, acting predominantly at the posttranscriptional level. Recent work from our group and others has shown that *hsa-miR-33a* and *hsa-miR-33b*, miRNAs located within intronic sequences of the *Srebp* genes, regulate cholesterol and fatty acid metabolism in concert with their host genes. Here, we show that *hsa-miR-33* family members modulate the expression of genes involved in cell cycle regulation and cell proliferation. MiR-33 inhibits the expression of the cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) and cyclin D1 (CCND1), thereby reducing cell proliferation and cell cycle progression. Overexpression of miR-33 induces a significant G<sub>1</sub> cell cycle arrest in Huh7 and A549 cell lines. Most importantly, inhibition of miR-33 expression using 2' fluoro/methoxyethyl-modified (2'F/MOE-modified) phosphorothioate backbone antisense oligonucleotides improves liver regeneration after partial hepatectomy (PH) in mice, suggesting an important role for *miR-33* in regulating hepatocyte proliferation during liver regeneration. Altogether, these results suggest that *Srebp/miR-33* locus may cooperate to regulate cell proliferation and cell cycle progression and may also be relevant to human liver regeneration.

## Introduction

Intracellular cholesterol is obtained from plasma lipoproteins or synthesized de novo from acetyl-CoA.<sup>1</sup> As an essential component of mammalian cell membranes, cells require cholesterol for proliferation.<sup>2-5</sup> In addition to its structural requirement, cholesterol is important for other cell functions, such as bile acid and hormone synthesis as well as during embryonic development. The requirement of cholesterol for cell growth and division of mammalian cells has been known for many years,<sup>2-4</sup> but whether this is just a consequence of its use for membrane formation or whether it also plays a regulatory role in this process has not been clarified. Cholesterol is also required for cell cycle progression, and its deficiency leads to cell cycle arrest in G<sub>2</sub>/M.<sup>6</sup> Moreover, other non-mevalonate derivatives are essential for the G<sub>1</sub>-S transition, thus confirming the relationship between the cholesterol synthesis pathway and cell cycle progression.<sup>7,8</sup>

The intracellular cholesterol level is tightly controlled by feedback mechanisms that operate at both transcriptional and post-transcriptional level. When cells accumulate excess sterols, the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR), the rate-limiting enzyme of cholesterol biosynthesis, declines by more than 90%, and the cell surface expression of low-density lipoprotein receptor (LDLr) decreases. By contrast, upon depletion of intracellular cholesterol, cells maintain a high activity of HMGCR and high expression of LDLr. This coordinated process is regulated by ER-bound sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs).<sup>9-12</sup> The SREBP family of basic-helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-LZ) transcription factors consist of SRERP-1a, SREBP-1c and SREBP-2.<sup>9-12</sup> The SREBPs differ in their tissue-specific expression, target gene selectivity and the relative potencies of their trans-activation domains.<sup>9-12</sup> SREBP-1c targets genes that are involved in fatty acid metabolism, such as fatty acid synthase (FASN). SREBP-2 regulates the expression of cholesterol-related genes, such as HMGCR and LDLr. SREBP-1a targets both sets of genes. In addition to regulating

\*Correspondence to: Carlos Fernández-Hernando; Email: carlos.fernandez-hernando@nyumc.org.  
Submitted: 12/13/11; Accepted: 01/19/12  
<http://dx.doi.org/10.4161/cc.11.5.19421>



lipid metabolism, these transcription factors have also been implicated in the regulation of cell cycle.<sup>13</sup> Bengoechea-Alonso et al. have demonstrated that siRNA-mediated silencing of SREBP-1 in human HeLa, U2OS and MCF-7 cells leads to an accumulation of cells in late G<sub>1</sub> phase, prior to the G<sub>1</sub>/S transition.<sup>13</sup> By contrast, SREBP-1a overexpression, activates the transcription of p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, a universal cyclin-dependent kinase inhibitor, leading to cell growth inhibition and G<sub>1</sub> cell cycle arrest.<sup>14</sup> In addition to p21, SREBP-1a activation also increases the accumulation of other cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors, including p27, p21 and p16, leading to reduced CDK2 and CDK4 activities and hypophosphorylation of Rb protein.<sup>15</sup> Interestingly, SREBP-1a transgenic mice exhibited impaired liver regeneration after partial hepatectomy.<sup>15</sup>

In addition to classical transcriptional regulators, a class of noncoding RNAs, termed microRNAs (miRNAs), has emerged as critical regulator of gene expression acting predominantly at the post-transcriptional level.<sup>16-19</sup> These short (22 nt) double-stranded regulatory noncoding RNAs are mostly processed from primary transcripts by the sequential actions of the endonucleases Drosha and Dicer enzymes. In the cytoplasm, mature miRNAs are incorporated into the cytoplasmic RNA-induced silencing complex (RISC) and bind to partially complementary target sites in the 3'UTR of specific mRNA. miRNA targeting of mRNAs inhibits their expression through mRNA destabilization, repression of translation or a combination of both processes.<sup>16-19</sup>

We and others provided the first identification of a highly conserved miRNA family, *miR-33*, within the intronic sequences of the *Srebp* genes.<sup>20-22</sup> Two *miR-33* genes are present in humans: *miR-33b*, which is encoded within intron 17 of the *Srebp-1* gene on chromosome 17, and *miR-33a*, which is expressed in intron 16 of the *Srebp-2* gene on chromosome 22. In mice, however, there is only one *miR-33* gene, which is the ortholog of human *miR-33a* and is located within intron 15 of the mouse *Srebp-2* gene. *miR-33a* and *miR-33b* are co-transcribed with its host genes, like many intronic miRNAs, and they target genes involved in regulating cholesterol homeostasis (*Abca1*, *Abcg1* and *Npc1*)<sup>20-22</sup> and fatty acid metabolism (*Ampk*, *Cpt1a*, *Crot*, *Hadhb* and *Sirt6*).<sup>23,24</sup> These findings suggest that *Srebp* genomic loci, which encode *Srebp* transcription factors and *miR-33a/b* may cooperate to regulate lipid metabolism. Of note, the inhibition of miR-33 using different strategies increases plasma high-density lipoproteins (HDL) in mouse and promotes the regression of atherosclerosis in mice.<sup>20-22,25,26</sup>

Similarly to *Srebp/miR-33* locus, the  $\alpha$ -myosin heavy chain (alphaMHG) gene, in addition to encoding a major cardiac contractile protein, regulates cardiac growth and gene expression in response to stress and hormonal signaling through miR-208.<sup>27</sup> Altogether, these observations suggest that intronic miRNAs work in conjunction with host genes to regulate similar cellular processes.

Since SREBPs regulates cellular proliferation and cell cycle progression, in the current study, we tested the role of miR-33 in regulating these cellular functions. We identify putative binding sites for miR-33 in the 3'UTR of cyclin-dependent kinases (*Cdk6*, *Cdk8* and *Cdk19*), *Ccnd1* and *d2*, *p53*, *Pten*, *Myc* and

mitogen-activated protein kinases (*Map3k1*, *Map3k7*, *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk6*, *Mapk10* and *Mapk14*). We show that overexpression of miR-33 inhibits CDK6 and cyclinD1 expression, reduces cell proliferation in different human cell lines and leads to cell cycle arrest in G<sub>1</sub> phase. Conversely, endogenous inhibition of miR-33 increases cell proliferation in the human hepatic cell line, Huh7. Furthermore, inhibition of miR-33 expression using 2'fluoro/methoxyethyl-modified (2'F/MOE-modified) phosphorothioate backbone antisense oligonucleotides improves liver regeneration after partial hepatectomy (PH) in mice. Altogether, these results suggest that *Srebp/miR-33* may cooperate to regulate cell proliferation and cell cycle progression.

## Results

**miR-33 regulates post-transcriptional CDK6 and CCND1 expression.** To determine potential miR-33 targets involved in cell proliferation and cell cycle, we used a combination of bioinformatic tools for miRNA target prediction [TargetScan (<http://www.targetscan.org>), miRanda (<http://www.microrna.org>), DIANAmt (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr>), miRDB (<http://mirdb.org>), miRWalk (<http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>) and PITA (<http://genie.weizmann.ac.il>)]. Interestingly, the 3'UTR of the cyclin-dependent kinases (*Cdk6*, *Cdk8* and *Cdk19*), *Ccnd1* and *d2*, *p53*, *Pten*, *Myc* and mitogen-activated protein kinases (*Map3k1*, *Map3k7*, *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk6*, *Mapk10* and *Mapk14*) have predicted binding sites for miR-33 (Table 1). Next, we wanted to determine the effect of miR-33 on mRNA expression of *CDK6*, *CDK8*, *CDK19*, *CCND1*, *CCNM1*. Transfection of Huh7 cells with miR-33 (40-fold increase expression) significantly inhibited the mRNA levels of *CDK6* and *ABCA1*, a previously identified target of miR-33 (Fig. 1A, upper part). Similar results were observed in A549 cells transfected with miR-33 (Fig. 1A, bottom part). Notably, endogenous inhibition of *miR-33* using anti-miR-33 oligonucleotides (2.5 fold decrease) increases mRNA expression of *CDK6* and *ABCA1* in both cell lines (Fig. 1B). Since the expression level of *CCND1* and *CCNM1* varies along the cell cycle, we synchronized Huh7 and A549 cells in G<sub>1</sub> phase using a double thymidine block, which arrested the cells in early S phase (Fig. 1C). As seen in Figure 1D, transfection of Huh7 (upper part) and A549 (lower part) with miR-33 significantly inhibits *CCND1*, *CDK6* and *ABCA1* mRNA levels. Similar regulation of these genes by miR-33 was also seen at the protein level (Fig. 2A and B). Altogether, these results strongly suggest that miR-33 coordinates genes regulating cell cycle progression.

**miR-33 directly targets the 3'UTR of *Cdk6* and *Ccnd1*.** The human *Cdk6* and *Ccnd1* 3'UTR have three and one computationally predicted miR-33 binding sites, respectively (Fig. 3A and C). All the predicted binding sites are evolutionarily conserved (Fig. S1). To directly assess whether miR-33 targets *Cdk6* and *Ccnd1* directly, we generated reporter constructs with the luciferase coding sequence fused to the 3'UTR of these genes. miR-33 markedly repressed the activity of the *Cdk6* and *Ccnd1* 3'UTR constructs (Fig. 3B and D). Mutation of the miR-33 target sites relieved miR-33 repression of *Cdk6* and *Ccnd1* 3'UTR

**Table 1.** miR-33 predicted target genes

Gene	DIANAmT	miRanda	miRDB	miRWalk	PITA	Targetscan
ABCA1	X	X	X	X	X	X
CDK6	X		X	X	X	X
CDK8	X	X		X	X	X
CCND1		X		X	X	X
CCND2		X		X	X	X
MAP3K1	X	X	X	X	X	X
MAP3K7	X	X		X		
MAPK1	X	X		X		
MAPK3	X	X		X		
MAPK6	X	X		X	X	X
MAPK10	X	X		X	X	
MAPK14	X	X	X	X	X	X
p53	X	X		X	X	X
PIK3R3	X	X		X	X	X
PTEN		X		X	X	X
MYC		X		X	X	X

Gene target prediction based on TargetScan, miRanda, DIANAmT, miRDB and PITA.

activity, consistent with the direct interaction of miR-33 with these sequences (Fig. 3B and D).

**miR-33 regulates cell proliferation and cell cycle progression.**

To assess the role of miR-33 in regulating cell proliferation, we transfected Huh7 and A549 cells with miR-33 and measured the viable cell number at different time points. As seen in Figure 4A, overexpression of miR-33 inhibited cell growth in both cell lines. In another set of experiments, we stably overexpressed miR-33 in HeLa and MCF-7 cells using lentivirus and monitored cell proliferation using crystal violet staining and MTT assays. Consistent with our data in Figure 4A, miR-33-transduced cells grew slower compared with control-transduced cells (Fig. S2). In separate experiments, antagonism of endogenous miR-33 increased cell proliferation in Huh7 and A549 cells (Fig. 4B). We also used our stably transfected HeLa cells to study the impact of miR-33 overexpression on the cellular response to mitogenic stimuli. To accomplish this, we serum starved the cells for 72 h and then reintroduced serum, as described in Methods. As expected, the expression of CDK6 and CCND1 was induced when cells were switched from BSA to serum, and the expression of both genes was reduced in cells overexpressing miR-33 (Fig. S3). Intriguingly, miR-33-dependent repression of these targets results in increased mRNA levels of CDK4, CCND2 and CCND3 (Fig. S3). The exact molecular events that lead to these compensatory changes remain obscure, though. Nevertheless, these results demonstrate that miR-33 regulates cell proliferation via targeting CDK6 and CCND1.

Most of the mitogenic pathways result in the transcriptional induction of D-type cyclins and the subsequent activation of cyclin-dependent kinases (CDKs), such as CDK4 and CDK6. The active CDK4/6-cyclin D complexes then inactivate the retinoblastoma protein (pRB), leading to the EF-dependent transcription of specific cell cycle genes and progression throughout

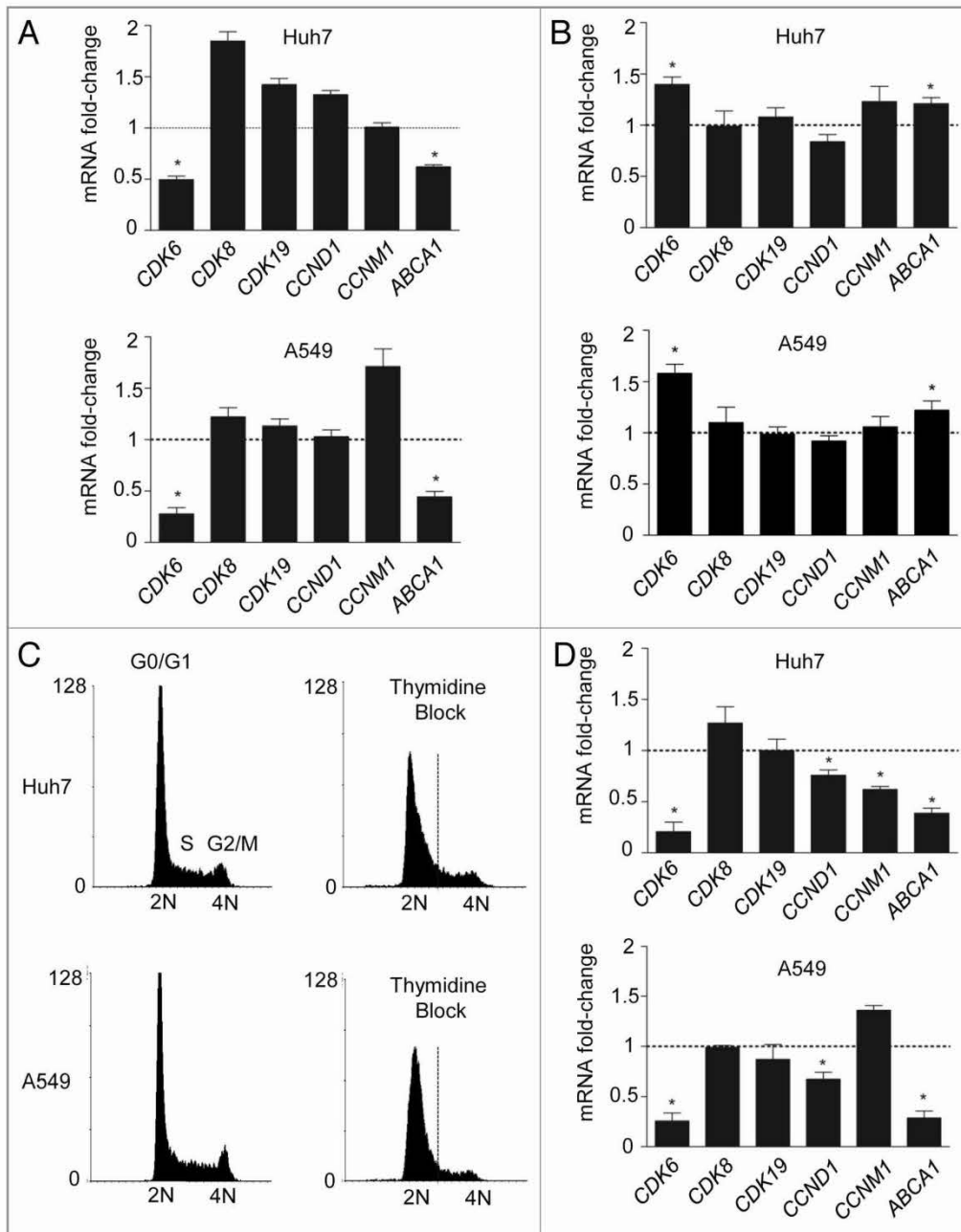
the cell cycle. To assess the effect of miR-33 on cell cycle progression, we synchronized Huh7 cells in mitosis by treating with nocodazole and then transfected with negative control mimic (CM) or miR-33. As seen in Figure 5, cells transfected with miR-33 were arrested in G<sub>1</sub> phase after their release from mitosis, suggesting an important role of miR-33 in regulating the G<sub>1</sub>/S transition.

We next analyzed the kinetics of miR-33 mRNA expression during cell cycle progression. To this end, we synchronized Huh7 cells with nocodazole and then analyzed miR-33 expression at 4, 8, 12 and 24 h after releasing them from mitotic arrest. As shown in Figure 6A and B, *miR-33a*, *miR-33b*, *SREBP1* and *SREBP2* levels decreased after releasing the cells from mitosis. Interestingly, *miR-33* levels were inversely correlated with the expression of *CDK6*, *CCND1* (Fig. 6D) and *ABCA1* (Fig. 6C), suggesting a functional role for miR-33 in regulating the expression of these genes. The inhibition of *ABCA1* and the increased expression of genes involved in cellular cholesterol uptake [low-density lipoprotein receptor (LDLr)] and cholesterol biosynthesis [3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR)] (Fig. 6E) results in an increase in cellular cholesterol levels (Fig. 6F).

**Antagonism of miR-33 in mice promotes liver regeneration.**

Finally, to analyze the role of miR-33 in a physiological model of cellular proliferation, we studied whether anti-miR-33 therapy could improve liver regeneration in mice. To this end, we performed 2/3 of partial hepatectomy (PH) as a model of liver regeneration and assessed the expression of Ki67, a cellular marker for proliferation. As seen in Figure 7A, a significant number of Ki67-positive cells were observed in sections of livers at 48 h following PH. Similar results were obtained when we analyze the expression of PCNA in liver lysates by western blot (Fig. 7B). Interestingly, the expression of *miR-33* correlated



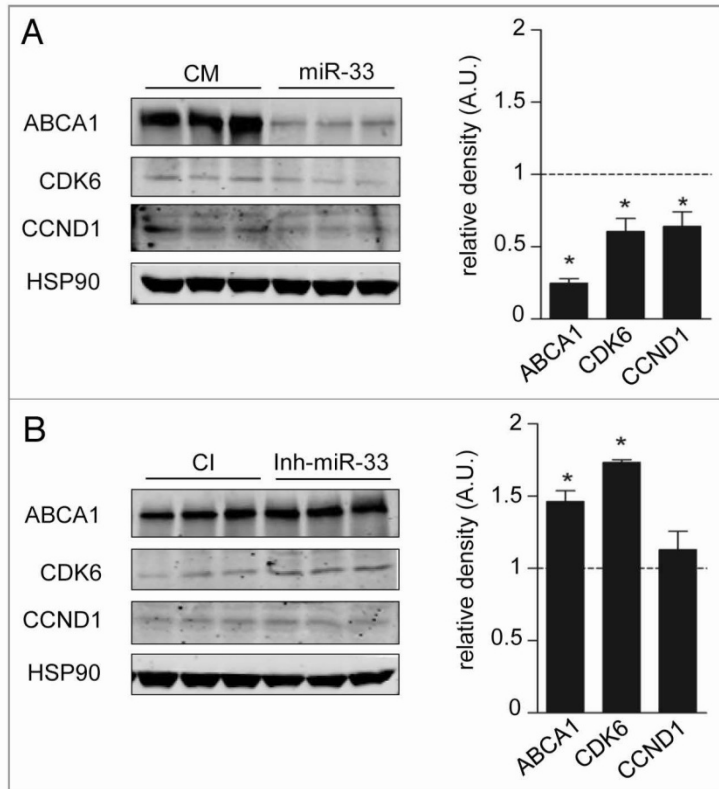


**Figure 1.** Post-transcriptional regulation of cell cycle genes and ABCA1 by miR-33. (A) Quantitative RT-PCR expression profile of selected miR-33 predicted target in human hepatic Huh7 cell line (upper part) and human lung A549 cell line (bottom part) after overexpressing miR-33 and (B) after endogenous inhibition of miR-33 by using anti-miR-33 oligonucleotides. (C) Flow cytometry analysis of Huh7 cells (upper parts) and A549 cells (bottom parts) synchronized using double thymidine block (right parts). (D) Quantitative RT-PCR analysis of selected miR-33 predicted targets in Huh7 and A549 cells transfected with CM or miR-33 after thymidine block synchronization. Data are the mean  $\pm$  SEM and are representative of  $\geq 3$  experiments. \* $p \leq 0.05$ .

inversely with both the proliferative status of the liver and the mRNA expression of *CDK6* and *CCND1*, thus suggesting a role for miR-33 in regulating liver regeneration (Fig. 7C). To assess the effects of inhibiting *miR-33* in the PH model, we treated C57/BL/6 mice with 10 mg/Kg of 2'fluoro/methoxyethyl-modified (2'F/MOE-modified) phosphorothioate backbone antisense oligonucleotides every week for one month (Fig. 8A). This antisense therapy has been used successfully in mice to inhibit the function of various miRNAs without apparent toxicity. To determine the efficacy of the anti-miR-33 treatment, we measured the hepatic expression of miR-33 and its target genes after 4 weeks of treatment. Levels of miR-33, detected by qRT-PCR, were decreased by more than 50% in anti-miR-33-treated mice compared with the mice treated with control anti-miR. Consistent with these results, the expression of ABCA1, CDK6 and CCND1 were increased in the livers of the mice treated with anti-miR-33 (Fig. 8B). Interestingly, the expression of the proliferative marker PCNA was also increased in mice treated with anti-miR-33 (Fig. 8B). Next, we investigated the effects of anti-miR-33 oligonucleotides in liver regeneration after PH. To this end, we calculated the regeneration index as the increase in the liver-to-body mass ratio, as described in Methods. As seen in Figure 8C, mice treated with anti-miR-33 oligonucleotides showed an accelerated liver regeneration, suggesting that anti-miR-33 therapy might be useful for treating liver disease. Altogether, these results suggest that miR-33 is involved in cell cycle progression and cellular proliferation in coordination with regulating multiple proteins (Fig. S4).

**Discussion**

The most salient feature of this paper is the identification of the role of miR-33 in regulating cell proliferation, cell cycle progression and liver regeneration. We and others provided the first identification of a highly conserved miRNA family, miR-33, within the intronic sequences of the *Srebp* genes in organisms, ranging from *Drosophila* to humans. miR-33 targets multiple genes regulating cholesterol homeostasis, including *Abca1*, *Abcg1* and *Npc1*. In addition to the role in maintaining cholesterol metabolism, we have also demonstrated that miR-33 coordinates genes regulating fatty acid and glucose metabolism. This work opens a new window for the miR-33 family, whose members repress genes involved in cell proliferation and cell cycle progression. Notably, we show that miR-33 negatively regulates CDK6 and CCND1, which results in cell cycle arrest in G<sub>1</sub> phase. miR-33 overexpression reduces cell proliferation and retarded cell cycle progression from the late G<sub>1</sub> phase into the S phase in human hepatic cells (Huh7). Furthermore, this study also shows that in vivo

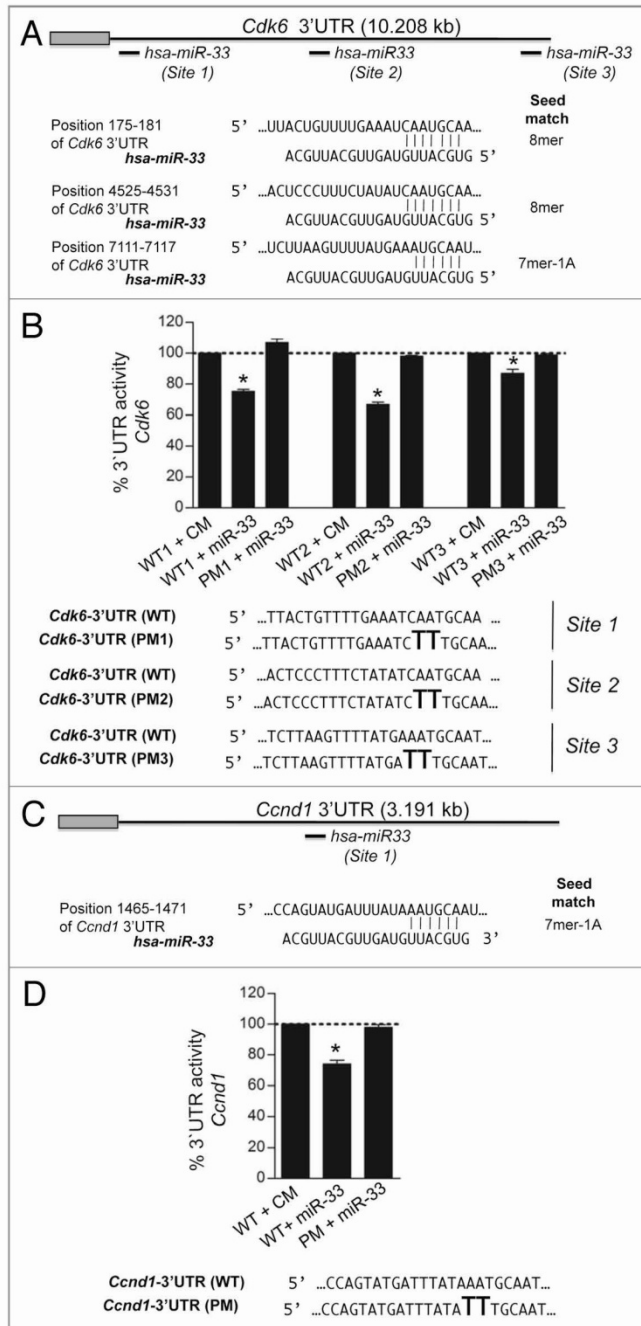


**Figure 2.** MIR-33 inhibits CDK6 and CCND1 protein expression. Western blot analysis of CDK6, CCND1 and ABCA1 expression from Huh7 cells transfected with CM and miR-33 (A) or CI and anti-miR-33 (B). Data are the mean ± SEM and are representative of more than or equal to three experiments. \*p ≤ 0.05.

inhibition of miR-33 using antisense oligonucleotides improves liver regeneration after partial hepatectomy.

The recovery of liver function after partial hepatectomy is promoted by a variety of signals that lead to the prompt re-establishment of liver mass by upregulating cell growth and/or proliferation.<sup>28,29</sup> Interestingly, several proteins involved in regulating cell cycle progression play a key role during hepatocyte replication and liver growth.<sup>30-32</sup> Indeed, transient expression of CCND1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth in vivo.<sup>31</sup> D- and E-type cyclins and their CDK partners (CDK4/6) regulate cell cycle progression through G<sub>1</sub> to S phase.<sup>33</sup> Activation of the CCND1/CDK6 complex phosphorylates and inactivates the retinoblastoma protein (Rb), a transcriptional repressor that, in turn, inhibits the E2F transcription factors and recruits chromatin-remodeling complexes that lead to the repression of specific targeted genes.

In normal adult liver, hepatocytes are highly differentiated and rarely undergo cell division, but they retain a remarkable ability to proliferate in response to acute or chronic injury. Previous studies have suggested that CCND1 is a critical mediator of G<sub>1</sub> progression in hepatocytes. Similarly, CDK4/CDK6 regulates cell cycle progression in hepatoma cells. Accordingly, Huh7 and



**Figure 3.** MiR-33 specifically targets the 3'UTR of *Cdk6* and *Ccnd1*. (A) Sequence alignment of the human *hsa-miR-33* mature sequence with the binding sites of the human *Cdk6* 3'UTR and (B) human *Ccnd1* 3'UTR. Luciferase reporter activity in COS-7 cells transfected with CM or miR-33 of the (C) *Cdk6* and (D) *Ccnd1* 3'UTR containing the indicated point mutations (PM) in the miR-33 target sites. Data are expressed as mean % of the 3'UTR activity of control miR ± SEM and are representative of ≥ 3 experiments. \*p ≤ 0.05.

HepG2 cells treated with PD-0332991, a potent inhibitor of these kinases, arrested the cells in G<sub>1</sub> phase.<sup>34</sup>

Here we demonstrate that miR-33 targets CCND1 and CDK6 and regulates hepatocyte proliferation. In addition to CCND1 and CDK6, it has previously been reported that miR-33 also targets p53.<sup>35</sup> p53 activates the transcription of genes that induce cell cycle arrest, apoptosis and senescence in response to several stress conditions, including DNA damage. In our work, we did not find differences in the number of apoptotic cells when we overexpressed or inhibited miR-33, suggesting that the effect of miR-33 on p53 and cell viability may be cell type-specific. On the other hand, Thomas M et al. have recently shown that miR-33 also targets the serine/threonine-protein kinase Pim-1 and inhibits proliferation in K562 and LS174T cells.<sup>36</sup>

In addition to miR-33, many miRNAs have been shown to play a role in regulating proliferation and cell cycle progression.<sup>37</sup> The mir-15a-16-1 cluster may induce cell cycle arrest at the G<sub>1</sub> phase by targeting critical cell cycle regulators such as CDK1, CDK2 and CDK6 as well as cyclins (D1, D3 and E1).<sup>38-40</sup> Indeed, these major cell cycle kinase complexes are regulated by several other miRNAs. Thus, CDK6 mRNA is also targeted by miR-24, miR-34a, miR-124, miR-125b, miR-129, miR-137, miR-195, miR-449 and let-7 family members. The levels of D-type cyclins are downregulated by let-7, miR-15 family, miR-17, miR-19a miR-20a and mir-34.<sup>37</sup>

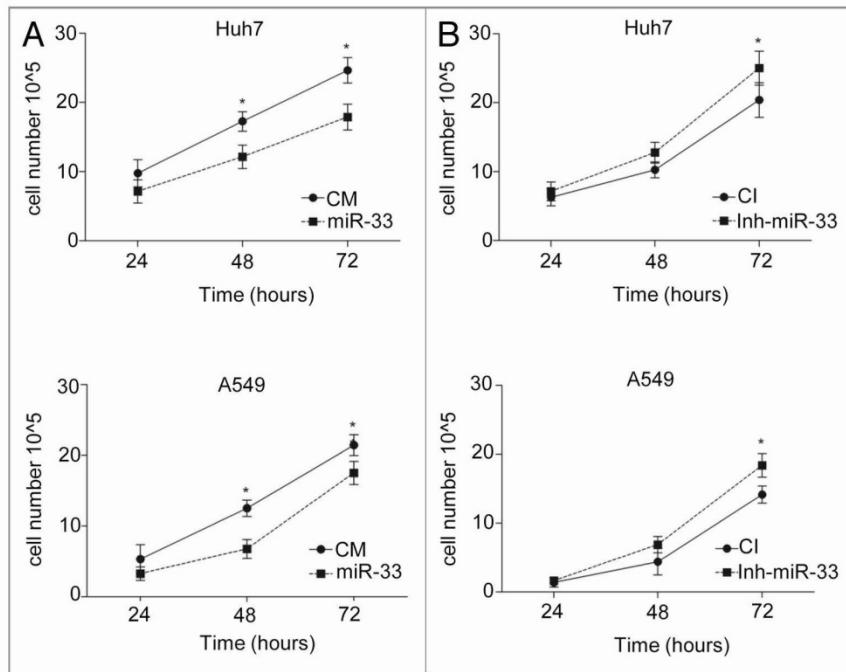
The overall impact of miRNAs on liver regeneration has been studied by generating mice with hepatocyte-specific miRNA deficiency. Interestingly, these mice are viable and developed normally into adulthood. However, whereas miRNA-deficient hepatocytes readily exited the G<sub>0</sub> phase of the cell cycle, they failed to transition into S phase by 36 h after PH, suggesting a key role for miRNA in regulating liver regeneration.

The whole process of liver regeneration has three clearly distinct phases: an initiation stage, a proliferation stage and a termination stage.<sup>41</sup> Most research has focused on the first two stages. However, the participants at the stage of termination have not been well characterized so far. Most of the studies have focused on the anti-proliferative role of TGFβ1. However, the fact that transgenic mice displayed a complete liver regeneration (although delayed) suggests that other mediators must be involved in this process.<sup>42</sup> In this context, our results support the idea that miR-33 may have a significant role as a termination signal in the process of liver regeneration. These new findings could open new therapeutic perspectives to stimulate liver regeneration in chronic liver disease or after liver resection in patients affected by hepatocellular carcinoma.

### Materials and Methods

**Mice.** Six-week-old male C57BL/6 mice were randomized into three groups (n = 20 mice): no treatment (PBS, n = 4), control-ASO (n = 8) or miR-33-ASO (n = 8) (Jackson





**Figure 4.** miR-33 inhibits cell proliferation. Time-course analysis of the effects of (A) overexpression or (B) inhibition of miR-33 on cell proliferation. Huh7 (upper parts) and A549 (bottom parts) cells were cultured in cholesterol-free medium and transfected with CM, miR-33, CI and Inh-miR-33. At the indicated times, the viable cells were counted. Data correspond to means  $\pm$  SEM and are representative of  $\geq 3$  experiments. \* $p \leq 0.05$ .

Laboratory). The mice received a weekly subcutaneous injection of 10 mg/Kg control-ASO, miR-33-ASO or PBS for 4 weeks. All animals were kept under constant temperature and humidity in a 12 h controlled dark/light cycle. Mice were fed ad libitum on a standard pellet diet. All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care Use Committee of New York University Medical Center.

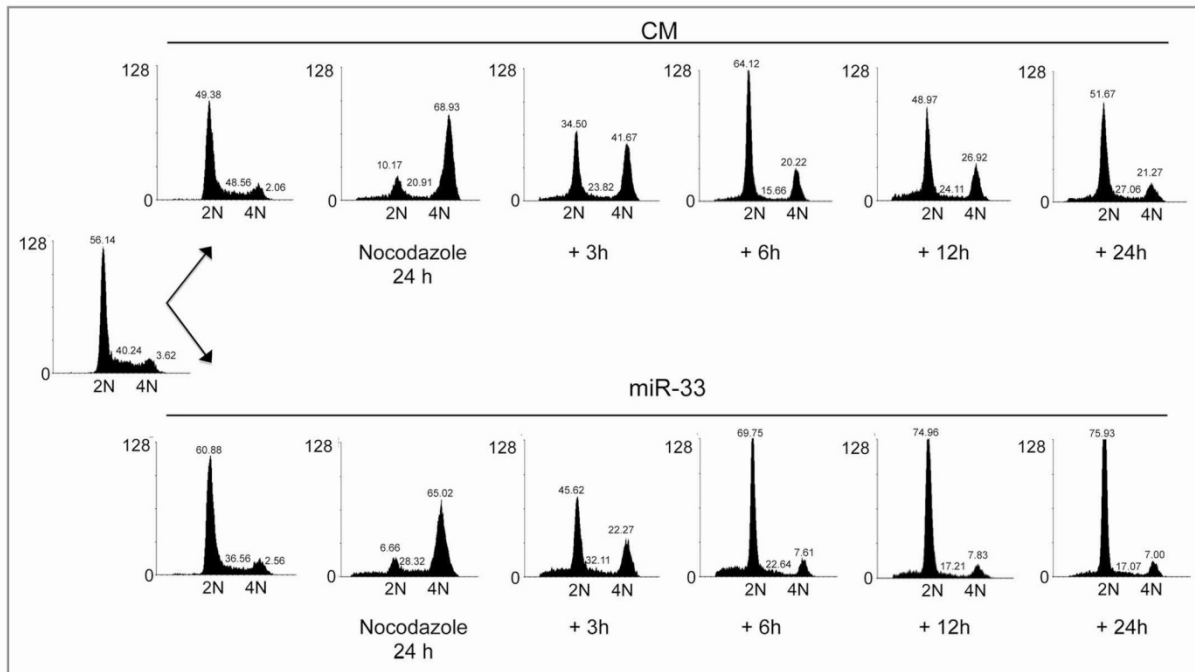
**Materials.** Chemicals were obtained from Sigma unless otherwise noted. Mouse monoclonal antibodies against CDK6 (1:1,000) and PCNA (1:1,000), rabbit monoclonal antibody against CCND1 (1:1,000) and cleaved caspase 3 (Asp 175) (1:500) were purchased from Cell Signaling. Mouse monoclonal HSP-90 (1:1,000) antibody was from BD Bioscience. Mouse monoclonal ABCA1 (1:1,000) antibody was purchased from Abcam. Secondary fluorescently-labeled antibodies were from Molecular Probes (Invitrogen).

**Cell culture.** A549, HeLa, Huh7 and COS-7 cells were obtained from American Type Tissue Collection. A549, HeLa, Huh7 and COS-7 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% FBS, 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin. Cells were treated with Nocodazole (250 ng/ml, Sigma) 24 h post-transfection or with 2 mM Thymidine for 18 h as indicated in figure legends. Stable cell lines were generated upon transduction with lentiviral vectors and selection with puromycin (2  $\mu$ g/mL). Briefly, murine miR-33 was amplified from genomic DNA and cloned into pSicoR, as described in Marquart et al. (PNAS 2010); the GFP cassette in

pSicoR was then swapped with a puromycin resistance cassette. Lentiviruses were obtained by cotransfection in HEK293 cells of empty or miR-33 pSicoR-Puro, with vectors providing gag, pol and vsv-G. Supernatants were collected 48 h after transfection and used to transduce a variety of cell lines.

**Cell cycle analysis.** Synchronous cells were cultured in DMEM supplemented with antibiotics (100 units of penicillin/ml and 100  $\mu$ g/ml of streptomycin) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. At the end of the incubation the cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), fixed in 70% cold ethanol, treated with 100  $\mu$ g/mL ribonuclease A (Roche) and labeled with 50  $\mu$ g/mL propidium iodide (PI) for 1 h at 37°C. The cells were analyzed by flow cytometry (FACScalibur, Becton-Dickinson) using selective gating to exclude the doublets of cells and subjected to MODFIT analysis (Verity Software House, Inc.). Cells were treated with 250 ng/ml Nocodazole (Sigma) 24 h post-transfection.

**Surgical procedure.** All operations were performed under Isoflurane anesthesia. A 70% partial hepatectomy (PH) was performed according to the technique described by Higgins and Anderson. The abdomen was opened via a midline incision. Two thirds of the liver (median and left lobes) were removed. After the PH, the weights of regenerating liver were measured and the hepatic tissue was preserved for future processing at the following time points: 3, 8, 24 and 48 h in the case of untreated mice and 5 d in the case of treated mice. The percentage of liver



**Figure 5.** MiR-33 induces G<sub>2</sub> arrest. Cell cycle distribution of A549 cells transfected with CM or miR-33 and synchronized in G<sub>2</sub>/M with nocodazole. After 24 h of treatment with nocodazole, cells were washed and released from the G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest. At the indicated times, cells were stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. 2N, cells have diploid DNA content (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase); 4N (G<sub>2</sub>/M), cells have tetraploid DNA content. Data correspond to a representative experiment among three that gave similar results. FL2-A corresponds to the fluorescence emitted by propidium iodide bound to DNA, which is measured by cytometry in channel 2 (FL2). To avoid the eventual presence of doublets, among the parameters given by the cytometer area (FL2-A) is preferred in order to quantify the amount of DNA present in the cell.

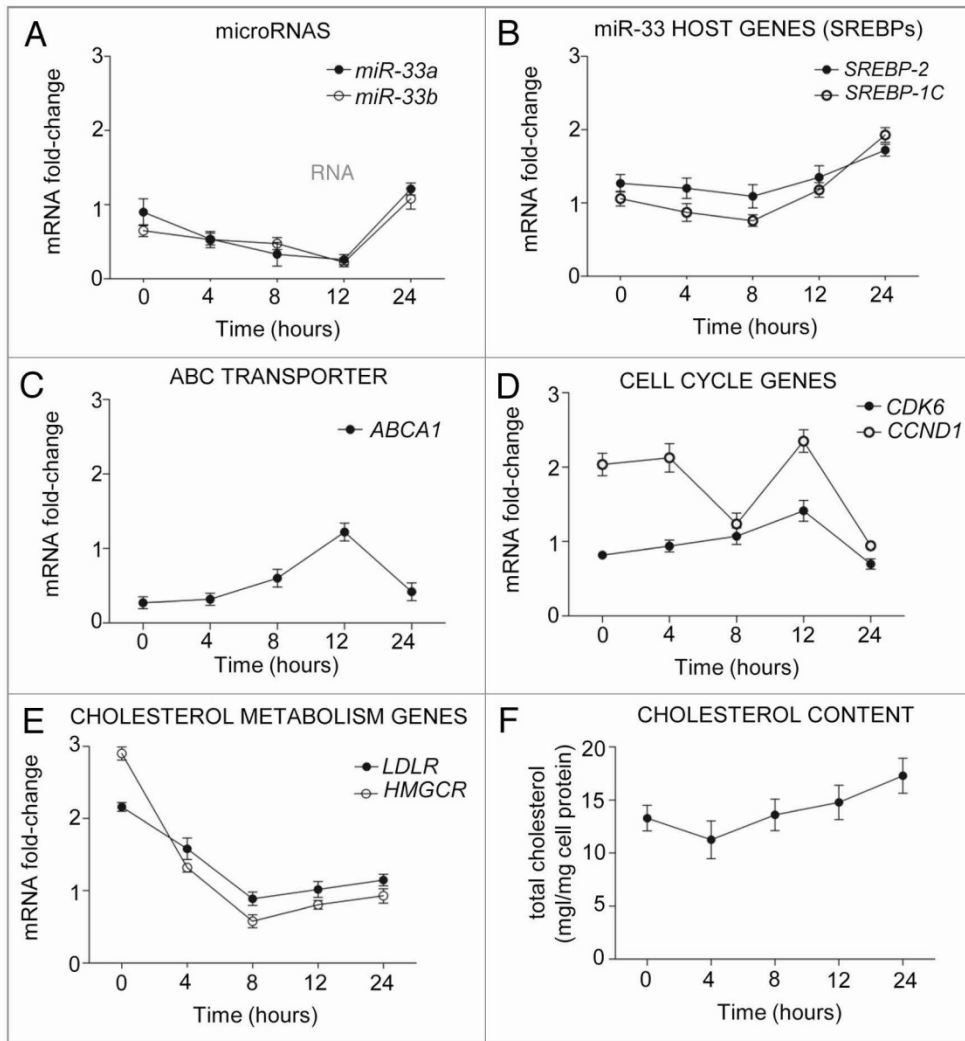
regeneration was calculated following the formula (weight of non removed lobes/weight of total liver) and normalized by total body weight of mice.

**Western blot analysis.** Cells were lysed in ice-cold buffer containing 50 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 1% NP-40, 5.3 mM NaF, 1.5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and 1 mM orthovanadate, 175 mg/ml octylglucopyranoside and 1 mg/ml of protease inhibitor cocktail (Roche) and 0.25 mg/ml AEBBSF (Roche). Cell lysates were rotated at 4°C for 1 h before the insoluble material was removed by centrifugation at 12,000x g for 10 min. After normalizing for equal protein concentration, cell lysates were resuspended in SDS sample buffer before separation by SDS-PAGE. Following transfer of the proteins onto nitrocellulose membranes, the membranes were probed with the indicated antibodies, and protein bands were visualized using the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biotechnology). Densitometry analysis of the gels was performed using ImageJ software.

**RNA isolation and quantitative real-time PCR.** Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. from the NIH (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). For mRNA quantification, cDNA was synthesized using Taqman RT reagents (Applied Biosystems), following the manufacturer's protocol. Quantitative real-time PCR was performed

in triplicate using iQ SYBR green Supermix (BioRad) on iCycler Real-Time Detection System (BioRad). mRNA levels were normalized to GAPDH as a housekeeping gene. The primer sequences used were:

- ABCA1, 5'-GGT TTG GAG ATG GTT ATA CAA TAG TTG T-3' and 5'-CCC GGA AAC GCA AGT CC-3';
- ABCG1, 5'-TCA CCC AGT TCT GCA TCC TCT T-3' and 5'-GCA GAT GTG TCA GGA CCG AGT-3';
- GAPDH, 5'-AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG-3' and 5'-ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA-3';
- SREBP2, 5'-GCG TTC TGG AGA CCA TGG A-3' and 5'-ACA AAG TTG CTC TGA AAA CAA ATC A-3';
- SREBP1, 5'-ACT TCC CTG GCC TAT TTG ACC-3' and 5'-GGC ATG GAC GGG TAC ATC TT-3';
- HMGCR 5'-CTT GTG GAA TGC CTT GTG ATT G-3' and 5'-AGC CGA AGC AGC ACA TGA T-3';
- CDK6, 5'-ACC TTC GAG CAC CCC AAC GT-3' and 5'-ACC ACA GCG TGA CGA CCA CT-3';
- CDK8, 5'-GCC AGT TCA GTT ACC TCG GGG A-3' and 5'-GGG CAA AGC CCA TGT CAG CAA T-3';
- CDK19, 5'-TTT GCC GGC TGCCAG ATT CC-3' and 5'-AGG CGA GAAC TG GAG TGC TGA-3';
- CyclinD1, 5'-TCG TTG CCC TCT GTG CCA CA-3' and 5'-AGG CAG TCC GGG TCA CAC TT-3';



**Figure 6.** Mir-33 expression levels correlate inversely with its predicted target genes during cell cycle progression. (A–E) Quantitative RT-PCR analysis of *miR-33a/b*, *SREBP-2*, *SREBP-1*, *ABCA1*, *CDK6*, *CCND1*, *LDLR* and *HMGCR* in human hepatic Huh7 cells synchronized with nocodazole for 24 h. Data are the mean  $\pm$  SEM and are representative of three experiment which gave similar results.

CyclinM1, 5'-CAC CCG CTT CTA CAA CCG GC-3' and 5'-AGG GCT CCA CTT CTG TGG CC-3'.

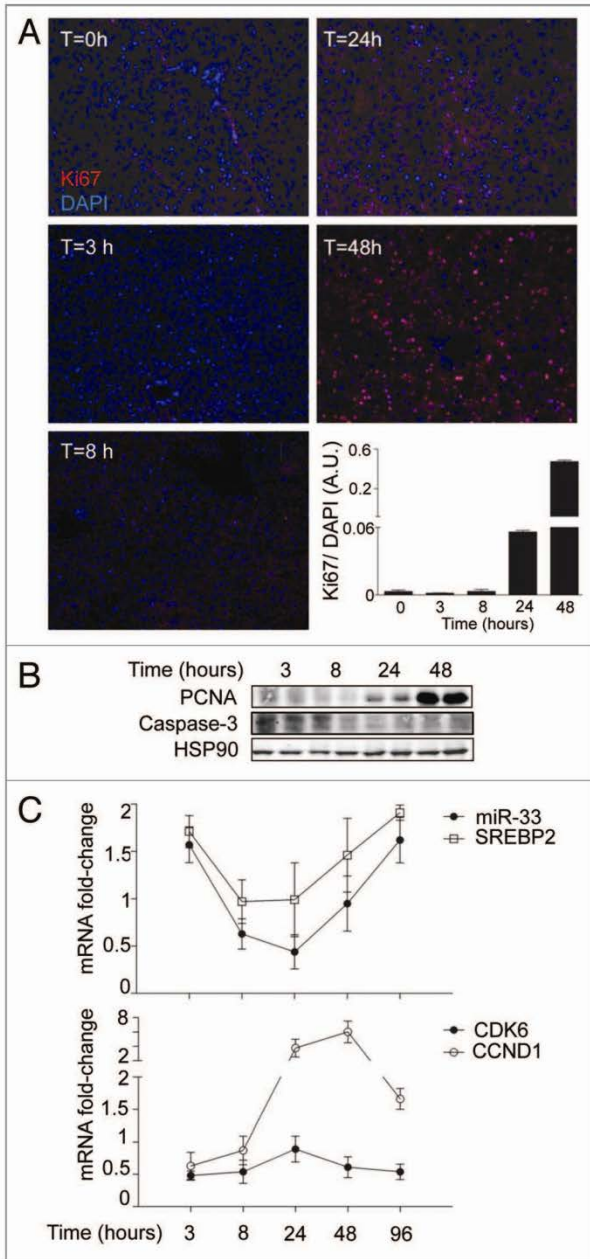
For miRNA quantification, total RNA was reverse transcribed using the RT2 miRNA First Strand Kit (SABiosciences). Primers specific for human miR-33a, miR-33b, miR-16 (SABiosciences) were used and values normalized to human SNORD38b as housekeeping gene.

**miR-33 and anti-miR-33 transfection.** A549, HeLa and Huh7 cells were transfected with 40 nM miRIDIAN miRNA mimics (miR-33) or with 60 nM miRIDIAN miRNA inhibitors (inh-miR-33) (Dharmacon) utilizing Oligofectamine (Invitrogen). All experimental control samples were treated with an equal concentration of a non-targeting control mimic sequence (CM) or an inhibitor negative control sequence

(CI) to control for non-sequence-specific effects in miRNA experiments.

**3'UTR luciferase reporter assays.** cDNA fragments corresponding to the entire 3'UTR of *Ccnd1* and the three predicted miRNA target sites of *Cdk6* were amplified by RT-PCR from total RNA extracted from A549 cells with XhoI and NotI linkers. The PCR products were directionally cloned downstream of the *Renilla* luciferase open reading frame of the psiCHECK2™ vector (Promega) that also contained a constitutively expressed firefly luciferase gene, which is used to normalize transfections. Point mutations in the seed region of predicted miR-33 sites within the 3'UTR of *Ccnd1* and *Cdk6* were generated using Multisite-Quickchange (Stratagene) according to the manufacturer's protocol. All constructs were confirmed by sequencing.





**Figure 7.** Liver regeneration after PH causes a rapid induction of CCND1 expression and miR-33 downregulation. (A) Time-course analysis of Ki67-positive cells from liver sections of mice subjected to PH. The computed assisted quantification of the proliferating cells (red) vs. the total number of cells (blue) is shown at the graph. (B) Western blot analysis of PCNA and cleaved caspase 3 expression from liver lysates of mice subjected to PH. (C) Time-course mRNA expression analysis of *miR-33*, *SREBP-2*, *CDK6* and *CCND1* from liver samples of mice subjected to PH. Data are the mean  $\pm$  SEM (n = 6 mice).

COS-7 cells were plated into 12-well plates (Costar) and co-transfected with 0.5  $\mu$ g of the indicated 3'UTR luciferase reporter vectors and the miR-33 mimic or negative control miRNA mimic (CM) (Dharmacon) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Luciferase activity was measured using the Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega). Renilla luciferase activity was normalized to the corresponding firefly luciferase activity and plotted as a percentage of the control (cells co-transfected with the corresponding concentration of control mimic). Experiments were performed in triplicate wells of a 12-well plate and repeated at least three times.

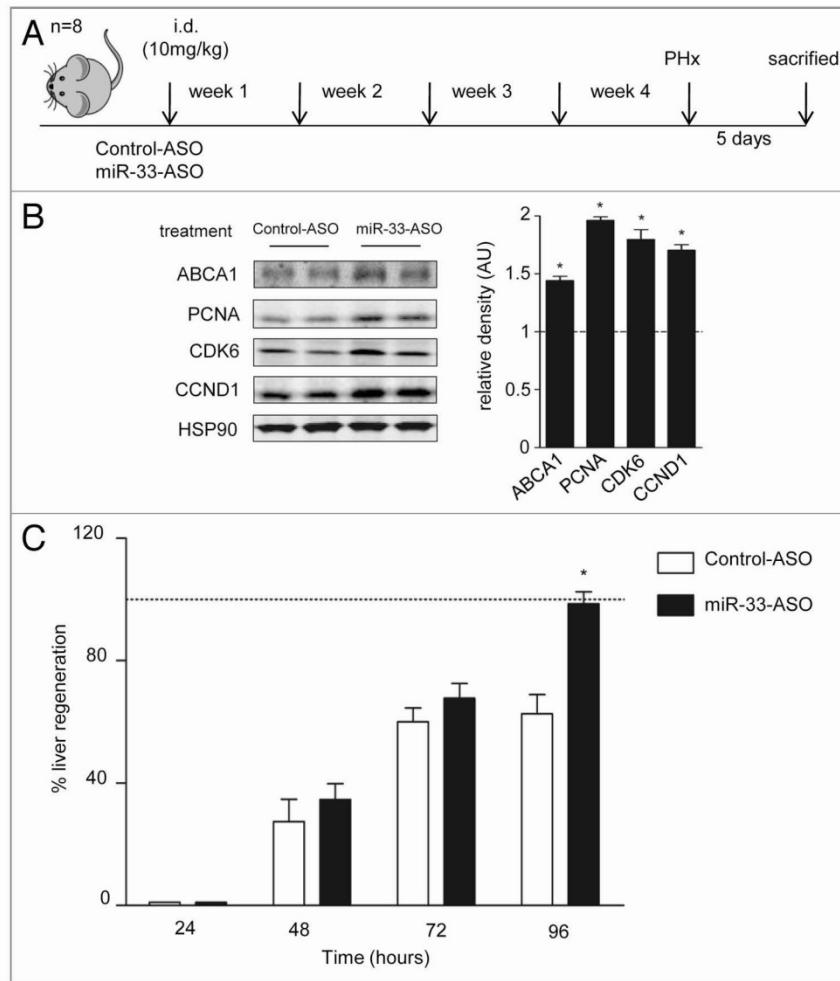
**Cell proliferation assay.** Huh7 and A549 cells were grown in DMEM supplemented with 10% lipoprotein-deficient serum (LPDS) and transfected with CM, miR-33, control miRNA inhibitor (CI) and antisense inhibitor of miR-33 (inh-miR-33). At the indicated times, the viable cells were counted by trypan blue dye exclusion using a hemocytometer.

**Crystal violet method.** After treatment, the medium was removed, and 24-well dishes were washed with PBS, fixed with 1% glutaraldehyde for 15 min, washed twice with PBS and stained with 100  $\mu$ l of 0.1% aqueous crystal violet for 20 min. Dishes were rinsed four times in tap water and allowed to dry. If cell mass estimation was desired, 100  $\mu$ l of 10% acetic acid was added, and the content of each well was mixed before reading the absorbance at 595 nm.

**Immunohistochemistry.** For the histological and the immunohistochemistry experiments, liver samples were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C, cryoprotected overnight in 30% sucrose solution and embedded in OCT (Tissue-Tek® O.C.T™ Compound, SAKURA) embedding compound and frozen on dry ice. Next, 8- $\mu$ m frozen sections were rehydrated and lipid droplets deposition was detected by Oil Red-O (Sigma) staining. Sections were rinsed with 60% isopropanol and stained for 20 min with filtered Oil Red O solution (0.5% in isopropanol followed by a 60% dilution in distilled water). After two rinses with 60% isopropanol and distilled water, slides were counterstained with hematoxylin for 4 min, rinsed with water and mounted. Digital images were taken with a Leica DM 4000B microscope.

**Immunohistochemistry.** Tissues were fixed with 4% PFA, cryoprotected overnight in a 30% sucrose solution and embedded in OCT. Frozen sections of 8  $\mu$ m were rehydrated, blocked with 5% normal goat serum (NGS) and incubated with mouse anti-Ki67 (1:100, Abcam). Controls without primary antibodies were used as negative controls. Binding sites of the primary antibodies were revealed with Alexa-597 goat-anti-mouse IgG (1:1,000, Invitrogen). Samples were analyzed with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E600).

**Statistics.** Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) (n is noted in the figure legends). The statistical significance of differences was evaluated with the Student t-test. Significance was accepted at the level of  $p < 0.05$ .



**Figure 8.** Inhibition of miR-33 with miR-33-ASO in vivo increased liver regeneration. (A) Experimental outline of miR33-ASO or control-ASO treatment in C57BL/6 mice (n = 8 per group). (B) Representative western blot analysis shows that the inhibition of miR-33 in vivo for 4 weeks increased the expression of PCNA, CDK6, CCND1 and ABCA1. Relative density analysis is shown in the right part. Dotted line positioned at one represents the normalized values of control mice. (C) Effect of miR-33 ASO treatment on liver regeneration after partial hepatectomy. The body weight recovery was used to calculate the percentage of liver regeneration after PHx vs. control animals (dotted line). The data are presented as the mean  $\pm$  SEM and are representative of eight experiments \*p < 0.05.

**Acknowledgements**

We thank Christine Esau from Regulus Therapeutics for providing us the 2' fluoro/methoxyethyl-modified (2'F/MOE-modified) phosphorothioate backbone antisense oligonucleotides.

**Financial Support**

This work was supported by grants from the National Institutes of Health R01HL107953 and R01HL106063 (to C.F.H.), R01HL105945 (to Y.S.) and R01HL107794 (to A.B.), the Ministerio de Ciencia e Innovación-Plan Nacional de I+D+I (SAF2010-19025 to M.M.R.), the Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG EXC. 257 (D.C.S. and E.E.),

M.P.P. by MICINN (contract number BES 2007-16909), A.G.S. and A.C.W. by Capes Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brazil. CIBERehd is financed by Instituto de Salud Carlos III. CIBERehd and CIBERobn are financed by Instituto de Salud Carlos III, Spain.

**Financial Disclosure**

C.F.H. and Y.S. have patents on the use of miR-33 inhibitors.

**Note**

Supplemental materials can be found at: [www.landesbioscience.com/journals/cc/article/19421](http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/19421)



References

1. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343:425-30; PMID:1967820; <http://dx.doi.org/10.1038/343425a0>.
2. Brown MS, Goldstein JL. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem* 1974; 249:7306-14; PMID:4436312.
3. Chen HW, Heiniger HJ, Kandutsch AA. Relationship between sterol synthesis and DNA synthesis in phytohemagglutinin-stimulated mouse lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:1950-4; PMID:1057774; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.72.5.1950>.
4. Chen HW, Kandutsch AA, Waymouth C. Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol. *Nature* 1974; 251:419-21; PMID:4472548; <http://dx.doi.org/10.1038/251419a0>.
5. Fernández C, Lobo Md Mdel V, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation. *Exp Cell Res* 2004; 300:109-20; PMID:15383319; <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.06.029>.
6. Martínez-Botas J, Suárez Y, Ferruelo AJ, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Cholesterol starvation decreases p34(cdc2) kinase activity and arrests the cell cycle at G<sub>2</sub>. *FASEB J* 1999; 13:1359-70; PMID:10428760.
7. Crick DC, Andres DA, Wächter CJ. Geranylgeraniol promotes entry of UT-2 cells into the cell cycle in the absence of mevalonate. *Exp Cell Res* 1997; 231:302-7; PMID:9087171; <http://dx.doi.org/10.1006/excr.1997.3480>.
8. Martínez-Botas J, Ferruelo AJ, Suárez Y, Fernández C, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Dose-dependent effects of lovastatin on cell cycle progression. Distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonate derivatives. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1532:185-94; PMID:11470239; [http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981\(01\)00125-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981(01)00125-1).
9. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89:331-40; PMID:9150132; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80213-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80213-5).
10. Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:11041-8; PMID:10500120; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.20.11041>.
11. Espenshade PJ. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J Cell Sci* 2006; 119:973-6; PMID:16525117; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02866>.
12. Osborne TF. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem* 2000; 275:32379-82; PMID:10934219; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R000017200>.
13. Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. Cdk1/cyclin B-mediated phosphorylation stabilizes SREBP1 during mitosis. *Cell Cycle* 2006; 5:1708-18; PMID:16880739; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.5.15.3131>.
14. Inoue N, Shimano H, Nakakuki M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Yamamoto T, et al. Lipid synthetic transcription factor SREBP-1a activates p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, a universal cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cell Biol* 2005; 25:8938-47; PMID:16199872; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.20.8938-47.2005>.
15. Nakakuki M, Shimano H, Inoue N, Tamura M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, et al. A transcription factor of lipid synthesis, sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a causes G(1) cell cycle arrest after accumulation of cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitors. *FEBS J* 2007; 274:4440-52; PMID:17662109; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05973.x>.
16. Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress and timing. *Cell* 2003; 113:673-6; PMID:12809598; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00428-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00428-8).
17. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431:350-5; PMID:15372042; <http://dx.doi.org/10.1038/nature02871>.
18. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136:215-33; PMID:19167326; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.
19. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9:102-14; PMID:18197166; <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2290>.
20. Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldán A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:12228-32; PMID:20566875; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1005191107>.
21. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010; 328:1566-9; PMID:20466882; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1189123>.
22. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 2010; 328:1570-3; PMID:20466885; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1189862>.
23. Dávalos A, Goedeke L, Smbiert B, Ramírez CM, Warriar NP, Andreo U, et al. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:9232-7; PMID:21576456; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1102281108>.
24. Gerin I, Clerbaux LA, Haumont O, Lanthier N, Das AK, Burant CE, et al. Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *J Biol Chem* 2010; 285:33652-61; PMID:20732877; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.152090>.
25. Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:17321-6; PMID:20855588; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1008499107>.
26. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest* 2011; 121:2921-31; PMID:21646721; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI57275>.
27. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007; 316:575-9; PMID:17379774; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1139089>.
28. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007; 213:286-300; PMID:17559071; <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21172>.
29. Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 1997; 151:1273-80; PMID:9358753.
30. Boylan JM, Gruppuso PA. D-type cyclins and G<sub>1</sub> progression during liver development in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330:722-30; PMID:15809057; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.042>.
31. Hanse EA, Nelsen CJ, Goggin MM, Anttila CK, Mullany LK, Berthet C, et al. Cdk2 plays a critical role in hepatocyte cell cycle progression and survival in the setting of cyclin D1 expression in vivo. *Cell Cycle* 2009; 8:2802-9; PMID:19652536; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.8.17.9465>.
32. Kato A, Bamba H, Shinohara M, Yamauchi A, Ota S, Kawamoto C, et al. Relationship between expression of cyclin D1 and impaired liver regeneration observed in fibrotic or cirrhotic rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20:1198-205; PMID:16048567; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-7466.2005.03829.x>.
33. Nurse P. Checkpoint pathways come of age. *Cell* 1997; 91:865-7; PMID:9428508; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80476-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80476-6).
34. Rivadeneira DB, Mayhew CN, Thangavel C, Sotillo E, Reed CA, Graña X, et al. Proliferative suppression by CDK4/6 inhibition: complex function of the retinoblastoma pathway in liver tissue and hepatoma cells. *Gastroenterology* 2010; 138:1920-30; PMID:20100483; <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.007>.
35. Herrera-Merchan A, Cerrato C, Luengo G, Dominguez O, Piris MA, Serrano M, et al. miR-33-mediated downregulation of p53 controls hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Cycle* 2010; 9:3277-85; PMID:20703086; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.16.12598>.
36. Thomas M, Lange-Grunweller K, Weirauch U, Gutsch D, Aigner A, Grunweller A, et al. The proto-oncogene Pim-1 is a target of miR-33a. *Oncogene*.
37. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812:592-601; PMID:21315819.
38. Linsley PS, Schelter J, Burchard J, Kibukawa M, Martin MM, Bartz SR, et al. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 2007; 27:2240-52; PMID:17242205; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.02005-06>.
39. Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi RU, Yamamoto Y, Kosaka N, et al. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell cycle genes. *Mol Ther* 2010; 18:1817-7; PMID:19738602; <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2009.207>.
40. Wang F, Fu XD, Zhou Y, Zhang Y. Downregulation of the cyclin E1 oncogene expression by microRNA-16-1 induces cell cycle arrest in human cancer cells. *BMB Rep* 2009; 42:725-30; PMID:19944013; <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2009.42.11.725>.
41. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276:60-6; PMID:9082986; <http://dx.doi.org/10.1126/science.276.5309.60>.
42. Sanderson N, Factor V, Nagy E, Kopp J, Kondaiah B, Wakefield L, et al. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:2572-6; PMID:7708687; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.7.2572>.

SEGUNDO ESTUDIO.- EL RETRASO EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA EN RATONES DEFICIENTES EN EL GEN LDLR ESTÁ ASOCIADO A UNA ALTERACIÓN EN EL PERFIL DE CITOCINAS, FACTORES DE CRECIMIENTO Y LÍPIDOS.

(Artículo aceptado en la revista Journal of Hepatology. Mayo 2013)

Los resultados obtenidos en el primer estudio fueron:

**1.- Los ratones LDLR<sup>-/-</sup> presentan esteatosis y niveles elevados de colesterol circulante.**

Los ratones sanos LDLR<sup>-/-</sup> bajo una dieta estándar no presenta cambios en el peso comparando con ratones salvajes. Tampoco se observaron cambios significativos ni en la morfología del hígado ni en su peso. La tinción de Oil-Red-O en los hígados de los ratones LDLR<sup>-/-</sup> reveló que estos animales presentaban acumulaciones de lípidos en el hígado y el análisis en suero indica que presentan 4 veces más niveles de colesterol en suero comparando con animales salvajes.

Estos animales simulan hipercolesterolemia, ya que presentan esteatosis y altos niveles de colesterol.

**2.- Los ratones LDLR<sup>-/-</sup> presentan una peor regeneración hepática y una disminución de la función hepática tras la PHx.**

Se realizó la PHx del 75% a ratones salvajes y a ratones LDLR<sup>-/-</sup> y se sacrificaron a diferentes tiempos: 3h, 8h, 24h, 48h, 72h y 120h después de la PHx.

Para calcular el porcentaje de regeneración hepática se pesaron los hígados regenerados y se normaliza por el peso total del cuerpo. Los animales salvajes presentaron una regeneración del 1.5% a las 3h, y de 3,7% a las 120h después de la PHx, tal como se indica en la gráfica de la figura 2.

En cambio, los animales LDLR<sup>-/-</sup> presentaron un retraso en la regeneración hepática siendo significativamente menor a partir de las 48h.

Se observó que los ratones LDLR<sup>-/-</sup> no presentaron la misma cinética de aumento de peso, que los animales con fenotipo salvaje. Los LDLR<sup>-/-</sup> presentaban un peso significativamente menor a partir de las 72h.

Para cuantificar la funcionalidad hepática se valoró mediante ELISA la albúmina en suero de los ratones hepatectomizados. Tal como se espera, la albúmina decae justo después de la PHx, sin embargo esta caída es significativamente más pronunciada en los ratones LDLR<sup>-/-</sup> a las 3h y 8h tras la cirugía indicando que estos ratones sufren una deficiencia hepática mayor que los salvajes a las primeras horas tras la PHx.

### **3.- Los LDLR<sup>-/-</sup> presentan una alteración en la progresión del ciclo celular y una menor expresión de IL6, TNF $\alpha$ y HGF durante la regeneración hepática.**

Para investigar la relación entre la deficiencia de LDLR y el retraso en la regeneración hepática, estudiamos la expresión de marcadores del ciclo celular como ki67, ciclina B1, ciclina D1 y PCNA, en hígados de ratones hepatectomizados, tanto en animales salvaje como en animales deficientes de LDLR.

La inmunofluorescencia contra Ki67 reveló que en los hígados de los animales salvajes a las 48h, después de la hepatectomía, existe un 50% de células positivas para esta tinción, por el contrario, en hígados de los animales LDLR<sup>-/-</sup> hepatectomizados, sacrificados a las 48 horas se observó un 50% menos de células positivas comparando con los animales salvajes, indicando que los hepatocitos de los animales LDLR<sup>-/-</sup> hepatectomizados presentan un retraso de proliferación.

De igual manera, se observó mediante *western blot*, que a las 8h y 24h tras la PHx, hay una expresión más elevada de Ciclina B1, Ciclina D1 y PCNA en los hígados de los animales salvajes que en los hígados de los animales LDLR<sup>-/-</sup>. A pesar de estas diferencias en las ciclinas, la expresión de PCNA no mostró cambios significativos entre los dos grupos de animales.

Para entender los mecanismos que frenan la proliferación de los hepatocitos en los animales LDLR<sup>-/-</sup>, cuantificamos la expresión de IL6, TNF $\alpha$ , HGF y miR-33. Los resultados mostraron que existía un retraso en la cinética de expresión de la IL6 en los hígados de los animales LDLR<sup>-/-</sup>, los cuales muestran su pico de expresión a las

24h tras la PHx, comparando con los animales salvajes, que tienen su pico de expresión de IL6 a las 8h tras la PHx. Además, en los hígados hepactetomizados de los animales LDLR<sup>-/-</sup> no se expresa de manera efectiva TNF $\alpha$  ni HGF, como ocurre con los animales salvajes.

Previamente se ha descrito la importancia del miR-33 en la regulación del colesterol y en la regeneración hepática. Analizamos la expresión de miR-33 en estos ratones deficientes para el gen del receptor LDL, los cuales muestran esteatosis y altos niveles de colesterol. Los resultados revelaron que existía una disminución del 90% de la expresión de miR-33 en los ratones LDLR<sup>-/-</sup> respecto a los salvajes, antes y después de la PHx.

#### **4.- La deficiencia del gen LDLR no interfiere en la formación de los *lipids droplets* pero sí en la composición de los mismos.**

Para entender cómo afecta la deficiencia del gen del receptor LDLR en la captación de lípidos o en el metabolismo de estos durante la regeneración hepática, analizamos el perfil lipidómico en los hígados de los animales salvajes y en los hígados de los animales LDLR<sup>-/-</sup>, antes de la cirugía y en todos los puntos estudiados tras la PHx.

En los animales LDLR<sup>-/-</sup> a nivel basal, se ha encontrado un mayor concentración de ésteres de colesterol y una menor concentración de ceramidas que los animales salvajes.

Durante la regeneración hepática en los animales salvajes existe un aumento de ésteres de colesterol, llegando a su máxima concentración a las 48h que después descienden a niveles basales. Por el contrario, esta cinética no se observa en los animales LDLR<sup>-/-</sup>, ya parten de niveles más elevados y no presentan variación durante el proceso regenerativo. Lo mismo ocurre con los niveles de esfingomielina y fosfatidilserina; en los animales LDLR<sup>-/-</sup> existe una mayor concentración de esfingomielina siendo significativamente diferente a las 3h. La fosfatidilserina se encuentra significativamente más elevada a las 8h y 24h en los animales LDLR<sup>-/-</sup>. Por otro lado, en los animales salvajes los niveles de ceramidas durante la regeneración disminuyen, llegando a su mínimo a las 8h y 24h tras la cirugía, en cambio, en los animales LDLR<sup>-/-</sup> esta cinética no se observa; los animales LDLR<sup>-/-</sup>

parten de niveles significativamente más bajos de ceramidas y aumentan significativamente a las 48h después de la PHx.

Las ceramidas están involucradas en la apoptosis celular. Estudiamos mediante una tinción de TUNEL el número de células apoptóticas durante la regeneración hepática entre los dos grupos a las 48h, momento en que la concentración de ceramidas se encuentra significativamente más elevada en los LDLR<sup>-/-</sup>. Tras la cuantificación pudimos descartar diferencias significativas entre los dos grupos. Estos datos descartan la apoptosis como causante de la diferencia de células proliferativas entre los dos grupos.

No se encontraron diferencias entre grupos en los niveles de fosfolípidos ni de ácidos grasos libres.

García-Arcos y colaboradores describieron que la composición de los *lipid droplets* cambia durante la regeneración hepática. En condiciones de quiescencia los *lipid droplets* presentan concentraciones más elevadas de colesterol y ésteres de colesterol y menos fosfatidilcolina. Por el contrario en los *lipid droplets* de los hepatocitos en estado proliferativo se encuentra más concentración de fosfatidilcolina y menos colesterol y ésteres de colesterol (García-Arcos I. et al. Lipids. 2010). Estos datos concuerdan con el análisis del lipidoma en los animales salvajes. Sin embargo, nuestros resultados en los animales LDLR<sup>-/-</sup>, indican que el lipidoma en los hígados en estado regenerativo, de estos animales, se asemejan más a un estado de quiescencia y no a un estado regenerativo.

A pesar de estas diferencias entre el cambio de lipidoma, no se observa cambios en la formación ni en la distribución espacial de los *lipid droplets* ni en su cantidad.

Todos estos datos sugieren que la deficiencia del gen LDL no interfiere en la formación de los *lipid droplets* pero sí en su composición, y esta parece estar involucrada en el retraso en la regeneración en los animales deficientes para este receptor.

## **Impaired liver regeneration in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice is associated with an altered hepatic profile of cytokines, growth factors and lipids**

Montse Pauta<sup>1</sup>, Noemi Rotllan<sup>2</sup>, Frances Vales<sup>2</sup>, Ana Fernandez-Hernando<sup>2</sup>, Ryan M. Allen<sup>3</sup>, David A. Ford<sup>3</sup>, Montserrat Marí<sup>4</sup>, Wladimiro Jiménez<sup>1,5,6</sup>, Ángel Baldán<sup>3</sup>, Manuel Morales-Ruiz<sup>1,5,\*;§</sup>, Carlos Fernández-Hernando<sup>2,\*;§</sup>

\*To whom correspondence should be addressed

§These authors share senior authorship

<sup>1</sup>Centro Esther Koplowitz, IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>Departments of Medicine, Leon H. Charney Division of Cardiology, and Cell Biology and the Marc and Ruti Bell Vascular Biology and Disease Program, New York University School of Medicine, New York, NY, USA. <sup>3</sup>Edward A. Doisy

Department of Biochemistry and Molecular Biology, and Center for Cardiovascular Research, Saint Louis University, Saint Louis, MO, USA.

<sup>4</sup>Department of Cell Death and Proliferation, IIBB-CSIC, Liver Unit-Hospital Clínic-IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona, Spain. <sup>5</sup>Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>6</sup>Department of Physiological Sciences I, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

### **Contact Information:**

- Dr. Manuel Morales-Ruiz, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic of Barcelona, 170 Villarroel Street, 08036 Barcelona, Spain, e-mail: [morales@clinic.ub.es](mailto:morales@clinic.ub.es)

-Dr. Carlos Fernández-Hernando, Departments of Medicine, Leon H. Charney Division of Cardiology, and Cell Biology and the Marc and Ruti Bell Vascular

Biology and Disease Program, New York University School of Medicine, New York, NY 10016 USA, e-mail: [carlos.fernandez-hernando@nyumc.org](mailto:carlos.fernandez-hernando@nyumc.org).

**Word count:** 5,088

**Number of figures:** 4 and 3 supplemental figures.

**Conflict of interest:** The authors declared that they do not have anything to disclose.

**Financial support:** This work was supported by grants from the MINECO-Plan Nacional de I+D+I (SAF2010-19025 to MMR and SAF2012-35979 to WJ) and AGAUR (2009 SGR 1496) and Instituto de Salud Carlos III (FIS-PI10/02114 to MM). The Fernández-Hernando Lab is supported by grants from National Institutes of Health (R01HL1077953 and R01HL106063). The Baldán Lab is supported by a grant from the NIH (R01HL107794). The Ford lab is supported by grants from the NIH (HL074214, HL098907 and RR019232). R.M.A. is the recipient of an AHA Predoctoral Fellowship (11PRE7240026). M.P. was supported by MICINN (contract number BES-2007-16909). N.R. was supported by Ministerio de Educación, Programa Nacional de Movilidad de Recursos Humanos (I+D+i 2008-2011). CIBERehd is financed by Instituto de Salud Carlos III.

**ABSTRACT**

**Background & Aims:** It is widely recognized that in the early stages of liver regeneration after partial hepatectomy the hepatocytes accumulate a significant amount of lipids. The functional meaning of this transient steatosis and its effect on hepatocellular proliferation are not well defined. In addition, the basic mechanisms of this lipid accumulation are not well understood although some studies suggest the participation of the Low Density Lipoprotein Receptor (Ldlr). **Methods:** To address these questions we studied the process of liver regeneration in Ldlr null mice and wild-type mice following partial hepatectomy. **Results:** Ldlr deficiency was associated with a significant decrease in serum albumin concentration, during early stages of liver regeneration, and a delayed hepatic regeneration. Remnant livers of *Ldlr*<sup>-/-</sup> showed a time-shifted expression of interleukin-6 (IL-6) and a defective activation of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and hepatocyte growth factor (HGF) expression in early phases of liver regeneration. Unexpectedly, *Ldlr*<sup>-/-</sup> showed no significant differences in the content of lipid droplets after partial hepatectomy compared to wild-type mice. However, lipidomic analysis of the regenerating liver from *Ldlr*<sup>-/-</sup> revealed a lipid profile compatible with liver quiescence: high content of cholesterol esters and ceramide, and low levels of phosphatidylcholine. **Conclusion:** Ldlr deficiency is associated with significant changes in the hepatic lipidome that affect cytokine-growth factor signaling and impair liver regeneration. These results suggest that the analysis of the hepatic lipidome may help to predict the success of liver regeneration in the clinical environment, specifically in the context of pre-existing liver steatosis.

**Word count:** 247

**Keywords:** partial hepatectomy, lipidomics, low-density lipoprotein receptor, liver regeneration, steatosis.



## INTRODUCTION

The mammalian liver is characterized by its regenerative capacity, which is induced after the loss of parenchymal mass. This regeneration process allows the maintenance of the metabolic homeostasis and, eventually, restores the original hepatic mass [1,2]. The use of the rodent partial hepatectomy (PH) model described originally by Higgins and Anderson [3] has resulted in extensive publications describing the sequential steps leading to liver regeneration. The first step is a priming phase induced by cytokines such as IL-6 and TNF $\alpha$ , which is responsible of priming the quiescent hepatocytes for G0 to G1 transition into the cell cycle. The following step is a proliferative phase in which the coordination of growth factors, transcription factors and metabolic signaling pathways trigger cell division in hepatocytes (approximately 24 h post-hepatectomy) and in non-parenchymal cells shortly after hepatocytes proliferation (36 to 96 h post-hepatectomy) [1,2]. The expression of specific miRNAs (miR-21 and miR-221) [4, 5] and changes in the flow of portal blood per unit liver mass [6] have also been described as necessary in the proliferative phase. Finally, after the liver achieves its original hepatocellular mass, there is a termination phase where cell proliferation is repressed. Although this termination step is poorly understood, several studies have described that transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [7], extracellular matrix-mediated signaling via ILK [8] and miR-33 [9] are important candidates for switching off the regenerative response.

Besides the steps described above, it is widely recognized that in the early stages of liver regeneration hepatocytes accumulate a significant amount of lipids in cellular structures called lipid droplets, which are mainly composed of triacylglycerol and cholesteryl esters [10, 11]. The functional meaning of this transient steatosis is not well defined as there are conflicting studies on how alteration of the hepatic lipid contents

affects the proliferative response [12-17]. Another point that is not well understood and that needs further investigation is the basic mechanisms through which the hepatocyte accumulate lipids during liver regeneration. There is some evidence suggesting that the transient steatosis is likely due to both an increase of lipogenic activity and altered lipid transport balance into and out of the hepatocyte. In the context of lipid uptake during liver regeneration, some studies suggest the participation of lipid receptors [18-20]. For instance, the hypolipidemia observed in serum samples from partial hepatectomized rats correlates with the increase in hepatic triglyceride content and supports the idea that lipid transport is affected [18]. In addition, the Ldlr has been shown to be overexpressed in liver after PH [19]. Furthermore, the expression of the *Ldlr* gene is induced as a part of an early growth response in Hep-G2 cells [20]. All these observations suggest a possible involvement of the Ldlr in regulating hepatocyte lipid accumulation and liver regeneration.

The present study was designed in order to address these unanswered questions. Particularly, we hypothesize that *Ldlr* gene deficiency impairs liver regeneration by affecting the hepatic lipidome in hepatectomized mice. To test our hypothesis we studied the hepatic regenerative process in hepatectomized *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. These mice displayed a 50% increase in hepatic cholesterol levels in the absence of pathological stimuli and dietary manipulation [21]. Therefore, the *Ldlr*<sup>-/-</sup> gene deficiency is also a good model to study changes occurring in liver regeneration after PH in the context of hepatic hypercholesterolemia.

## MATERIALS AND METHODS

**Experimental mice.** Experiments were performed in seven-old-week male *Ldlr*<sup>-/-</sup> and WT mice with the C57BL/6 genetic background (Jackson Laboratory, Sacramento, CA, USA). Mice were fed *ad libitum* on a standard pellet diet. All animal experiments were performed with the approval of the Institutional Animal Care Use Committee of New York University Medical Center and the Investigation and Ethics Committees of the Hospital Clinic.

**Surgical Procedure.** PH was performed according to the technique described previously [3]. Two thirds of the liver (median and left lobes) was removed. After PH, wt mice (n=36) and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice (n=32) were sacrificed at different time points; 0, 3, 8, 24, 48, 72 and 120 h. Regenerating bottom right lobe was snap-frozen into liquid nitrogen and the upper right lobe was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C, cryoprotected overnight in 30% sucrose solution and embedded in OCT medium (Tissue-Tek® O.C.T™ Compound, SAKURA) and frozen for future processing. The percentage of liver regeneration was calculated following the formula: weight of non-removed lobes/ Total body weight of mice.

**Lipid analysis.** Livers (50 mg) were homogenized in 500 µL of PBS, and lipids were extracted from 100 µL of the homogenate in the presence of internal standards for each lipid class [22,23]. The different lipid classes (phospholipids, triglycerides, cholesterol esters and ceramides) were quantified from the chloroform extracts using shotgun lipidomics based on class separation by MS/MS specific methods [24].

Other methods and the statistical analysis description are shown in Supplemental Information.

## RESULTS

***Ldlr*<sup>-/-</sup> mice exhibit hepatic steatosis and elevated levels of circulating cholesterol under basal physiological conditions.** Wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice were fed standard diet and mean changes in body weight did not differ significantly among the two experimental groups (Fig. 1A). In addition, gross examination of the livers from wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice showed not significant changes in morphology or weight (data not shown). However, the microscopic examination of both hematoxylin/eosin (H&E) and Oil-Red-O-stained sections from *Ldlr*<sup>-/-</sup> livers revealed microvesicular steatosis with a non-zonal pattern distribution of lipid droplets, compared with wild-type livers (Fig. 1B). *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice also showed a significant 4-fold increase in serum total cholesterol levels compared to wild-type animals at time 0 h (Fig. 1C).

***Ldlr*<sup>-/-</sup> mice displayed impaired liver regeneration and worsening of hepatic dysfunction following PH.** To study the role of the Ldlr during liver regeneration, we performed 2/3 PH in wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. Mice were sacrificed 3h, 8h, 24h 48h 72h and 120 h after the surgical procedure and wet liver remnant weight, together with the total body weight, was used to calculate the hepatic regenerative rate. In wild-type mice the liver to body weight ratios augmented from 1.5% at 3 h to 3.7% at 120 h after PH (Fig. 2A). In contrast, this upward trend in hepatic remnant weight was only partially reproduced in the *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. Specifically, *Ldlr* gene deficiency was associated with a delayed regenerative response that resulted in impaired liver regeneration from 48 h to 120 h, compared to wild-type mice. The body weights of *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice plotted in Figure 2B reflected to a similar extent the impaired hepatic regenerative rate found in the context of the *Ldlr* gene deficiency. To examine whether the delayed liver regeneration observed in the *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice was associated with further impairment in liver function we measured the albumin serum levels. Immediately after PH, serum albumin content declined in both wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice and remained low 48 h after the surgical procedure. This deficiency was more pronounced in the *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice at 3 and 8 h post-

hepatectomy, compared with the wild-type condition. At these time points, the differences between both experimental groups were statistically significant (Fig.2C).

**Ldlr deficiency impairs hepatocellular cell cycle progression and the expression of IL-6, TNF $\alpha$  and HGF during liver regeneration.** To further investigate the association between Ldlr deficiency and impaired liver regeneration, we studied the expression of cell cycle and proliferative markers (Ki-67, cyclin B1, cyclin D1 and PCNA) in hepatectomized wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. Wild-type mice showed a small but significant population of Ki-67 positive cells at 24 h post-hepatectomy (2% per total nuclei), compared with the pre-hepatectomy time point. This expression peaked at 48 h (50% of Ki-67 positive cells per total nuclei) and thereafter declined markedly (Fig. 3A and Supplemental Figure 1A). In contrast, positive Ki-67 hepatic immunostaining in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice was barely detectable at 24 h after PH and was significantly reduced by 50% at 48 h post-hepatectomy, compared with that in wild-type mice at the same time point. Neither wild-type nor *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice showed significant immunostaining for Ki-67 after 72 hours post-hepatectomy (data not shown). We next assessed the expression of cyclin B1, cyclin D1 and PCNA by western blot. As seen in Supplemental Figure 1B, hepatic cyclin B1, cyclin D1 and PCNA expression was significantly increased in wild-type mice after 8 and 24 h of partial hepatectomy compared with *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Similarly, the expression of cyclin B1 and cyclin D1 were also significantly higher in wild-type mice compared with Ldlr deficient mice after 72 h of partial hepatectomy (Supplemental Fig. 1B). However, the hepatic PCNA expression was similar in both groups of mice at this time point.

To understand the mechanism behind the impaired hepatocyte proliferation occurring in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, we quantified the hepatic mRNA expression of IL-6, TNF $\alpha$ , HGF and miR-33 in both wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice before and at different time points after PH. The results showed that absence of Ldlr was associated with a significant reduction of IL-6 expression compared with wild-type mice before PH (0.57 $\pm$ 0.03 IL-6 mRNA fold-

change in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice versus  $1.00 \pm 0.04$  IL-6 mRNA in wild-type mice,  $P < 0.05$ ). However, we observed a time-shifted expression of IL-6, compared with wild-type mice after PH (Fig. 3B, left panel). Moreover, *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice showed a defective activation of TNF $\alpha$  expression in early phases of liver regeneration, compared to wild-type mice (Fig. 3B, middle panel). No significant differences in TNF $\alpha$  expression were found between the two experimental groups before performing PH. HGF has previously been described as an irreplaceable mitogen for hepatocyte proliferation [25-27]. In agreement with these reports, we found elevated HGF levels in liver samples isolated from wild-type mice after 3 and 8 h of partial hepatectomy, compared with the pre-hepatectomy samples. In contrast, the hepatic HGF expression was similar before and after PH in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, suggesting that Ldlr was important for liver regeneration at early stages (Fig. 3B, right panel). We have previously described the importance of miR-33 in regulating cholesterol homeostasis, fatty acid metabolism and hepatocyte proliferation [28, 9]. Interestingly, anti-miR-33 therapy increases hepatic cyclin D1 and CDK6 expression and improves liver regeneration in mice. To determine whether miR-33 might be involved in the impaired liver regeneration observed in Ldlr-deficient mice, we analyzed the expression of miR-33 before and after PH in wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. As shown in Supplemental Figure 1C, miR-33 levels were decreased by more than 90% in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, compared with wild-type mice before and after PH. This result indicates that miR-33 is not involved in the defective liver regeneration observed in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.

**Ldlr deficiency does not interfere with lipid droplet formation but is associated with significant changes in the hepatic lipidome after PH.** To explore whether the absence of Ldlr affects lipid uptake and/or lipid metabolism during liver regeneration we examined the lipidomic profile of livers from wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice at different time points after PH. As shown in Figure 4, the hepatic lipidome was significantly different between the wild-type and the *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice before and after the PH procedure. Before

PH, the major differences found in the liver of *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice were the higher levels of cholesterol esters (2.5-fold increase) and the lower concentration of phosphatidylethanolamine (1.7-fold decrease) and ceramides (2.5-fold decrease), compared with the hepatic lipidome of wild-type mice. The intracellular concentration of cholesterol esters in wild-type mice reached a maximum at 48 h after PH and then returned to basal levels during the regenerative process. By contrast, the concentration of cholesterol esters remained elevated in the *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice without significant changes throughout the hepatic regeneration. We also detected significant differences in the levels of sphingomyelin and ceramide after PH. Hence, *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice showed a concentration of hepatic sphingomyelin significantly higher than wild-type at 3 h after PH. Moreover, ceramide levels increased significantly after two days in the *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, compared with wild-type mice where the kinetics of hepatic ceramide content followed a decreasing pattern as the hepatic regeneration progresses. To test the possibility that ceramide content may contribute to cell death in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice during liver regeneration, we performed TUNEL assay in wild-type and in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice before PH and at 48 h post-PH, which is when the differences in hepatic ceramide content started to be statistically significant among the two groups. Few TUNEL-positive cells were observed before PH and at 48 h after PH. No statistical differences were found between the two experimental groups (supplemental Figure 2).

Another major component of membranes whose concentration was diminished in the liver of *Ldlr*<sup>-/-</sup> animals during the regenerative process was phosphatidylcholine. In this context, our results showed that the phospholipid profile of the *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice did not change uniformly. For instance, phosphatidylserine was significantly increased in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice at 8 and 24 h post-hepatectomy. In contrast to the aforementioned lipid changes, *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice did not showed significant differences in the hepatic levels of triglycerides and free fatty acids before or after PH. Considering what has previously been

published regarding liver regeneration [10], the hepatic lipid profile of *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice after PH is compatible with hepatocellular quiescence.

Despite these differences in lipid profiles, hepatectomized wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice showed equally spatial and temporal distribution of lipid droplets with no significant differences in their amount (see supplemental results and supplemental Figure 3).



## DISCUSSION

The most salient results of this study are that *Ldlr* deficiency in mice was associated with: 1) an impaired liver biosynthetic capacity during early stages of liver regeneration, reflected in the decrease in serum albumin concentration; and 2) a delayed volumetric liver regeneration characterized by a temporal shift in the expression of cell cycle markers and impaired hepatocellular proliferation. In general, the functional implications of a delay in hepatic regeneration are not clear. However, it is foreseeable that in the clinical context of impaired liver function, as in the case of patients with hepatocellular carcinoma, associated cirrhosis and pre-existing liver steatosis; a delay in the onset of hepatic regeneration after surgical resection may be associated with increased morbidity and mortality caused by a further decrease of the liver function.

It has been demonstrated that both  $\text{TNF}\alpha$  and IL-6 act synergistically to prime the G0 to late G1-phase progression into the cell cycle of hepatocytes [29]. Here, we showed that *Ldlr* deficiency was associated with an impaired overexpression of both IL-6 and  $\text{TNF}\alpha$  during the early phases of liver regeneration. These abnormalities in the cytokine network may favor the quiescence of hepatocytes in the remnant liver regardless the concentration of growth factors. In this context, after G0 to late G1-phase transition stimulated by cytokines, growth factors function as mitogens for hepatocytes in the remnant liver [1,2]. One irreplaceable mitogen for hepatocyte proliferation is HGF. Conditional hepatic deletion of the HGF receptor cMet [25, 26] or RNA interference against HGF or cMet in the context of PH [27] results in impaired liver regeneration and high mortality. In our study, the basal expression levels of HGF in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice did not change significantly after PH, in contrast to the described enhanced HGF expression that we observed in hepatectomized wild-type mice after PH. This interesting finding reinforces the concept that *Ldlr* deficiency interferes with the cytokine/growth factor network that regulates hepatocyte proliferation after PH. Another regulator of cell cycle progression and liver regeneration is miR-33 [9]. We previously showed that the

inhibition of miR-33 with antisense oligonucleotides significantly increased the liver-to-body mass ratio in hepatectomized wild-type mice. However, in the context of *Ldlr* deficiency the reduced levels of miR-33 expression were not associated with cell proliferation. The explanation for this discrepancy is beyond the scope of this study. However, these results point to the idea that the comprehensive understanding of the hepatic regeneration process requires a more holistic approach that should consider the crosstalk between the signaling pathways that take place during liver regeneration.

It is widely recognized that in the early stages of liver regeneration there is a transient steatosis characterized by the formation of hepatocellular lipid droplets, which are lipid structures enriched in cholesterol esters and triglycerides. However, there is disagreement concerning whether the experimental manipulation of the hepatic lipidome affects the proliferative response in the remnant liver. For example, DeAngelis *et al.* showed that a high-fat diet impairs liver regeneration in mice after PH [30]. These results are in agreement with early studies performed in mice models of steatosis with either *ob/ob* [14, 19] or *db/db* [31] gene deficiency. In these animals, impairment in hepatic regeneration associated with the lack of leptin activity was shown. These results contrast with the observation that liver regeneration is normal or only slightly delayed in other models of diet-induced steatosis, such as the methionine-choline-deficient [15, 17] or the orotic-acid-supplemented diets [14]. Furthermore, a 50% reduction in hepatic triglyceride content, caused by leptin treatment prior PH, was associated with an impairment of hepatocellular proliferation [12]. In contrast, Newberry *et al.* [13] demonstrated that several knockout experimental mouse models with altered lipid metabolism (*L-Fabp*, *MTP*, *PPAR-alpha* and *FAS* gene deficiency) showed altered hepatic triglyceride content and similar hepatic cholesterol levels without impaired liver regeneration. A plausible explanation for these discrepancies is that different experimental models are associated with different hepatic lipidome composition, which could result in different regenerative phenotypes.

In our study we showed that *Ldlr* deficiency is associated with significant differences in the lipid profile of regenerating liver that are compatible with hepatocellular quiescence. The most relevant difference was the higher levels of cholesterol esters found in the liver of *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice in basal conditions and during the whole regenerative process, compared with wild-type animals. In wild-type mice the intracellular concentration of cholesterol esters reaches a maximum at 48 h after PH and then returns to basal levels. The most plausible functional explanation for this kinetics is that after 48 h post-PH cholesterol esters are metabolized to free cholesterol to allow the formation of new membranes. By contrast, the concentration of cholesterol esters remained elevated in the *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice without significant changes throughout the regenerative process. These results, together with the observation that high concentration of cholesterol esters are abundant in lipid droplets of quiescent livers, compared with regenerating livers [10], suggest that high levels of cholesterol may favor quiescence in hepatocytes. Another major component of membranes whose concentration is diminished in the liver of *Ldlr*<sup>-/-</sup> animals is phosphatidylcholine. As in the case of cholesterol esters, the abundance of phosphatidylcholine has been associated with specific populations of lipid droplets. For instance, lipid droplets from regenerating livers contain a high concentration of phosphatidylcholine, while low concentration is a characteristic of quiescent hepatocytes [10]. We also detected significant differences in the levels of sphingomyelin and ceramides. *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice showed a concentration of hepatic sphingomyelin significantly higher than wild-type at 3 h after PH. In addition, ceramide levels are lower at baseline but increased significantly after two days, compared with wild-type mice. The kinetics of hepatic ceramide abundance observed in wild-type mice showed a significant decrease of ceramide levels as the hepatic regeneration progresses, as expected during hepatic regeneration. In summary, our lipidomic study suggests that the analysis of the hepatic lipidome content before liver resection or in early stages of liver regeneration may predict both the success of tissue regeneration

and the recovery of liver function. Further studies must be conducted to determine whether lipidomic analysis is useful in the clinical context.

In our study we also showed that *Ldlr* gene deficiency is not associated with quantitative or kinetic differences in the accumulation of hepatic triglyceride content or in lipid droplets formation after PH. These results allow us to conclude that: 1) these two mechanisms are not sufficient to ensure proper hepatic regeneration and 2) the contribution of Ldlr to these two features in regenerating liver is not relevant.

**REFERENCES**

- [1] Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43: S45-S53.
- [2] Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-6.
- [3] Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of liver resection. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-97.
- [4] Song G, Sharma AD, Roll GR, Ng R, Lee AY, Blelloch RH, et al. MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 2010; 51: 1735-43.
- [5] Yuan Q, Loya K, Rani B, Mobus S, Balakrishnan A, Lamle J, et al. MicroRNA-221 overexpression accelerates hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 2012.
- [6] Mueller L, Broering DC, Meyer J, Vashist Y, Goettsche J, Wilms C, et al. The induction of the immediate-early-genes Egr-1, PAI-1 and PRL-1 during liver regeneration in surgical models is related to increased portal flow. *J Hepatol* 2002; 37: 606-12.
- [7] Ichikawa T, Zhang YQ, Kogure K, Hasegawa Y, Takagi H, Mori M, et al. Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver. *Hepatology* 2001; 34: 918-25.
- [8] Gkretsi V, Apte U, Mars WM, Bowen WC, Luo JH, Yang Y, et al. Liver-specific ablation of integrin-linked kinase in mice results in abnormal histology, enhanced cell proliferation, and hepatomegaly. *Hepatology* 2008; 48: 1932-41.
- [9] Cirera-Salinas D, Pauta M, Allen RM, Salerno AG, Ramirez CM, Chamorro-Jorganes A, et al. Mir-33 regulates cell proliferation and cell cycle progression. *Cell Cycle* 2012; 11.

- [10] Garcia-Arcos I, Gonzalez-Kother P, Aspichueta P, Rueda Y, Ochoa B, Fresnedo O. Lipid Analysis Reveals Quiescent and Regenerating Liver-Specific Populations of Lipid Droplets. *Lipids* 2010; 45: 1101-8.
- [11] Tijburg LB, Nyathi CB, Meijer GW, Geelen MJ. Biosynthesis and secretion of triacylglycerol in rat liver after partial hepatectomy. *Biochem J* 1991; 277 ( Pt 3): 723-8.
- [12] Leclercq IA, Field J, Farrell GC. Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury. *Gastroenterology* 2003; 124: 1451-64.
- [13] Newberry EP, Kennedy SM, Xie Y, Luo J, Stanley SE, Semenkovich CF, et al. Altered hepatic triglyceride content after partial hepatectomy without impaired liver regeneration in multiple murine genetic models. *Hepatology* 2008; 48: 1097-105.
- [14] Picard C, Lambotte L, Starkel P, Sempoux C, Saliez A, Van DB, V, Horsmans Y. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2002; 36: 645-52.
- [15] Rao MS, Papreddy K, Abecassis M, Hashimoto T. Regeneration of liver with marked fatty change following partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1821-6.
- [16] Yang SQ, Lin HZ, Mandal AK, Huang J, Diehl AM. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. *Hepatology* 2001; 34: 694-706.
- [17] Zhang BH, Weltman M, Farrell GC. Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 133-7.
- [18] Bollard ME, Contel NR, Ebbels TM, Smith L, Beckonert O, Cantor GH, et al. NMR-based metabolic profiling identifies biomarkers of liver regeneration following partial hepatectomy in the rat. *J Proteome Res* 2010; 9: 59-69.

- [19] Bocchetta M, Bruscalupi G, Castellano F, Trentalance A, Komaromy M, Fong LG, et al. Early induction of LDL receptor gene during rat liver regeneration. *J Cell Physiol* 1993; 156: 601-9.
- [20] Ellsworth JL, Chandrasekaran C, Cooper AD. Evidence for sterol-independent regulation of low-density lipoprotein receptor activity in Hep-G2 cells. *Biochem J* 1991; 279 ( Pt 1): 175-87.
- [21] Rudling M, Angelin B. Growth hormone reduces plasma cholesterol in LDL receptor-deficient mice. *FASEB J* 2001; 15: 1350-6.
- [22] Allen RM, Marquart TJ, Albert CJ, Suchy FJ, Wang DQ, Ananthanarayanan M, et al. miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin- and diet-induced hepatotoxicity. *EMBO Mol Med*. 2012; 4(9) : 882-95.
- [23] Bling EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can L Biochem Physiol* 1959; 37: 911-7.
- [24] Han X, Gross RW. Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass Spectrom Rev* 2005; 24:367-412.
- [25] Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10608-13.
- [26] Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4477-82.
- [27] Paranjpe S, Bowen WC, Bell AW, Nejak-Bowen K, Luo JH, Michalopoulos GK. Cell cycle effects resulting from inhibition of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in regenerating rat livers by RNA interference. *Hepatology* 2007; 45: 1471-7.

[28] Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Fisher EA, Moore KJ, Fernández-Hernando C. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 2010; 328(5985): 1570-3.

[29] Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1441-6.

[30] DeAngelis RA, Markiewski MM, Taub R, Lambris JD. A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha. *Hepatology* 2005; 42: 1148-57.

[31] Yamauchi H, Uetsuka K, Okada T, Nakayama H, Doi K. Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in db/db mice. *Exp Toxicol Pathol* 2003; 54: 281-6.



**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1. Effect of *Ldlr* deficiency on body weight and lipid homeostasis under basal physiological conditions.** In (A), scatter plot showing that mean changes in total body weight between wild-type (WT) and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice did not differ significantly. The central horizontal line represents the mean  $\pm$  SEM. In (B), liver sections from WT and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice stained with Oil-Red-O. Inserts: higher magnification. Original magnification x200, insert x400 (n=5). In (C) serum levels of cholesterol. Zero-h cholesterol levels were quantified from serum samples removed during surgery. \*P<0.05, compared with WT mice, (n=3).

**Figure 2. Impaired liver regeneration and worsening of liver dysfunction after PH in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.** In (A), liver to body weight ratio of wild-type (WT) and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice at the indicated time points after PH, (n=5 at each time point). \*P<0.05 for WT vs. *Ldlr*<sup>-/-</sup>. In (B), mean body weights of WT and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice before and after PH. Error bars indicate standard errors. \*P<0.05, compared with WT mice (n=5). In (C), the levels of albumin were measured in serum of WT and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice pre-PH and post-PH, (n=5). \*P<0.05, compared with WT mice.

**Figure 3. *Ldlr* deficiency impairs cell cycle progression and the expression of IL-6, TNF $\alpha$  and HGF during liver regeneration.** (A), immunostaining for the Ki-67 antigen (red) in liver of wild-type (WT) and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice before and after PH. Original magnification x100 (n=4). In (B), the mRNA expression of IL-6, TNF $\alpha$  and HGF in liver tissue was quantified by quantitative RT-PCR. Horizontal line with value=1 denotes the baseline level in wild-type mice before PH, (n=4). \*P<0.05 versus *Ldlr*<sup>-/-</sup>; #P<0.005 against the baseline levels of the same experimental condition.

**Figure 4. Hepatectomized *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice exhibit a hepatic lipid profile compatible with liver quiescence.** The hepatic content of cholesterol ester (CE), phosphatidylethanolamine (PE), ceramide, sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine

(PC), phosphatidylserine (PS), triglycerides and free fatty acids (FFA) were quantified in liver tissue of wild-type (WT, white bars) and *Ldlr*<sup>-/-</sup> (grey bars) mice. Zero-h data were obtained prior PH (n=3 in each group). \*P<0.05 versus wild-type mice.

**SUPPLEMENTAL INFORMATION**

- 1. Supplemental materials and methods**
- 2. Supplemental results**
- 3. Supplemental figure legends**

## SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

**Cholesterol and albumin analysis.** At sacrificed, plasma was separated by centrifugation and total cholesterol was assayed (1:5 dilution) using the Cholesterol-E Kit (Wako Chemicals USA, Richmond, VA, USA) according to the manufacture's instructions. Albumin was detected using Quantitative Colorimetric Albumin Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) according to the manufacture's instructions.

**RNA isolation and quantitative real-time PCR.** Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Grand Island, USA) according to the manufacturer's protocol. For mRNA quantification, cDNA was synthesized using Taqman RT reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), following the manufacturer's protocol. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed in triplicate using iQ SYBR green Supermix (Biorad Hercules, CA, USA) an iCycle Real Time Detection System (Biorad). Messenger RNA levels were normalized to 18s expression. The primer sequences used were:

-IL-6: 5'-AGT TGC CTT CTT TGG GAC TGA-3' and 5'-TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC-3'

-TNF $\alpha$ : 5'-CCC TCA CAC TCA GAT CAT CTT CT-3' and 5'-GCT ACG ACG TGG GCT ACA G-3'

-HGF: 5'-TTG CCT TCG AGC TAT CGC GGT-3' and 5'-CAG CAC TGT GAG CGC ACG TTT T-3'

For miRNA quantification, total RNA was reverse transcribed using the RT2 miRNA First Strand Kit (SABiosciences). Primers specific for mouse miR-33 (SABiosciences) were used and values normalized to mouse SNORD as a housekeeping gene.

**Histology and immunohistochemistry.** For the visualization of hepatic lipid content, 8- $\mu$ m frozen sections were rehydrated and lipid droplets deposition was detected by

Oil-Red-O-staining (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Sections were rinsed with 60% isopropanol and stained for 20 min with filtered Oil-Red-O-solution (0.5% in isopropanol followed by 60% dilution in distilled water). After two rinses with 60% isopropanol and distilled water, slides were counterstained with hematoxylin for 4 min, rinsed with water and mounted. Oil-Red-O-staining was visualized using a light microscope (Nikon Eclipse 600, Kawasaki, Kanagawa, Japan) and then analyzed using the morphometry software ImageJ (version 1.37). To evaluate the Oil-Red-O-stained area, the area measured was divided by the net field area and then multiplied by 100. Subtraction of vascular luminal area from the total field area yielded the final calculation of the net stained area.

For immunofluorescence experiments, 8- $\mu$ m frozen sections were rehydrated, blocked with 5% normal goat serum (NGS) and incubated with rabbit anti-ki67 antibody (1:100, Abcam, Cambridge, MA, USA). Controls without primary antibodies were used as negative controls. Binding sites of the primary antibodies were revealed with Alexa-594 goat-anti-rabbit IgG (1:1000, Invitrogen, San Diego, CA, USA). Samples were analyzed with a fluorescence microscope system (Nikon, Kawasaki, Kanagawa, Japan). The cells were counterstained with DAPI to visualize the nuclei.

**Western blot.** Lysates were prepared in a lysis buffer (Tris-HCl 20 mM pH 7.4 containing 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 20 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 2 mM Pefabloc and Complete® from Roche). Forty  $\mu$ g of proteins were separated on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel (Mini Protean III, BioRad, Richmond, Ca) and transferred for 2 hours at 4°C to nitrocellulose membranes (Transblot Transfer Medium, BioRad, Richmond, CA) that were stained with Ponceau-S red as a control for protein loading. The membranes were incubated at 4°C with rabbit polyclonal anti-mouse cyclin B1, rabbit polyclonal anti-mouse cyclin D1 (Cell Signaling, Boston, MA), rabbit polyclonal anti-mouse PCNA (Cell Signaling, Boston, MA) or rabbit polyclonal anti-mouse HSP90 antibodies (Abcam plc, Cambridge, UK)

overnight in a 1:1000 dilution. Then, the membranes were incubated with fluorophore-conjugated secondary antibodies at a 1:500 dilution (Molecular Probes, Invitrogen, MA) for 1 hour at room temperature. Protein bands were visualized using the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE).

**TUNEL staining.** Liver sections of 8- $\mu$ m were embedded and frozen in OCT. Tissues were then incubated with terminal deoxynucleotidyltransferase and labelled deoxynucleotides for 1 h according to the *in situ* cell death detection kit manufacturer's protocol (Roche, Indianapolis, IN). Samples were then mounted on glass microscope slides and analyzed by fluorescence microscopy (Axio; Carl Zeiss Micro Imaging Inc, Germany) using a standard fluorescein filter. For each sample, the number of TUNEL-positive cells was counted per 200 $\times$ high-power field. At least 10 representative fields were evaluated for each treatment group.

**Statistical analysis.** In the case of homoscedasticity and normally distributed data, groups were compared using Student's t-test or ANOVA (analysis of variance) for independent samples. For other types of data, the Mann–Whitney U test or the Kruskal–Wallis test was used. Tukey's test (with ANOVA) or Dunn's test (with Kruskal–Wallis) were used as post hoc test to perform pairwise comparisons. The statistical significance of the change in the percentage of Oil-red-O was calculated using ANOVA (with Tukey's test) after computing the square root of the proportions and then taking the inverse sine of this value. Differences were considered to be significant at a P value <0.05. Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

**SUPPLEMENTAL RESULTS**

Liver regeneration always curses with transient steatosis characterized by the accumulation of hepatocellular lipid droplets. To investigate the involvement of *Ldlr* deficiency in lipid droplet formation microscopic examination of H&E and Oil-Red-O-staining was performed in liver tissue from wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice before and after partial hepatectomy. As described earlier, *Ldlr* gene deficiency was associated with microvesicular liver steatosis before partial hepatectomy, compared to the livers of wild-type animals. In addition, *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice showed vacuolated hepatocytes, but no significant necrotic areas were observed (supplemental figure 3A before-PH panels, and supplemental figure 3B). Despite these basal differences in hepatic lipid content, hepatectomized wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice showed equally spatial and temporal distribution of lipid droplets with no significant differences in their amount. Lipid droplet accumulation was evident as early as 8 h post-partial hepatectomy, time where the maximum values were observed, and declined thereafter (supplemental Figure 3A after-PH panels, and supplemental Figure 3B).

## SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

**Supplemental Figure 1. Cell cycle markers and miR-33 expression levels in regenerating livers of wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.** In (A), the histogram shows the computed assisted quantification of positive Ki-67 cells per total nuclei in the liver of wild-type (WT) and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice after partial hepatectomy (PH) (n=4). \* denotes P<0.001 vs. 24 hours and 48 hours conditions; & denotes P<0.001 vs. 48 hours wild-type mice; # denotes P<0.001 vs. 24 hours *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice and 72 hours condition. In (B), forty µg of proteins from liver sections of wild-type (WT) and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice obtained at the time of partial hepatectomy (T=0), 8 h, 24 h and 72 h post-PH were incubated with specific antibodies for cyclin B1, cyclin D1 and PCNA (n=3). Antibody immunoreactivity was detected by western blot. Blotting for HSP90 was performed as a loading control. In (C), quantitative RT-PCR expression profile of miR-33 in the liver of wild-type (WT) and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice before and after partial hepatectomy (PH) (n=3). For each time point, all the values were normalized with respect to the same value measured in WT at the same time point, arbitrarily assigned a value of one. \* denotes P<0.001 vs. WT mice.

**Supplemental Figure 2. Analysis of hepatic cell death by TUNEL assay.** Representative histological panels of TUNEL staining (pink color marked with white arrows) in liver sections from wild-type (WT) and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice before PH or at 48 h post-PH. Original magnification x200 (n= 3). In (B), computed-assisted quantification for TUNEL-positive cells in liver tissue of wild-type (WT, white bars) and *Ldlr*<sup>-/-</sup> (grey bars) mice before and after partial hepatectomy. Bars represent the mean ± SEM.

**Supplemental Figure 3. Hepatocellular lipid accumulation in regenerating livers of wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup> deficient mice.** Representative histological panels of Oil-red-O-staining (red) in liver sections from wild-type (WT) and *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice before partial hepatectomy (PH) or 8 h, 24 h and 48 h post-PH. The Oil-red-O-staining illustrates the homogeneity in the lipid droplet amount and distribution among wild-type and *Ldlr*<sup>-/-</sup>



mice. Inserts: higher magnification from the same histological sections. Original magnification x200, insert x400. (n= 3 to 5 animals). In (B), computed-assisted quantification for the percentage of Oil-red-O-area in liver tissue of wild-type (WT, white bars) and *Ldlr*<sup>-/-</sup> (grey bars) mice before and after PH. Bars represent the mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs before-PH condition, \*\*P<0.05 vs before-PH and 48h-after-PH conditions, \*\*\*P<0.05 vs before-PH, 24h-after-PH and 48h-after-PH conditions, &P<0.01 vs WT-before-PH.

FIGURA 1.

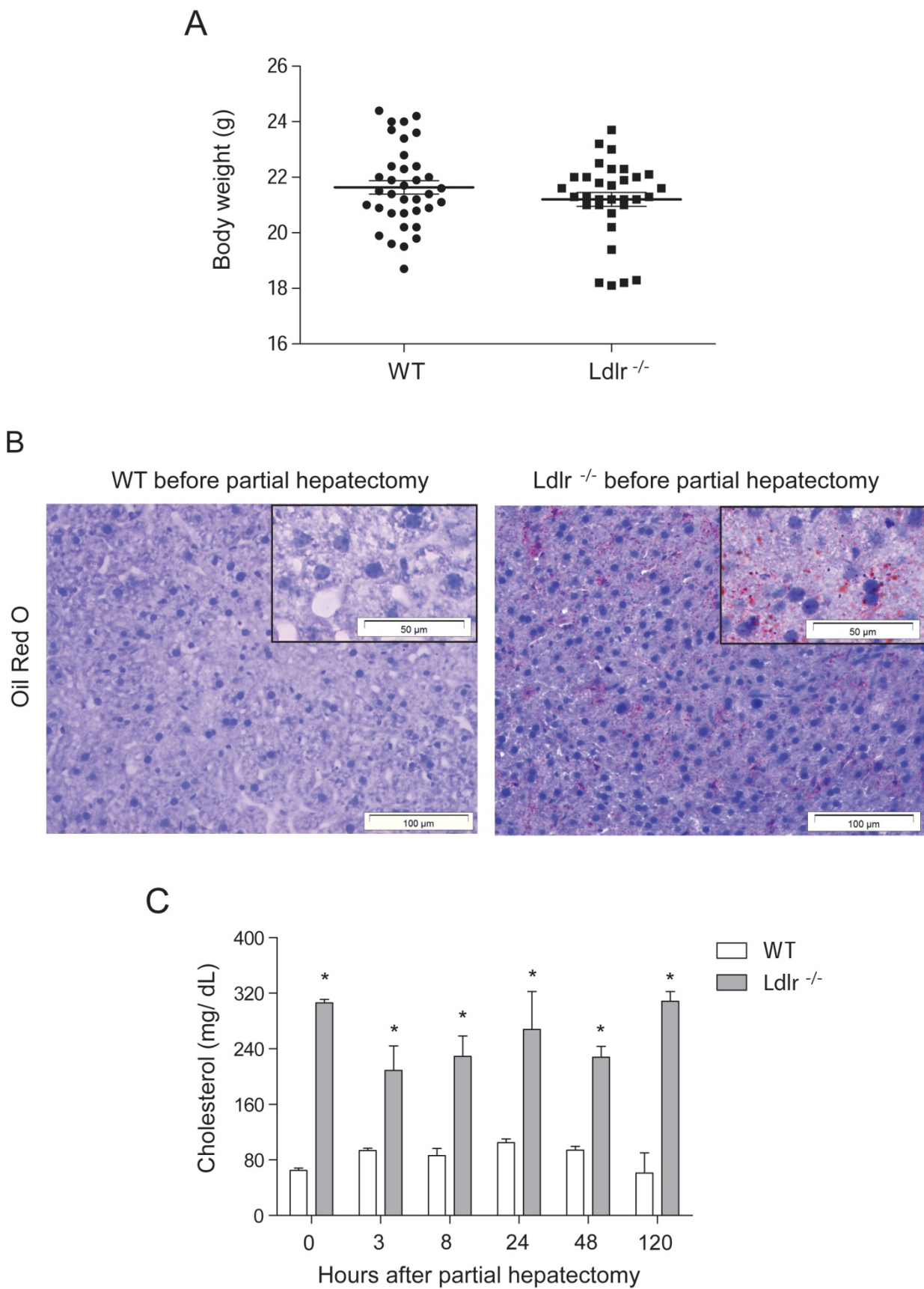
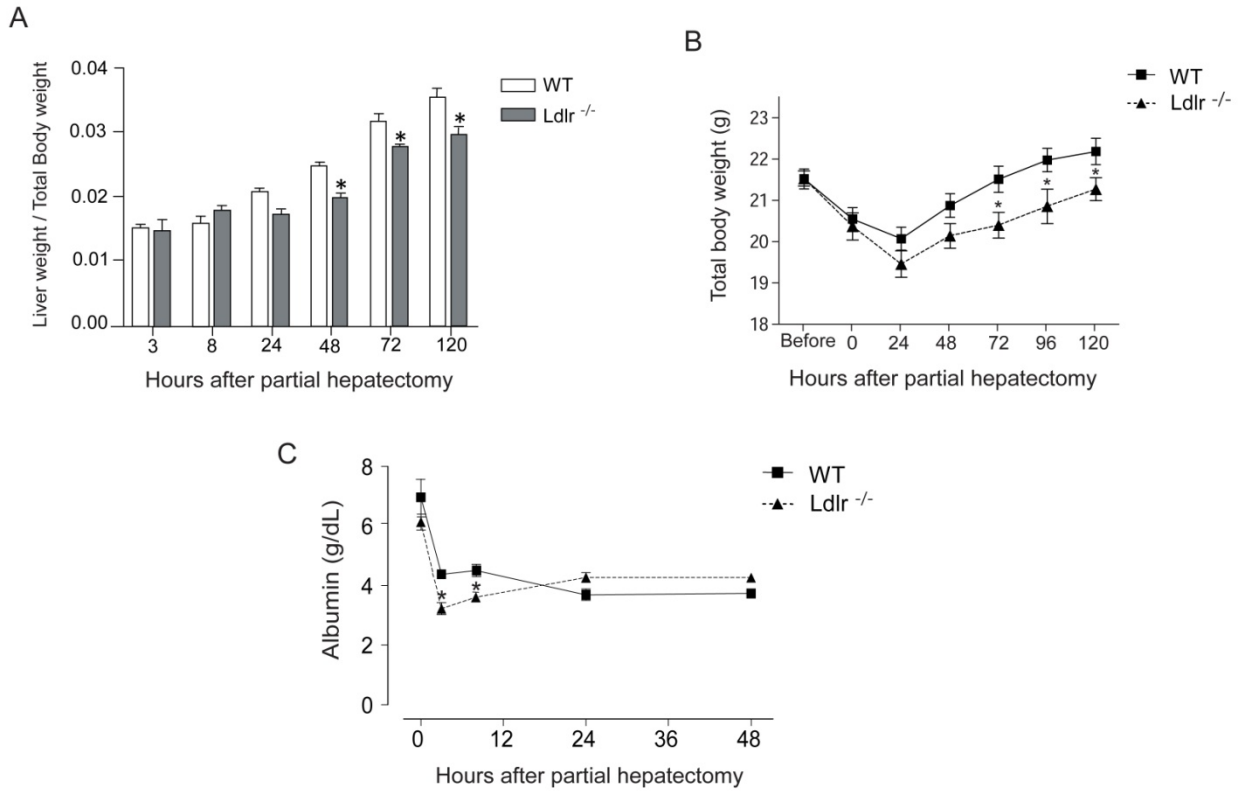


FIGURA 2.



**FIGURA 3.**

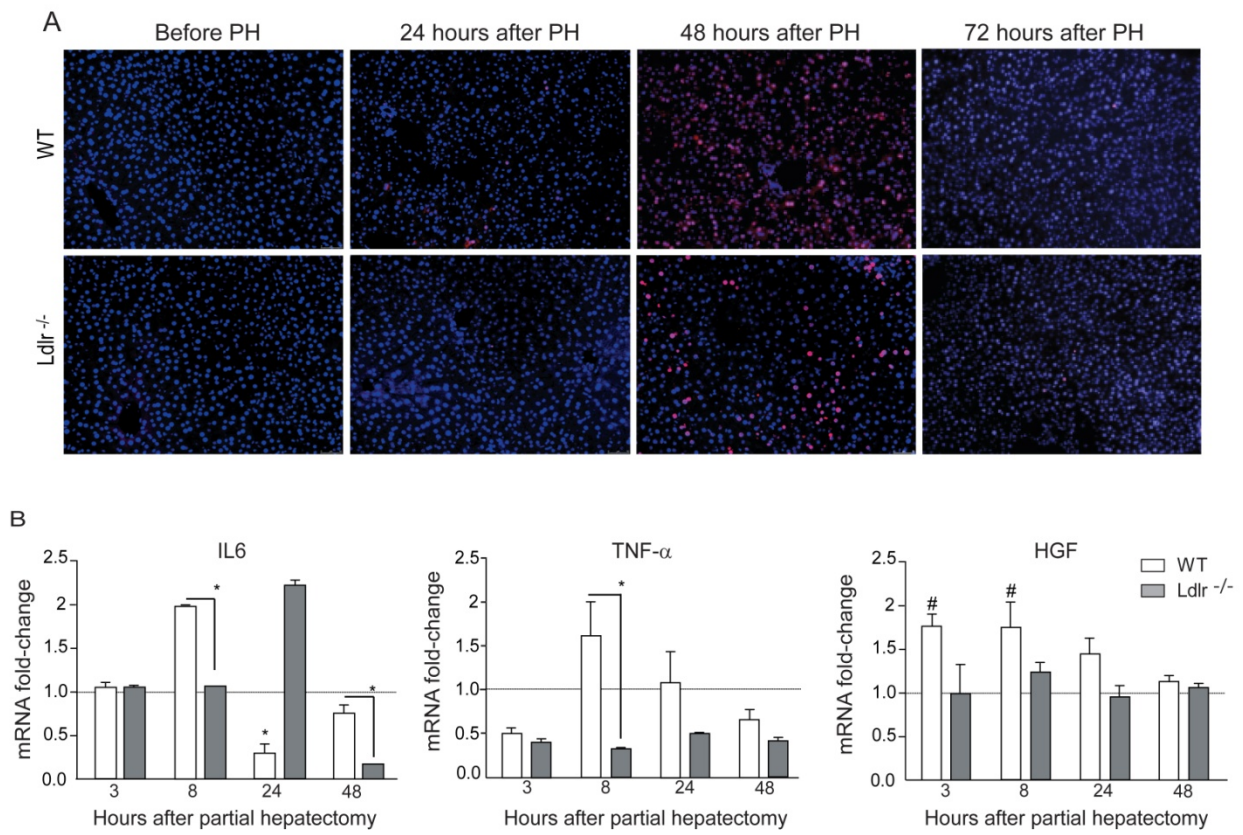


FIGURA 4.

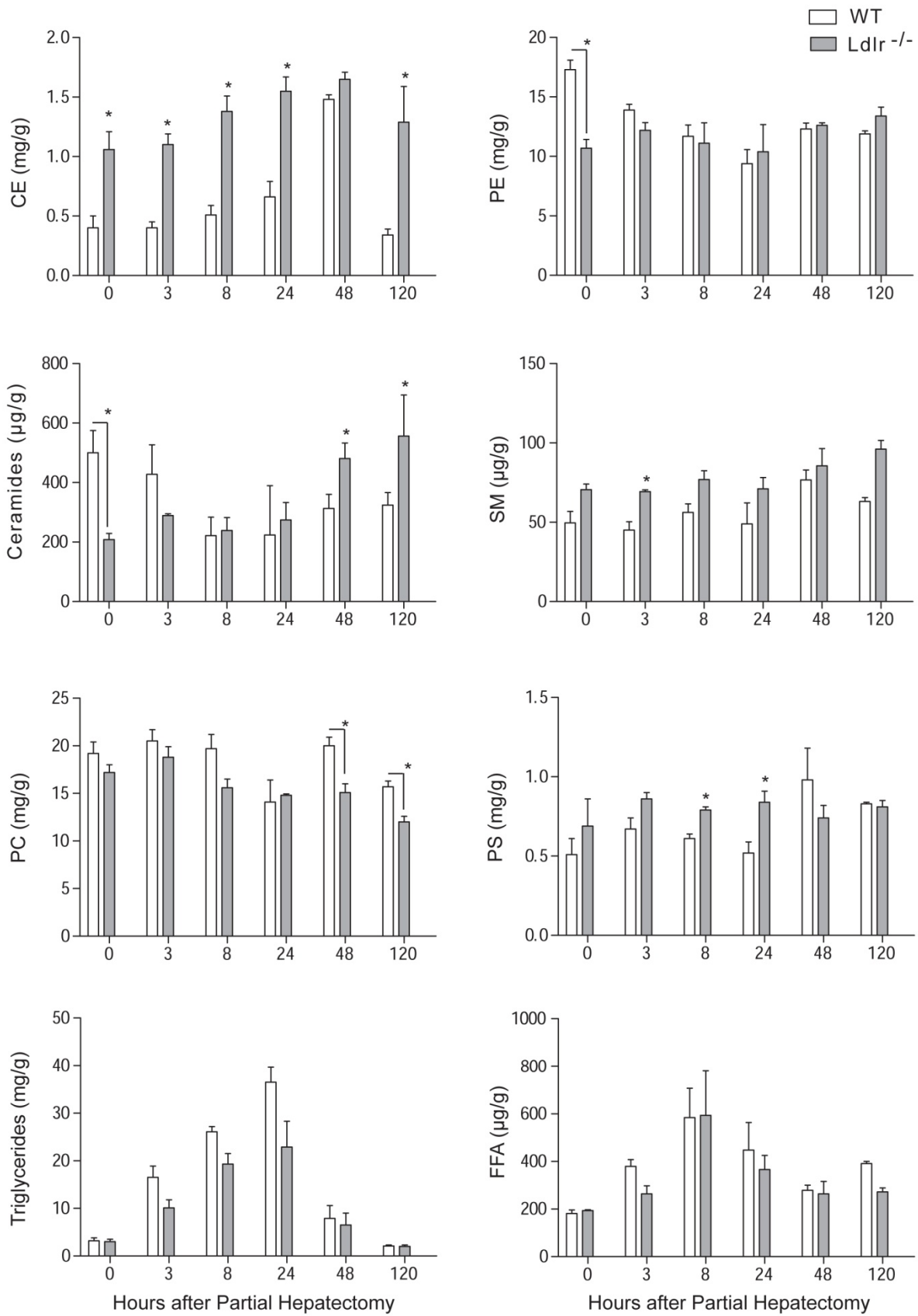


FIGURA SUPLEMENTARIA 1.

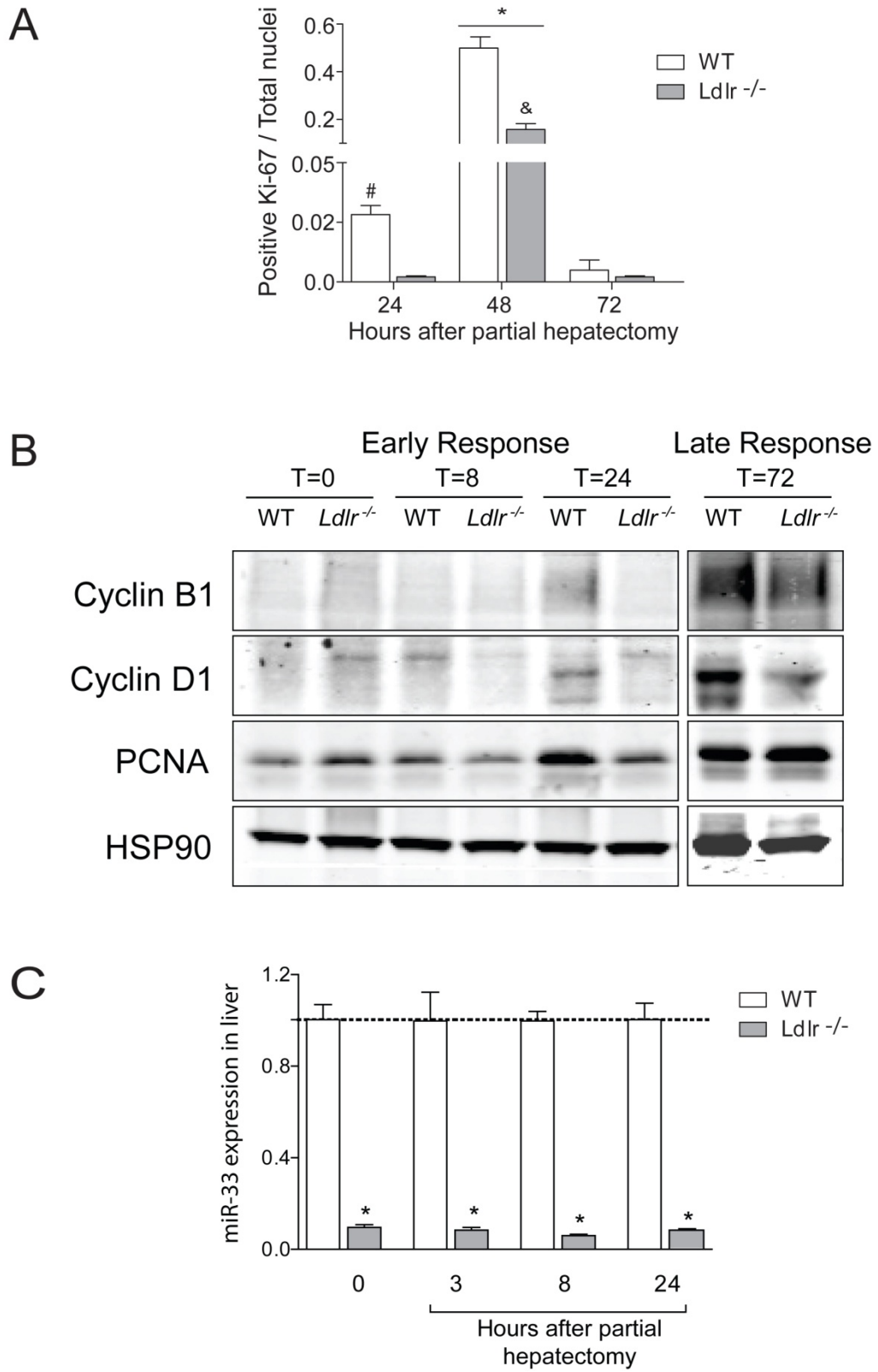
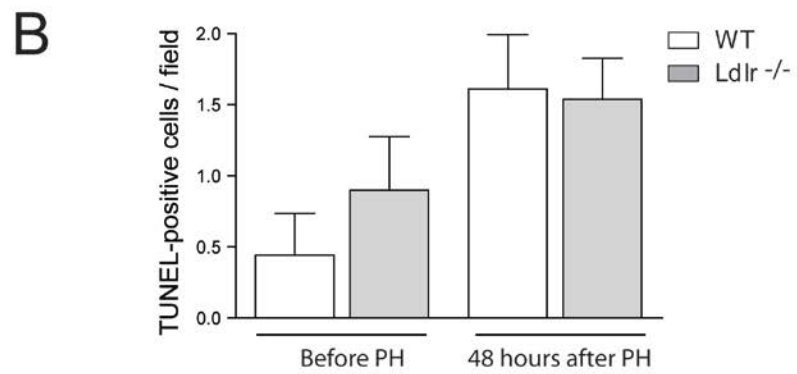
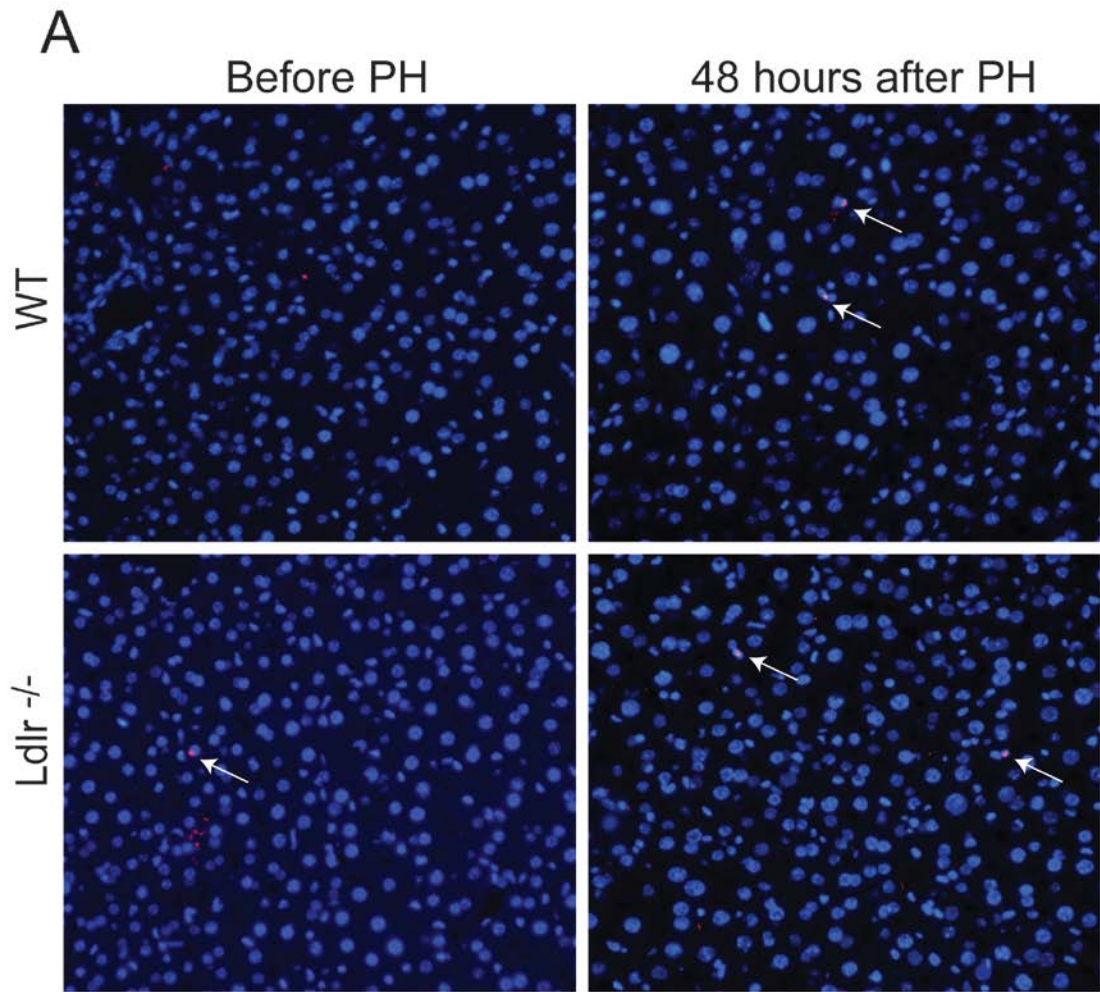


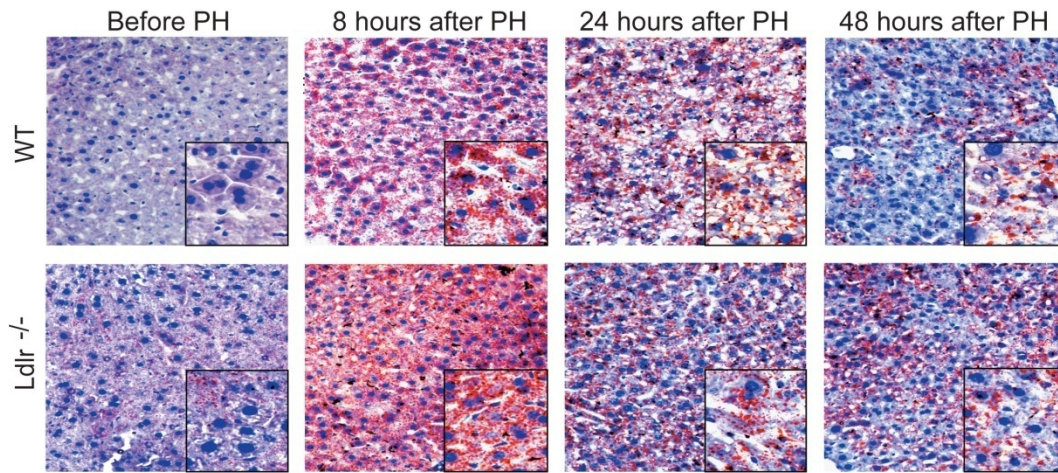


FIGURA SUPLEMENTARIA 2.

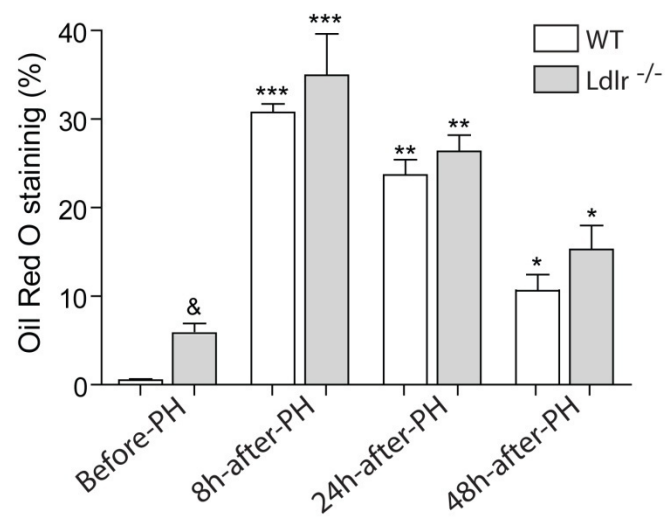


## FIGURA SUPLEMENTARIA 3.

A



B







**DISCUSIÓN**



## Discusión

El primer estudio se centra en la identificación del papel del miR33 en la regulación de la proliferación celular, progresión del ciclo celular y en la regeneración hepática abriendo una nueva ventana en la investigación y el papel del miR-33.

El miR-33 se ha descrito como un microRNA altamente conservado desde *Drosophila* hasta humano, y se encuentra en una secuencia intrónica del gen *Srebp*. Los genes diana que regula miR-33 son genes involucrados en la homeostasis del colesterol, como son los genes *Abca1* y *Abcg1*.

En este estudio se demuestra que miR-33 regula de manera negativa los genes involucrados en el ciclo celular; *Cdk6* y *Ccnd1*, lo que conlleva a una parada del ciclo celular en la fase G1. Además, la sobreexpresión del miR-33, en las células hepáticas Huh7, reduce la proliferación celular y retarda el ciclo celular en la fase G1. En el contexto de la regeneración hepática, se observa una reducción significativa de la expresión de miR-33 tras la PHx que después aumenta a medida que la regeneración avanza. Los niveles de miR-33 observados tienen una correlación negativa con los niveles hepáticos de CDK6 y CCND1. Paralelamente, la inhibición del miR-33 *in vivo*, mediante la inyección subcutánea de una secuencia anti sentido complementaria al miR-33, aumenta de manera significativa el ratio de volumen de hígado regenerado/ peso del cuerpo a las 96h tras la PHx. Estos resultados *in vivo* son coincidentes con los resultados *in vitro*, indicando que el miR-33 suprime la progresión correcta de la regeneración hepática.

La recuperación de la función hepática después de una PHx está liderada por una variedad de señales las cuales inducen la expresión de genes involucrados en el crecimiento y/o proliferación celular, que conlleva la progresión de la regeneración hepática (Michalopoulos GK. J. Cell. Physiol, 2007). Además se ha descrito que la expresión de CCND1 es suficiente para promover la replicación del hepatocito y el crecimiento del hígado *in vivo*,

(Hanse E.A. et al. Cell Cycle. 2009). Las ciclinas E y D y sus CDKs (CDK 4/6) regulan la progresión del ciclo celular a través del paso de la fase G1 a la fase S (Nurse P. Cell. 1997).

La activación del complejo CCND1/ CDK6 fosforila la proteína del retinoblastoma en múltiples residuos, previniendo su unión al factor de transcripción E2F. Cuando E2F no forma complejo con Rb, activa la transcripción de proteínas necesarias para la progresión hacia la fase S (Schafer K.A., Vet. pathol., 1998). Previos estudios han sugerido que el CCND1 en hepatocitos, es un mediador que juega un papel importante en la progresión de la fase G1 del ciclo celular. De igual manera, CDK4/CDK6 regulan el ciclo celular en la progresión de células de hepatoma. De acuerdo con estos resultados, las células Huh7 y HepG2 tratadas con un potente inhibidor de estas quinasas (PD-0332991) quedan detenidas en la fase G1 del ciclo celular (Rayner K.J. et. al. J. Clin. Invest. 2011).

En este estudio se demostró que las dianas de miR-33; CCND1 y CDK6 regulan la proliferación del hepatocito. Además de estos datos, en otro estudio se demostró que, además del CCND1 y CDK6, el p53 también es diana de miR-33 (Herrera-Merchan A, et. al. Cell Cycle. 2010). p53 activa la transcripción de genes que inducen la parada del ciclo celular, apoptosis y senescencia en respuesta a condiciones de estrés, incluyendo el daño del material genómico. En este estudio, cuando las células sobreexpresan el miR-33 o el miR-33 está inhibido, no se han encontrado diferencias en el número de células apoptóticas, sugiriendo que el efecto del miR-33 sobre la proteína p53 y la viabilidad es específico del tipo celular.

Aparte del miR-33, se han descrito otros miRNAs que tienen un papel importante en la regulación y la progresión del ciclo celular. El mRNA de CDK6 es diana de miR-24, miR-34a, miR-124, miR-125b, miR-129, miR-137, miR-195, miR-449, las ciclinas tipo D son diana de la familia de los miR-15, miR-17, miR-19a, miR-20a y miR-34 que reprimen su expresión (Bueno MJ, et. al. Biochim Biophys Acta. 2011).

El impacto de los miRNA en la regeneración hepática ha sido estudiado mediante la generación de ratones deficientes de miRNA en los hepatocitos. Estos ratones son viables y no sufren alteraciones durante su desarrollo. Sin embargo, a las 36h tras una PHx se ha observado que los hepatocitos de estos animales, no son capaces de pasar de manera óptima a la fase S. Estos resultados indican que los miRNAs juegan un papel importante en la regulación de la regeneración hepática.

El proceso de regeneración se divide en tres fases; la de iniciación, la de proliferación y la de terminación. Esta última es quizás la menos entendida y la mayoría de los estudios centrados en esta fase están basados en estudiar la capacidad anti proliferativa del TGF- $\beta$ 1. Sin embargo, ratones transgénicos para esta molécula tras una PHx no presentan cambios en la regeneración hepática, sugiriendo que quizás existan otros mecanismos que también influyan en la fase de terminación (Sanderson N, et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1995).

En este contexto, nuestros resultados apoyan la idea que el miR-33 puede tener un papel importante en esta fase de terminación en el proceso de regeneración hepática. Estos resultados pueden abrir nuevos campos de investigación y nuevas perspectivas terapéuticas para estimular la regeneración hepática en enfermedades hepáticas crónicas, o bien después de una resección en pacientes afectados por un carcinoma hepatocelular.

La progresión del ciclo celular y la proliferación celular son procesos muy controlados y son críticos en el desarrollo, organogénesis y regeneración. Se ha descrito que las vías de síntesis del colesterol afectan a la proliferación celular y a la progresión del ciclo celular (Martínez-Botas J. et. al. FASEB J. 1999). El colesterol es un componente esencial de las membranas celulares y su síntesis está regulada por el factor de transcripción SREBP (Brown MS. et al. Cell. 1997). El dato más relevante de este primer estudio es la importancia del miR-33 en la regeneración hepática, pero es evidente

que su expresión está condicionada por la concentración de colesterol tanto a nivel hepático como sanguíneo.

Los niveles de colesterol hepático están regulados tanto por su síntesis, en la que intervienen las proteínas SREBP, o por su captación, a través de los receptores de lipoproteínas, como el receptor LDL.

El segundo estudio de esta tesis se centra en el análisis de la deficiencia del receptor LDL durante la regeneración hepática.

Los resultados más relevantes de este estudio son que la deficiencia del LDLR en ratones está asociada con; una disminución en la funcionalidad hepática durante las primeras horas de regeneración hepática, que se traduce en una disminución de la concentración de albúmina en suero. Así mismo se asocia con un retraso de la regeneración hepática caracterizada por un retraso en la expresión de marcadores del ciclo celular y menor proliferación hepatocelular.

Las implicaciones funcionales que pueda ocasionar un retraso en la regeneración hepática no están del todo claras. Pacientes con carcinoma hepatocelular, asociado a cirrosis y esteatosis, padecen de una menor función hepática. En estos pacientes de riesgo, un retraso en la regeneración hepática tras una resección quirúrgica puede ocasionar un aumento de la morbilidad y mortalidad causada por una disminución brusca de la funcionalidad hepática.

Se ha demostrado que tanto TNF- $\alpha$  como IL-6 actúan de manera sinérgica para permitir a la célula el paso de la fase G0 a la fase G1 del ciclo celular (Yamada Y, et. al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997). En este estudio, demostramos que la deficiencia de LDLR está asociada a un retraso en la expresión de la IL-6 y de TNF- $\alpha$  en las primeras fases de la regeneración. Anomalías en la vía de las citocinas favorecen la quiescencia de los hepatocitos a pesar de que exista una concentración óptima de factores de crecimiento. En este contexto, la estimulación de la transición de la fase G0 hasta el final de la fase G1 está estimulada por citocinas y factores de

crecimiento que funcionan como mitógenos en los hepatocitos de los lóbulos remanentes (Michalopoulos GK, DeFrances MC. Science. 1997). Se ha descrito, que el HGF es un mitógeno irremplazable durante la regeneración hepática para la proliferación. La delección condicional del receptor del HGF, o de su receptor, c-Met (Borowiak M, et. al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004) o la interferencia contra mRNA de HGF o de c-Met con un mRNA de interferencia (Paranjpe S, et. al. Hepatology. 2007) empeora la regeneración hepática y aumenta la mortalidad. Tras una PHx en animales con fenotipo salvaje, existe un incremento de la expresión de HGF. En cambio, en los ratones con la delección del gen *Ldlr*, no presentaba cambios significativos después de la PHx respecto su expresión basal. Estos resultados refuerzan el concepto de que la deficiencia del receptor de LDL interfiere en la vía de citocinas y factores de crecimiento que regulan la proliferación de los hepatocitos tras la PHx.

En los primeros estadios de la regeneración hepática existe una esteatosis transitoria caracterizada por la formación de *lipid droplets*, los cuales están básicamente formados por colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos. Sin embargo, existe cierta controversia de cómo la manipulación del lipidoma afecta a la respuesta proliferativa en los lóbulos remanentes tras una PHx. DeAngelis y cols. mostraron que una dieta rica en grasa tras una PHx, producía un retraso en la regeneración hepática (DeAngelis RA, et. al. Hepatology. 2005). Estos resultados están en concordancia con otros estudios más recientes con modelos de esteatosis (en ratones deficientes del gen *ob/ob* o *db/db*) (Picard C, et. al. J Hepatol. 2002 y Yamauchi H, et. al. Exp Toxicol Pathol. 2003). En estos animales la peor regeneración hepática está asociada a una pérdida de la actividad de la leptina. Sin embargo, otros estudios demuestran que en modelos animales a los que se les induce esteatosis, la regeneración hepática es normal o solo sufre un ligero retraso (Rao MS, et. al. Dig Dis Sci. 2001, Yang SQ, et. al. Hepatology. 2001, Zhang BH, et. al. J Gastroenterol Hepatol. 1999). Se demostró que una reducción del 50% del contenido de los triglicéridos en el hígado, causado por un tratamiento con leptina antes de la PHx, está asociado con una peor



proliferación de los hepatocitos (Leclercq IA, et. al. Gastroenterology. 2003). Por el contrario, Newberry y cols. (Newberry EP, et. al. Hepatology. 2008), demostró que animales con deleciones en genes que afecten el metabolismo lipídico y tras una PHx, se altera la concentración de triglicéridos sin alterar ni la concentración de colesterol ni la regeneración hepática. Una posible explicación para estas discrepancias es que todos estos modelos animales utilizados presentan diferencias en la composición del lipidoma lo que resulta una diferencia en el fenotipo de regeneración.

En nuestro estudio hemos observado que la deleción del gen *Ldlr* está asociada a diferencias significativas en el perfil lipídico asociado a un perfil lipídico encontrado en un hígado en quiescencia y no en un hígado en regeneración. La diferencia más relevante encontrada en los ratones LDLR<sup>-/-</sup> con respecto a animales con fenotipo salvaje, se encuentra en los altos niveles de ésteres de colesterol que los animales LDLR<sup>-/-</sup> presentan. En los ratones salvajes la concentración intracelular hepática de ésteres de colesterol llega a su máximo a las 48 horas tras la PHx. Una posible explicación para esta cinética, es que tras la acumulación de los ésteres de colesterol, a partir de las 48h, se metabolizan a colesterol libre para la formación de nuevas membranas. Por el contrario, en los animales LDLR<sup>-/-</sup> las concentraciones de ésteres de colesterol se mantienen elevadas y no sufren cambios durante el proceso. Estos resultados, junto con la observación que los niveles elevados de ésteres de colesterol son abundantes en los *lipid droplets* de hígados quiescentes (García-Arcos I. Lipids. 2010), sugieren que altos niveles de colesterol favorecen el estado quiescente del hepatocito.

Otro componente de las membranas, cuya concentración se encuentra disminuida en los animales LDLR<sup>-/-</sup> es la fosfatidilcolina. Se ha descrito que en los hígados que sufren regeneración aumenta la concentración de fosfatidilcolina, mientras que una concentración menor está asociado a hígados quiescentes (García-Arcos I. Lipids. 2010). También observamos diferencias significativas en los niveles de esfingomielina y ceramidas. Los

animales LDLR<sup>-/-</sup> muestran una concentración hepática de esfingomielina significativamente más elevada a las 3h tras la PHx que los animales salvajes. Los niveles de ceramidas aumentan de manera significativa en los animales LDLR<sup>-/-</sup> a partir de las 48h tras la PHx comparando con los animales salvajes, los cuales muestran una cinética distinta; los niveles de ceramidas disminuyen al progresar la regeneración hepática.

Este segundo estudio, sugiere que el análisis del lipidoma hepático antes de una resección hepática o en los primeros estadios de la regeneración hepática podría predecir el éxito de la regeneración hepática y la recuperación funcional del hígado.

En el análisis de la acumulación lipídica no observamos cambios en la formación ni en la acumulación de los *lipid droplets*, tampoco en la concentración ni cinética de los triglicéridos.

De este segundo estudio podemos concluir que la deficiencia del gen *Ldlr* está asociada a cambios significativos en el contenido del lipidoma hepático que afecta a las vías de citocinas y factores de crecimiento y como consecuencia a la regeneración hepática.



**CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

Considerando los resultados presentados en esta Tesis Doctoral formulamos las siguientes conclusiones:

1. miR-33 regula la expresión de los genes *Cdk6* y *Ccnd1*.
2. La regulación de los genes *Cdk6* y *Ccnd1* se lleva a cabo mediante la unión específica de miR-33 a los transcritos de estos genes.
3. miR-33 regula la proliferación celular de hepatocitos mediante la inhibición de la expresión de *Cdk6* y *Ccnd1*.
4. El tratamiento de ratones hepatectomizados con anti-miR-33 estimula la regeneración hepática.
5. Los ratones deficientes en LDLR presentan una regeneración hepática anómala tras el procedimiento quirúrgico de la hepatectomía parcial.
6. Los ratones deficientes en LDLR muestran una disminución significativa de la función hepática en las etapas iniciales del proceso de regeneración tras una PHx.
7. Los ratones deficientes en LDLR presentan una desregulación de los niveles de IL-6, TNF $\alpha$  y HGF hepáticos durante la regeneración hepática.
8. Los ratones deficientes en LDLR muestran una disminución de la expresión hepática de marcadores de ciclo celular.
9. La deficiencia del gen LDL modifica el lipidoma hepático pero no compromete la formación de *lipid droplets*.

10. El hígado en regeneración de los ratones deficientes en LDLR<sup>-/-</sup> presenta una concentración de ésteres de colesterol, colesterol y fosfatidilcolina compatible con un estado quiescente; en contraposición a la composición del lipidoma que predomina en los hígados regenerativos.

Considerando las conclusiones expuestas, nuestros datos sugieren que miR-33 tiene potencialidad terapéutica como modulador de la regeneración hepática en el contexto clínico. Además, creemos que el estudio del lipidoma hepático, previo o inmediatamente posterior a la resección hepática, permitiría prever posibles complicaciones hepáticas en pacientes a los que se les ha practicado una hepatectomía terapéutica.

**ANEXO 1: Modelo de hepatectomía  
parcial**





## ANEXO 1. Modelo de 2/3 hepatectomía parcial en ratón

El modelo de PHx no está asociado a morbilidad ni mortalidad y es muy usado en muchas publicaciones. Tras la pérdida de volumen hepático se inicia inmediatamente la regeneración.

A continuación se detallan diferentes factores determinantes durante el protocolo que pueden afectar a la velocidad de regeneración hepática:

- a) El estado metabólico de los hepatocitos, a su vez determinado por el volumen extraído, afecta a la dinámica de la regeneración hepática y por tanto puede generar variabilidad a los resultados.
- b) Se ha descrito que el tipo de anestesia utilizada también influye en la velocidad de regeneración hepática. El uso de isoflurano produce menos expresión de ALT comparando con otras anestésicas como la ketamina/xilacina o avertina. (Skoulis NP, et. al. Toxicol Appl Pharmacol. 1989).
- c) Está reconocido que la edad es un factor muy importante en la regeneración hepática. Animales jóvenes (de 4 a 6 semanas) restablecen su hígado mucho más deprisa que animales de edad más avanzada. Es por esta razón que se recomienda utilizar ratones de un rango de entre 8 a 14 semanas de vida.
- d) Por lo que respecta al sexo de los animales no afecta al proceso regenerativo. (Naugler WE, et. al. Science. 2007).

### PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Duración aproximada de 20 min.

1. Anestesiarse el ratón dentro de la cámara de inducción con un 2% de isoflurano y 2 litros/min oxígeno, en el caso de ratones salvajes de un peso aproximado de 30g. Después de la anestesia se coloca el animal encima de la mesa de operaciones con anestesia por isoflurano inhalado. Es preferible el uso de manta eléctrica o otra fuente de calor para evitar hipotermia.
2. Se desinfecta la piel con etanol al 70% y se depila la parte abdominal para evitar infecciones.

3. Se realiza una incisión de un centímetro en la piel y en el músculo a la altura del xifoideas.
4. De manera suave y utilizando palitos de algodón húmedos con salino, se mueve el lóbulo medio para poder ver la membrana que une este lóbulo con el diafragma. Utilizando tijeras finas se realiza un corte en esta membrana.
5. Se levanta el lóbulo medio. De igual manera, se mueve el lóbulo izquierdo para dejar ver la membrana que une el lóbulo izquierdo con el lóbulo caudato. Utilizando tijeras de cirugía, se realiza un corte en esta membrana para liberar el lóbulo izquierdo.
6. Se levanta el lóbulo izquierdo y se pasa seda estéril de sutura de 3/0 por la base del lóbulo izquierdo. Se vuelve a poner el lóbulo en su posición normal y se realiza un nudo para cortar la irrigación de este lóbulo.
7. Con tijeras finas se corta el lóbulo izquierdo justo por encima del nudo realizado. Si el nudo está realizado de manera correcta, el animal no debería sangrar.
8. El lóbulo medio está levantado tocando al diafragma o tórax. Se pasa la seda de sutura de 3/0 por debajo del lóbulo medio y se coloca el lóbulo en su posición normal.
9. La seda de sutura debe quedar justo por encima de la vesícula biliar, que será cortada. Este segundo nudo no debe obstruir la vena cava supra hepática.
10. Se realiza el nudo. La sutura por sí sola realiza el corte en el lóbulo medio, dejando un 20-25% de este lóbulo intacto.
11. Tras realizar el nudo, y con tijeras se extrae la parte cortada, dejando la zona limpia.
12. Se limpia la zona abdominal de sangre con palitos de algodón mojados con salina para evitar posibles adhesiones.
13. Es necesario asegurarse que no existe ningún tipo de sangrado.
14. Se sutura el músculo utilizando seda de sutura con aguja curvada de 4/0.
15. Se sutura la piel con el mismo tipo de seda.
16. Tras cerrar el abdomen se desinfecta la zona y se deja el animal en una zona caliente para su recuperación.

## **ANEXO 2: OTRAS PUBLICACIONES**



## ANEXO 2. Otras publicaciones derivadas

- INCREASED NITRIC OXIDE PRODUCTION IN LYMPHATIC ENDOTHELIAL CELLS CAUSES IMPAIRMENT OF LYMPHATIC DRAINAGE IN CIRRHOTIC RATS.

Ribera J, **Pauta M**, Melgar-Lesmes P, Tugues S, Fernández-Varo G, Held KF, Soria G, Tudela R, Planas AM, Fernández-Hernando C, Arroyo V, Jiménez W, Morales-Ruiz M. Gut. 2012 Jan 20.

- INHIBITION OF PLACENTAL GROWTH FACTOR ACTIVITY REDUCES THE SEVERITY OF FIBROSIS, INFLAMMATION, AND PORTAL HYPERTENSION IN CIRRHOTIC MICE.

Steenkiste CV, Ribera J, Geerts A, **Pauta M**, Tugues S, Casteleyn C, Libbrecht L, Olievier K, Schroyen B, Reynaert H, van Grunsven LA, Blomme B, Coulon S, Heindryckx F, De Vos M, Stassen JM, Vinckier S, Altamirano J, Bataller R, Carmeliet P, Van Vlierberghe H, Colle I, Morales-Ruiz M. Hepatology. 2011 May.

- HYPOXIA AND PROINFLAMMATORY UPREGULATE APELIN RECEPTOR EXPRESSION IN HUMAN STELLATE CELLS AND HEPATOCYTES

Melgar-Lesmes P, **Pauta M**, Reichenbach V, Casals G, Ros J, Bataller R, Morales-Ruiz M, Jiménez W. Gut. 2011 Mar.

- APELIN MEDIATES THE INDUCTION OF PROFIBROGENIC GENES IN HUMAN HEPATIC STELLATE CELLS.

Melgar-Lesmes P, Casals G, **Pauta M**, Ros J, Reichenbach V, Bataller R, Morales-Ruiz M, Jimenez W. Endocrinology. 2010 Sep 15.

- INACTIVATION OF EXTRAHEPATIC VASCULAR AKT IMPROVES SYSTEMIC HEMODYNAMICS AND SODIUM EXCRETION IN CIRRHOTIC RATS.

Fernández-Varo G, Melgar-Lesmes P, Casals G, **Pauta M**, Arroyo V, Morales-Ruiz M, Ros J, Jiménez W. J Hepatol. 2010 Aug 3.



## **BIBLIOGRAFIA**





## BIBLIOGRAFIA

- Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM. Antibodies to tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol.* 1992. G579-85.
- Alison MR, Poulson R, Forbes SJ. Update on hepatic stem cells. *Liver.* 2001. 21(6):367-73.
- Ambros V. The functions of animal microRNA. *Nature.* 2004., 431 (7006): 350-5.
- Assoian RK, Zhu X. Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol.* 1997, 9(1):93-8.
- Bège T, Le Treut YP, Hardwigsen J, Ananian P, Richa H, Campan P, Garcia S. Prognostic factors after resection for hepatocellular carcinoma in nonfibrotic or moderately fibrotic liver. A 116-case European series. *J Gastrointest Surg.* 2007;11(5):619-25.
- Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF, Krishna MK, Ludwig J, Nagorney DM. Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg.* 1998; 2(3):292-8.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet.* 2003 35(3):215-7.
- Besler C, Lüscher TF, Landmesser U. Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med.* 2012;4(4):251-68.
- Block GD, Locker J, Bowen WC, Petersen BE, Katyal S, Strom SC, Riley T, Howard TA, Michalopoulos GK. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF  $\alpha$  in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol.* 1996. 132(6):1133-49.

- Bocchetta M, Bruscalupi G, Castellano F, Trentalance A, Komaromy M, Fong LG, Cooper AD. Early induction of LDL receptor gene during rat liver regeneration. *J Cell Physiol.* 1993.156(3):601-9.
- Borowiak M, Garratt AN, Wüstefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004.101(29):10608-13.
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997. 89(3):331-40.
- Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Hörsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell.* 1998 Nov;2(5):559-69.
- Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta.* 2011. 12(5):592-601
- Castro RE, Ferreira DM, Zhang X, Borralho PM, Sarver AL, Zeng Y, Steer CJ, Kren BT, Rodrigues CM. Identification of microRNAs during rat liver regeneration after partial hepatectomy and modulation by ursodeoxycholic acid. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010. 299(4):G887-97.
- Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Suárez Y. MicroRNAs as pharmacological targets in endothelial cell function and dysfunction. *Pharmacol Res.* 2013., S1043-6618(13)00070-4.
- Chari RS, Price DT, Sue SR, Meyers WC, Jirtle RL. Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration. *Am J Surg.* 1995;169(1):126-31;
- Coroneos E, Martinez M, McKenna S, Kester M. Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines. Implications for cellular proliferation and differentiation. *J Biol Chem.* 1995; 270(40):23305-9.

- Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*. 1996 Nov 22;274(5291):1379-83.
- Cruise JL, Houck KA, Michalopoulos GK. Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha 1 adrenoreceptor by norepinephrine. *Science*. 1985; 227(4688):749-51.
- Currier AR, Sabla G, Locaputo S, Melin-Aldana H, Degen JL, Bezerra JA. Plasminogen directs the pleiotropic effects of uPA in liver injury and repair. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003. 284(3):G508-15.
- Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW Jr, Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci*. 2009.5(5):474-88.
- DeAngelis RA, Markiewski MM, Taub R, Lambris JD. A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha. *Hepatology*. 2005. 42(5):1148-57.
- Delgado-Coello B, Briones-Orta MA, Macías-Silva M, Mas-Oliva J. Cholesterol: recapitulation of its active role during liver regeneration. *Liver Int*. 2011.31(9):1271-84.
- Deliconstantinos G, Ramantanis G. Alterations in the activities of hepatic plasma-membrane and microsomal enzymes during liver regeneration. *Biochem J*. 1983.15;212(2):445-52.
- Diehl AM, Yin M, Fleckenstein J, Yang SQ, Lin HZ, Brenner DA, Westwick J, Bagby G, Nelson S. Tumor necrosis factor-alpha induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am J Physiol*. 1994.
- Espenshade PJ. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J Cell Sci*. 2006.119(Pt 6):973-6.
- Evarts RP, Hu Z, Omori N, Omori M, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Precursor-product relationship between oval cells and

- hepatocytes: comparison between tritiated thymidine and bromodeoxyuridine as tracers. *Carcinogenesis*. 1996.17(10):2143-51.
- Farmer DG, Rosove MH, Shaked A, Busuttil RW. Current treatment modalities for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*. 1994; 219(3):236-47.
  - Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *J. Hepatol.*, 2012. 57(3):692-4.
  - Fernández MA, Albor C, Ingelmo-Torres M, Nixon SJ, Ferguson C, Kurzchalia T, Tebar F, Enrich C, Parton RG, Pol A. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science*. 2006.15; 313(5793):1628-32.
  - Fielding CJ, Fielding PE Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res*. 1997; 38(8):1503-21.
  - Fisher RP. The CDK Network: Linking Cycles of Cell Division and Gene Expression. *Genes Cancer*. 2012; 3(11-12):731-8.
  - Frank PG, Lisanti MP. Caveolin-1 and liver regeneration: role in proliferation and lipogenesis. *Cell Cycle*. 2007.15;6(2):115-6.
  - Freimuth J, Bangen JM, Lambertz D, Hu W, Nevzorova YA, Sonntag R, Gassler N, Riethmacher D, Trautwein C, Liedtke C. Loss of caspase-8 in hepatocytes accelerates the onset of liver regeneration in mice through premature NF- $\kappa$ B activation. *Hepatology*. 2013.
  - Fujiwara K, Nagoshi S, Ohno A, Hirata K, Ohta Y, Mochida S, Tomiya T, Higashio K, Kurokawa K. Stimulation of liver growth by exogenous human hepatocyte growth factor in normal and partially hepatectomized rats. *Hepatology*. 1993. 18(6):1443-9.
  - Futema M, Whittall RA, Kiley A, Steel LK, Cooper JA, Badmus E, Leigh SE, Karpe F, Neil HA; Simon Broome Register Group. Analysis of the frequency and spectrum of mutations recognised to cause familial hypercholesterolaemia in routine clinical practice in a UK specialist hospital lipid clinic. *Atherosclerosis*. 2013.18. S0021-9150(13)00251.
  - Galun E, Rose-John S. The regenerative activity of interleukin-6. *Methods Mol Biol*. 2013;982:59-77.

- Gallinger S, Biagi JJ, Fletcher GG, Nhan C, Ruo L, McLeod RS. Liver resection for colorectal cancer metastases. *Curr Oncol.* 2013; 20(3):e255-65.
- Garcea G, Maddern GJ. Liver failure after major hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2009; 16(2):145-55.
- García-Arcos I, González-Kother P, Aspichueta P, Rueda Y, Ochoa B, Fresnedo O. Lipid analysis reveals quiescent and regenerating liver-specific populations of lipid droplets. *Lipids.* 2010.45(12):1101-8.
- Garden OJ, Rees M, Poston GJ, Mirza D, Saunders M, Ledermann J, Primrose JN, Parks RW. Guidelines for resection of colorectal cancer liver metastases. *Gut.* 2006; 55 Suppl 3:iii1-8.
- Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, Vinson C, Eckhaus M, Reitman ML. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest.* 2000.105(3):271-8.
- Gazit V, Weymann A, Hartman E, Finck BN, Hruz PW, Tzekov A, Rudnick DA. Liver regeneration is impaired in lipodystrophic fatty liver dystrophy mice. *Hepatology.* 2010. 52(6):2109-17.
- Guilherme A, Emoto M, Buxton JM, Bose S, Sabini R, Theurkauf WE, Leszyk J, Czech MP. Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2000.8;275(49):38151-9.
- Gupta NA, Mells J, Dunham RM, Grakoui A, Handy J, Saxena NK, Anania FA. Glucagon-like peptide-1 receptor is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing hepatic steatosis in vitro by modulating elements of the insulin signaling pathway. *Hepatology.* 2010. 51(5):1584-92.
- Hand NJ, Master ZR, Le Lay J, Friedman JR. Hepatic function is preserved in the absence of mature microRNAs. *Hepatology.* 2009. 49(2):618-26.
- Hanse EA, Nelsen CJ, Goggin MM, Anttila CK, Mullany LK, Berthet C, Kaldis P, Crary GS, Kuriyama R, Albrecht JH. Cdk2 plays a

- critical role in hepatocyte cell cycle progression and survival in the setting of cyclin D1 expression in vivo. *Cell Cycle*. 2009. 8(17):2802-9.
- Hecht N, Pappo O, Shouval D, Rose-John S, Galun E, Axelrod JH. Hyper-IL-6 gene therapy reverses fulminant hepatic failure. *Mol Ther*. 2001; 3(5 Pt 1):683-7.
  - Herrera-Merchan A, Cerrato C, Luengo G, Dominguez O, Piris MA, Serrano M, Gonzalez S. miR-33-mediated downregulation of p53 controls hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Cycle*. 2010 15;9(16):3277-85.
  - Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver, Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*. 1931;12:186–202.
  - Hovingh GK, de Groot E, van der Steeg W, Boekholdt SM, Hutten BA, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2005 16(2):139-45.
  - Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS. Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell*. 1996; 87(3):415-26.
  - Hua X, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL. Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*. 1996;271(17):10379-84.
  - Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, Dong B, Huang X, Moore DD. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science*. 2006 ;312(5771):233-6.
  - Huh CG, Factor VM, Sánchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. 101(13):4477-82.

- Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002., 297(5589):2056-60.
- International Agency for Research on Cancer. Cancer incidence and mortality worldwide in 2008 (GLOBOCAN 2008). Available:<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/liver.asp>. Consultado Junio del 2013.
- Jakowlew SB, Mead JE, Danielpour D, Wu J, Roberts AB, Fausto N. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in rat liver regeneration: messenger RNA expression and activation of latent TGF-beta. *Cell Regul*. 1991 ;2(7):535-48.
- Janowski BA. The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(20):12675-80
- Jauhainen M, Dolphin PJ. Human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. An elucidation of the catalytic mechanism. *J Biol Chem*. 1986,25;261(15):7032-43.
- Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, Pavletich NP. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*. 1995., 376(6538):313-20.
- Kaibori M, Inoue T, Sakakura Y, Oda M, Nagahama T, Kwon AH, Kamiyama Y, Miyazawa K, Okumura T. Impairment of activation of hepatocyte growth factor precursor into its mature form in rats with liver cirrhosis. *J Surg Res*. 2002; 106(1):108-14.
- Kam I, Lynch S, Svanas G, Todo S, Polimeno L, Francavilla A, Penkrot RJ, Takaya S, Ericzon BG, Starzl TE, et al. Evidence that host size determines liver size: studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. *Hepatology*. 1987.7(2):362-6.
- Kassim SH, Wilson JM, Rader DJ. Gene therapy for dyslipidemia: a review of gene replacement and gene inhibition strategies. *Clin Lipidol*. 2010;5(6):793-809.



- Kawasaki H, Onuki R, Suyama E, Taira K. Identification of genes that function in the TNF $\alpha$ -mediated apoptotic pathway using randomized hybrid ribozyme libraries. *Nat Biotechnol.* 2002. 20(4):376-80.)
- Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology.* 2000. 31(1):75-82.
- Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA., Liver regeneration. *J. Am. Coll. Surg.*,2003. 197(4):634-59.
- Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet.*, 2002. 30(4):363-4.
- Latasa MU, Couton D, Charvet C, Lafanechère A, Guidotti JE, Li Z, Tuil D, Daegelen D, Mitchell C, Gilgenkrantz H. Delayed liver regeneration in mice lacking liver serum response factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2007. 292(4):G996-G1001.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993., 75(5):843-54.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004., 23(20):4051-60.
- Leclercq IA, Field J, Farrell GC. Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in *ob/ob* mice after toxic injury. *Gastroenterology.* 2003.124(5):1451-64.
- Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther B, Tian Y, Jochum W, Gaget C, Bader M, Clavien P. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science.* 2006; 312:104–107.
- Levade T, Jaffrézou JP. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys Acta.* 1999. 1438(1):1-17.

- Li J, Campbell JS, Mitchell C, McMahan RS, Yu X, Riehle KJ, Bumgarner RE, Fausto N. Relationships between deficits in tissue mass and transcriptional programs after partial hepatectomy in mice. *Am J Pathol.*, 2009. 175(3):947-57.
- Lindroos PM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology*. 1991. 13(4):743-50.
- Lo Sasso G, Celli N, Caboni M, Murzilli S, Salvatore L, Morgano A, Vacca M, Pagliani T, Parini P, Moschetta A. Down-regulation of the LXR transcriptome provides the requisite cholesterol levels to proliferating hepatocytes. *Hepatology*. 2010. 51(4):1334-44.
- Mayoral R, Fernández-Martínez A, Roy R, Boscá L, Martín-Sanz P. Dispensability and dynamics of caveolin-1 during liver regeneration and in isolated hepatic cells. *Hepatology*. 2007. 46(3):813-22.
- Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldán A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. 107(27):12228-32.
- Martínez-Botas J, Suárez Y, Ferruelo AJ, Gómez-Coronado D, Lasuncion MA. Cholesterol starvation decreases p34(cdc2) kinase activity and arrests the cell cycle at G2. *FASEB J*. 1999. 13(11):1359-70.
- Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004. 431(7006):343-9.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science*. 1997., 276(5309):60-6.
- Michalopoulos G.K. Liver regeneration. *J Cell Physiol*, 2007. 213(2):286-300
- Mitchell C, Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. 2008. 3(7):1167-70.

- Mohammed FF, Pennington CJ, Kassiri Z, Rubin JS, Soloway PD, Ruther U, Edwards DR, Khokha R. Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration. *Hepatology*. 2005. 41(4):857-67.
- Mohammed FF, Khokha R. Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends Cell Biol*. 2005; 15(10):555-63.
- Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y, Kohno H, Nakamura T. Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Ann Surg*. 1987; 206(1):30-9.
- Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, Näär AM. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science*. 2010.328(5985):1566-9.
- Nakakuki M, Shimano H, Inoue N, Tamura M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Yahagi N, Toyoshima H, Sato R, Yamada N. A transcription factor of lipid synthesis, sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a causes G(1) cell-cycle arrest after accumulation of cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitors. *FEBS J*. 2007. 274(17):4440-52.
- Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology*. 2000;32(2):247-55.
- Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, et al. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J*. 1991.10(10):2867-78.
- Nelsen CJ, Rickheim DG, Tucker MM, Hansen LK, Albrecht JH. Evidence that cyclin D1 mediates both growth and proliferation downstream of TOR in hepatocytes. *J Biol Chem*. 2003; 278(6):3656-63.

- Newberry EP, Kennedy SM, Xie Y, Luo J, Stanley SE, Semenkovich CF, Crooke RM, Graham MJ, Davidson NO. Altered hepatic triglyceride content after partial hepatectomy without impaired liver regeneration in multiple murine genetic models. *Hepatology*. 2008.48(4):1097-105.
- Ni N, Yager JD. Comitogenic effects of estrogens on DNA synthesis induced by various growth factors in cultured female rat hepatocytes. *Hepatology*. 1994;19(1):183-92.
- Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:441-70.
- Nurse P. Checkpoint pathways come of age. *Cell*. 1997. 91: 865-7.
- Oe S, Lemmer ER, Conner EA, Factor VM, Levéen P, Larsson J, Karlsson S, Thorgeirsson SS. Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice. *Hepatology*. 2004.40(5):1098-105.
- Olle EW, Ren X, McClintock SD, Warner RL, Deogracias MP, Johnson KJ, Colletti LM. Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*. 2006. 44(3):540-9.
- Osawa Y, Uchinami H, Bielawski J, Schwabe RF, Hannun YA, Brenner DA. Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem*. 2005.280(30):27879-87.
- Paranjpe S, Bowen WC, Bell AW, Nejak-Bowen K, Luo JH, Michalopoulos GK. Cell cycle effects resulting from inhibition of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in regenerating rat livers by RNA interference. *Hepatology*. 2007.45(6):1471-7.
- Picard C, Lambotte L, Starkel P, Sempoux C, Saliez A, Van den Berge V, Horsmans Y. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol*. 2002. 36(5):645-52.

- Patijn GA, Lieber A, Schowalter DB, Schwall R, Kay MA. Hepatocyte growth factor induces hepatocyte proliferation in vivo and allows for efficient retroviral-mediated genetransfer in mice. *Hepatology*. 1998. 28(3):707-16.
- Pawlik TM, Schulick RD, Choti MA. Expanding criteria for resectability of colorectal liver metastases. *Oncologist*. 2008; 13(1):51-64.
- Pines J. Cyclins: wheels within wheels. *Cell Growth Differ*. 1991. 2(6):305-10.
- Power C, Rasko JE. Whither prometheus' liver? Greek myth and the science of regeneration. 2008., 149(6):421-6.
- Rao MS, Papreddy K, Abecassis M, Hashimoto T. Regeneration of liver with marked fatty change following partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci*. 2001. 46(9):1821-6.
- Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Fisher EA, Moore KJ, Fernández-Hernando C. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*. 2010. 328(5985):1570-3.
- Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, van Gils JM, Rayner AJ, Chang AN, Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Fisher EA, Moore KJ. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2011. 121(7):2921-31
- Rayner KJ, Fernandez-Hernando C, Moore KJ. MicroRNAs regulating lipid metabolism in atherogenesis. *Thromb Haemost*. 2012. 107(4):642-7.
- Rivadeneira DB, Mayhew CN, Thangavel C, Sotillo E, Reed CA, Graña X, Knudsen ES. Proliferative suppression by CDK4/6 inhibition: complex function of the retinoblastoma pathway in liver tissue and hepatoma cells. *Gastroenterology*. 2010 May;138(5):1920-30. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.007. Epub 2010 Jan 25.

- Rudnick DA, Davidson NO. Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration. *Int J Hepatol.* 2012. 2012;549241.
- Russell WE, Coffey RJ Jr, Ouellette AJ, Moses HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul;85(14):5126-30.
- Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995. 28;92(7):2572-6.
- Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell.* 1996;85(7):1037-46.
- Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, Demetris AJ. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology.* 1999.29(2):403-11.
- Sakurai F, Furukawa N, Higuchi M, Okamoto S, Ono K, Yoshida T, Kondoh M, Yagi K, Sakamoto N, Katayama K, Mizuguchi H. Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a. *Virus Res.* 2012;165(2):214-8.
- Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol.* 1998.,35(6):461-78.
- Scheele J, Altendorf-Hofmann A. Resection of colorectal liver metastases. *Langenbecks Arch Surg.* 1999; 384(4):313-27.
- Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology.* 2000; 31(1):35-42.

- Shteyer E, Liao Y, Muglia LJ, Hruz PW, Rudnick DA. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology*. 2004;40(6):1322-32.
- Simmonds PC, Primrose JN, Colquitt JL, Garden OJ, Poston GJ, Rees M. Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies. *Br J Cancer*. 2006; 94(7):982-99.
- Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):219-30.
- Streetz KL, Luedde T, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut*. 2000. 47(2):309-12.
- Stolz DB, Mars WM, Petersen BE, Kim TH, Michalopoulos GK. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res*. 1999;59:3954–3960
- Song G, Sharma AD, Roll GR, Ng R, Lee AY, Blelloch RH, Frandsen NM, Willenbring H. MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology*. 2010. 51(5):1735-43.
- Song P, Tobe RG, Inagaki Y, Kokudo N, Hasegawa K, Sugawara Y, Tang W. Song P, Tobe RG, Inagaki Y, Kokudo N, Hasegawa K, Sugawara Y, Tang W. *Liver Int*. 2012; 32(7):1053-63.
- Sun CK, Zhang XY, Zimmermann A, Davis G, Wheatley AM. Effect of ischemia-reperfusion injury on the microcirculation of the steatotic liver of the Zucker rat. *Transplantation*. 2001; 72(10):1625-31.
- Takenaka K, Kanematsu T, Fukuzawa K, Sugimachi K. Can hepatic failure after surgery for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients be prevented? *World J Surg*. 1990; 14(1):123-7.
- Taub. R., Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004. 5(10):836-47. Review.
- Thatcher EJ, Paydar I, Anderson KK, Patton JG. Regulation of zebrafish fin regeneration by microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 25;105(47):18384-9.

- Thevananther S. Adipose to the rescue: peripheral fat fuels liver regeneration. *Hepatology.*, 2010. 52(6):1875-6.
- Tiberio GA, Tiberio L, Benetti A, Cervi E, Montani N, Dreano M, Garotta G, Cerea K, Steimberg N, Pandolfo G, Ferrari-Bravo A, Mazzoleni G, Giulini SM, Schiaffonati L. IL-6 Promotes compensatory liver regeneration in cirrhotic rat after partial hepatectomy. *Cytokine.* 2008; 42(3):372-8.
- Tiniakos DG, Kandilis A, Geller SA. Tityus: a forgotten myth of liver regeneration. *J. hepatol.*, 2010. 53(2):357-61.
- Tomassoni ML, Albi E, Magni MV. Changes of nuclear membrane fluidity during rat liver regeneration. *Biochem Mol Biol Int.* 1999.47(6):1049-59.
- Van den Broek MA, Olde Damink SW, Dejong CH, Lang H, Malagó M, Jalan R, Saner FH. Liver failure after partial hepatic resection: definition, pathophysiology, risk factors and treatment. *Liver Int.* 2008; 28(6):767-80.
- Van Thiel DH, Gavaler JS, Kam I, Francavilla A, Polimeno L, Schade RR, Smith J, Diven W, Penkrot RJ, Starzl TE. Rapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. *Gastroenterology.* 1987.,93(6):1414-9.
- Víctor Cortés, Tatiana Vásquez, Antonio Arteaga, Flavio Nervi, Attilio Rigotti. Rememorando la contribución de Goldstein y Brown al estudio del metabolismo del colesterol: a un cuarto de siglo del Premio Nobel de Medicina. *Rev Med Chile* 2012; 140: 1053-1059
- Waga S, Li R, Stillman B. p53-induced p21 controls DNA replication. *Leukemia.* 1997., 11 Suppl 3:321-3.
- Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Pediaditakis P, Johnson C, Bell A, Michalopoulos GK, Zarnegar R. A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell.* 2002 Feb;9(2):411-21.
- Wang XW, Heegaard NH, Orum H. MicroRNAs in liver disease. *Gastroenterology.* 2012. 142(7):1431-43.



- Webber EM, Bruix J, Pierce RH, Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology*. 1998, 1226-34.
- Weymann A, Hartman E, Gazit V, Wang C, Glauber M, Turmelle Y, Rudnick DA. p21 is required for dextrose-mediated inhibition of mouse liver regeneration. *Hepatology*. 2009. 50(1):207-15.
- Yang SQ, Lin HZ, Mandal AK, Huang J, Diehl AM. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. *Hepatology*. 2001. 34(4 Pt 1):694-706.
- Yamauchi H, Uetsuka K, Okada T, Nakayama H, Doi K. Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in db/db mice. *Exp Toxicol Pathol*. 2003. 54(4):281-6.
- Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 ;94(4):1441-6.
- Yamada Y, Fausto N. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am J Pathol*. 1998;152:1577–1589.
- Yamanaka N, Okamoto E, Kawamura E, Kato T, Oriyama T, Fujimoto J, Furukawa K, Tanaka T, Tomoda F, Tanaka W. Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function. *Hepatology*. 1993; 18(1):79-85.
- Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The Long and Short of MicroRNA. *Cell*. 2013.,153(3):516-9.
- Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J, Tremblay M, Jacques H, Jin W, Davignon J, Seidah NG, Prat A. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and

critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology*. 2008. 48(2):646-54.

- Zaret KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet*. 2002; 3(7):499-512.
- Zhang BH, Weltman M, Farrell GC. Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999. 14(2):133-7.
- Zhao G, Nakano K, Chijiwa K, Ueda J, Tanaka M. Inhibited activities in CCAAT/enhancer-binding protein, activating protein-1 and cyclins after hepatectomy in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 292(2):474-81.



## Agraïments

Tot i que aquesta tesis esta escrita en castellà els agraïments el escriure en català, que es com m'expresso millor.

Fa quasibé 6 anys que vaig començar aquest nou repte i durant tot aquest temps m'he creuat amb moltíssima gent que m'ha donat suport i consell, i m'ha ensenyat molt, espero no deixar-me ningú.

En primer lloc vull agrair aquesta tesis al meu director de tesis, al Dr. Manuel Morales, especialista servei de Bioquímica i Genètica Molecular, per tots aquest anys. “ *Gracias Manuel por tu tiempo, por ser tan cercano y tener siempre un momento para escucharnos, por tu ayuda y todo tu tiempo dedicado a nosotros, aprecio mucho tu preocupación y todos los consejos que nos has dado para que podamos crecer profesionalmente*”.

Al Dr. Wladimiro Jiménez, cap del servei de Bioquímica i Genètica Molecular, per donar-me l'oportunitat de formar part del grup d'investigació com a becaria FPI, per tot el recolzament, per tots els seus consells, que tant a nivell professional com personal m'han ajudat molt, i per totes les ajudes que m'ha aportat entre les quals esta l'ajuda de la impressió d'aquestes tesis. També voldria donar-li les gràcies per l'oportunitat de seguir treballant en aquest grup i per confiar en mi.

Voldria agrair aquesta tesis al Dr. Carlos Fernandez Hernando per donar-me la oportunitat de fer una estada en el seu laboratori. “ *Gracias Carlos por tu confianza, tu ayuda y tu exigencia. Durante mi estancia en tu laboratorio aprendí mucho, conseguí sacar adelante estos dos proyectos y volví a creer en la ciencia. Te agradezco tu ayuda a nivel profesional, como personal y tu buen humor en el laboratorio*”.

De la època “IDIBAPS” també tinc molta gent que ha passat per nostre “lab patera”, tal com l'anomenava el Dr. Bataller, que no vull deixar de nombrar. En primer lloc a la Sònia Tugues que amb les seves “provatures” i entre corredisses pels passadissos y els seus estats pre-tèsics ens va ensenyar molt i amb molta paciència ens explicava les tècniques a dos becaris acabats d'arribar. Gràcies Sònia per totes aquelles estones de “farts de riure” i els teus “ui ui ui” quant el Jordi i jo la “pifiavam”. Al Javier per sempre la seva amabilitat i per les seves converses. Ells sempre posant l'orella, jeje.

A la Raquel, gràcies per tots els seus consells i per ficar seny i ser tant transparent i sincera. Al Marcos, per estar sempre tant amable i amb ganes de donar un cop de mà. A la “Nitin” per moltes converses i per moltes estones de consells i per entendre en moltes coses, sobretot en tema professional. Durant una època difícil per mi vaig coincidir molt amb la Esther Titos en el citòmetre (recordes Esther, quantes tardes allà juntes?). Va ser quan vaig tindre l'oportunitat de conèixer a una persona fantàstica, i molt dolça, a la qual admiro moltíssim. Ella em va ensenyar el significat de la paraula “companyerisme”, “*Esther ets per mi una gran amiga, companya i*

*una persona de confiança. Gràcies per tots els teus consells i per aquelles abraçades i somriures que ens dones, encara que tu tinguis un mal dia. A més gràcies ara pels consells de “mami” a “nova mami”.*

Parlant de citòmetre m'ha vingut a la ment tota la ajuda de la Isabel Crespo de la Unitat de Citometria. I tota la companyia de la gent que coincidíem a cultius; el Dani i la Mari de UTR.

També a la tècnic del Manuel, la Cris, per tots els seus consells i per escoltar-me durant les estones d'espera.

Encara que va ser fugaç, vam estar un temps amb la Laura, i encara que va ser curta la seva estada amb nosaltres vam viure moltes estones bones els tres.

Durant aquesta època també vaig conèixer a la Evis. Amb ella em compartit murphys i em patit precarietats, vam coincidir d'estança fora i ara tanquem aquesta etapa juntes. “Evis, et trobaré molt a faltar, tota la teva energia, els crits de “*mungeeta*” pel passadís, totes aquelles estones de riures, de confidències i la teva espontaneïtat. Ara toca que tallis ja amb el senyor Murphy i no t'estressis.. “keep calm and pas a pas, te'n sortiràs!! “

Al Pedrin, “*pedrito grillo, gracias por toda tu ayuda en el laboratorio y por enseñarme muchas técnicas. Además a ti te debo mi apodo. Gracias Pedritin por tu confianza, por esos ratos de risas, y por estar a mi lado cuando el trabajo se me desbordaba. Fuiste gran compañero y te agradezco en intentar que crea más en mí. Espero que Boston te trate bien*”.

A la Pepa, gràcies per la teva ajuda com a companya de grup, per tota l'organització i escriptura de protocols i per aquella famosa frase “*a les nou baixa la guillotina!*”. Gràcies al teu ordre i les teves normes vam aconseguir fer aïllaments sense contaminacions i ara tindré't com a *lab manager* es genial! Som la enveja del CEK. Mil gràcies per ajudar-nos tant.

A tots els veïns de laboratori, sobretot a la Cris Millan, que amb molta paciència ens deixava utilitzar moltes coses del seu lab, i ens ha ensenyat i aconsellat.

A tots ells i en especial al Jordi els hi he de demanar disculpes. Vaig passar una època molt dolenta, entre tesis, màster, angles i carnet.. i no us mereixíeu patir el meu mal humor. Perdó! “perdón, no volvera a ocurrir”.

Durant aquesta mala època vaig rebre molt el recolzament de la meva amiga de la infància, la Glòria qui es creu que soc una crack.. jeje. M'has valorat molt i sempre has sigut un pilar en la meva vida. Gràcies per ajudar-me a no tirar la tovallola.

A la meva amiga des de la carrera, la Nu, que a més ha sigut companya de màster i que ja es doctora! , agrair-te les estones compartides durant tot aquest temps, tant a dins el laboratori, com fora. Tots els cafès de teràpia on la teva opinió i el teu punt de vista per mi ha valgut molt.

A les noves incorporacions i aire fresc que vam rebre; L'Uri i la Silvia amb els que em compartit moltes estones fora del laboratori; festes, sopar i també gym! El temps ens ha anat separant una mica i ara cada cop coincidim

menys, però sou per mi uns grans companys i una teràpia anti-estrès! M'encanta el vostre humor i lo propers i carinyosos que sou amb mi, assissipp!! A la Bibiot (enhorabona per la nova etapa que començaràs!) gràcies per aquelles bones estones que vam passar a IDIBAPS, per les festes i sopars! Al Truja, Borjot! De la comissió de "festes" , gràcies per totes aquelles birres terapèutiques i per aquells plans de futur que van quedar en el bar. Admiro la teva valentia a fer la teva vida i fer el que et dicta el cap i la teva balança de valors. Se que t'anirà molt be, ets un tio collonut i un gran amic. No t'oblidis de mi, eh!?

El fet de mudar-nos al CEK ha fet que pugui apropar-me més a conèixer el Guillermo a qui he d'agrair els seus consells i la seva ajuda.

He de fer extens aquest agraïments al Santi i al Gregori, companys de grup.

A la Verito i la Cris, gracies sempre pels vostres somriures!

Als veïns de planta i amics; Clara, gràcies per compartir aquesta època pretesica i Helen per totes aquelles estones que vam viure juntes a NY!

Al Pau, Mar, Dani i Delia, per rebrem sempre de bon humor quan us vinc a visitar a la vostra ala.

A la gent del "Carlos Lab", encara que vaig estar només 9 mesos vaig emportar-me amics i molts bons records. Els he d'agrair a tots la seva benvinguda i la seva ajuda. Al Alessandro i Amarylis per la seva ajuda amb els ratolins, el Binod, pel seu bon humor, a l' Elisa pels seus consells i la Leigh pels seus somriures.

Al Dani, maquinote!! Entre els dos hem aconseguit fer la tesis! Gràcies per posar-nos la musiquilla teva en el laboratori, tot el teu bon humor i totes les festes...sobretot la última. Ets genial. Aran a tu agrair-te tots els consells a nivell personal i professional que m'has donat. T'admiro un munt com a professional i se que t'anirà molt be! "*y espero no perder el contacto contigo! Porque ole tuuu! ole tu!*"

A Frances, "*a ti Frances te tengo que agradecer mil cosas, entre ellas todas esas horas y horas en la sala de cirugía y tu ayuda incondicional, los madrugones para llegar al lab a las 6 de la mañana, y todas esas horas que me regalaste en las que me abriste tu corazón. Me llevo de ti una verdadera amistad. Aunque estemos lejos, sabes que me acuerdo mucho de ti y aunque todos sea un crical estaremos en contacto!*"

I a tu Noe, mil milons de gràcies per tot, entre altres la mudança que entre les dos vam fer juntes, les mil hores amb els animals, tot i la teva al·lèrgia. Ets per mi una persona a admirar, "curranta" i "fiestera" i sempre de bon humor. Ets una gran amiga i espero que encara que estiguis a molts Km de distancia no t'oblidis mai de mi. T'estimo molt, i es que et fas estimar! No canviis mai Rotlli.

Als meus companys i amics. A la Vedri, tot i que al principi no coincidíem tant, em fet el camí juntes i sempre has sigut una bona orella. Ara es companya del Cek i una gran amiga. A la Denise per la seva força, motivació i empena i per la seva sinceritat. Ets exemple de companyerisme i voluntat. Amb poc temps has passat de ser companya a amiga. Se que t'anirà molt be

Denise. Al Jon, company i amic, gràcies per tots els consells i ajuda, sobretot ara per la correcció i muntatge de la tesis. Mil gràcies pel teu temps i visca las “fricadas”!.

A la Cris, estudiant de màster, tot i que només ha estat pocs mesos ens ha ajudat molt. Gràcies per ser tant transparent i tant treballadora.

A tu Jordi t’he deixat pel casi final perquè ets la persona amb qui he compartit tot aquests anys, 6! I es difícil escriure i reflexar en paraules totes les coses i sentiments que em venen a la ment. Em compartit moltes estones de nervis, de ràbies, d’odis... i de imaginar-nos mil històries totalment surrealistes. Has sigut sempre molt bon company, mai m’has negat la teva ajuda. Recordes amb els walkis? “ *Jorge.. pots portar-me... ??*” jeje. Ets una persona molt especial i has fet que l’ambient del laboratori sigui distés, n’has dites de molt grans! em rigut molt i també l’hem liat molt. M’emporto de tu una amistat que encara que el temps la refredi tindré molt bon record d’aquests a anys junts. Gràcies Jordi per tots aquests anys i creu-me que si el destí ens separa, et trobaré molt, molt, molt a faltar.

Finalment a les meves amigues “les meves nenes” que sempre han estat allà per escoltar les meves penes i alegries, a l’Anna, la Nu i la Gemma que també han viscut el mateix i m’han entès. A més gràcies per vindre a visitar-me a NY. Us estimo molt pets pudents! I a tots els de “ la uni”, sou una gran colla!

A la meva família; la meva tieta, les meves germanes i els meus pares pel seu recolzament i els seus consells. Gràcies pares per escoltar-me sempre tots els rotllos, aconsellar-me i mantindrem en calma. Gràcies per creure tant en mi, m’ha donat la força per seguir, fins i tot l’època que ho donava tot per perdut. Sou vosaltres exemple de voluntat i força.

Al meu bebe, la Oreó que em va fer molta companyia les tardes i “findes” de lectura/ escriptura.

Finalment a tu Aaró, t’he d’agrair tota la teva paciència tots aquests anys, els teus consells i el aconseguir que no tiri la tovallola i per fer-me veure les coses des del punt de vista lògic. A més gràcies per ajudar-me i recolzar-me quan vaig marxar d’estança. Sempre has estat al meu cantó i mil gràcies per ajudar-me en la escriptura de la tesis. Per suportar que tingui toots els articles sobre la taula durant aquest mesos. Tal com et vaig dir el dia de la nostra boda, no hagués trobat persona millor per compartir la meva vida. Ara ens espera una nova etapa en la que no estarem gens avorrits! M’alegro molt ser al teu cantó.

Mil gràcies a tots els que hem compartit aquest camí.