



universidad
de león

Departamento de Ciencias Biomédicas
Área de Fisiología

Potencial terapéutico de la melatonina en la
fibrosis hepática: estudios *in vivo* e *in vitro* de
los mecanismos moleculares implicados

“Therapeutic potential of melatonin in hepatic fibrosis: *in vivo*
and *in vitro* studies of the molecular mechanisms involved”



**Memoria presentada por la Graduada en Biología Bárbara González Fernández para
la obtención del grado de Doctora por la Universidad de León**

León 2019



universidad
de león

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(Art. 13.2 del R.D. 99/2011)

La Dra. Dña. María Jesús Tuñón González y la Dra. Dña. Beatriz San Miguel de Vega, Directoras de la Tesis Doctoral titulada “Potencial terapéutico de la melatonina en la fibrosis hepática: estudios *in vivo* e *in vitro* de los mecanismos moleculares implicados” realizada por la Graduada Dña. Bárbara González Fernández, en el programa de doctorado en Biomedicina y Ciencias de la Salud, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, para dar cumplimiento al Art. 13.2 del R.D. 99/2011, en León a ____ de ____ de 2019.

Las directoras de la Tesis Doctoral

Fdo: Dra. María Jesús Tuñón González

Fdo: Dra. Beatriz San Miguel de Vega



universidad
de león

ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

(Art. 13.2 del R.D.99/2011)

La Comisión Académica del programa de doctorado en Biomedicina y Ciencias de la Salud en su reunión celebrada el día ___ de _____ de 2019 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Potencial terapéutico de la melatonina en la fibrosis hepática: estudios *in vivo* e *in vitro* de los mecanismos moleculares implicados”, dirigida por las Dras. Dña. María Jesús Tuñón González y Dña. Beatriz San Miguel de Vega, y elaborada por la Graduada Dña. Bárbara González Fernández, cuyo título en inglés es el siguiente “Therapeutic potential of melatonin in hepatic fibrosis: *in vivo* and *in vitro* studies of the molecular pathways implicated”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Art. 13.2 del R.D. 99/2011, en León a ___ de _____ de 2019.

VºBº

La Presidenta de la Comisión Académica,

La Secretaria del programa de doctorado,

Fdo.: Dra. María Jesús Tuñón González

Fdo.: Dra. María José Cuevas González

A mi familia

“El único límite a nuestros logros del mañana, está en nuestras dudas de hoy”

Franklín D. Roosevelt

Agradecimientos

Cuando decides tomar un camino en la vida, siempre tienes la duda de si estarás haciendo lo correcto, pero después de estos años y lo bonito del trayecto, sabes que merece la pena por las personas con las que lo compartes, por eso quiero agradecerles a todas ellas, que han hecho de esta, una de las etapas que merece la pena recordar.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de Tesis la Dra. María Jesús Tuñón y la Dra. Beatriz San Miguel, por confiar en mi y darme la oportunidad de convertirme en Doctora a pesar de las dificultades. A ti María Jesús, tengo que darte las gracias por tu paciencia y por enseñarme todo lo que sé, por ayudarme a crecer como científica y sobre todo como persona.

A la Dra. Irene Crespo por ayudarme en todo lo que estaba en su mano y más, sin su apoyo no estaría donde estoy. Por enseñarme, junto con Bea, cómo se trabaja en el laboratorio, porque con vosotras ha sido muy fácil aprender y porque vuestra alegría en el despacho se contagia.

Al Dr. Marcelino Álvarez, por darme la oportunidad de trabajar con él y acogerme como una más a pesar de ser todavía una criatura. Por acercarme con su entusiasmo al mundo de la Veterinaria, totalmente desconocido para mí.

A Diana I. Sánchez, por compartir conmigo esta etapa, difícil en algunos momentos, pero divertida en todo el resto. Por formar, junto con todos ellos, el mejor grupo de investigación en el que podría haber estado, porque con su ayuda y amistad todo ha sido mucho más fácil y porque sin ellos nunca habría llegado tan lejos.

A la Fundación Cepa González por hacer posible esta Tesis Doctoral apoyando la Investigación Biomédica.

Al resto de compañeros del Área de Fisiología, que de una manera u otra siempre han estado ahí, a Anna y Raquel por adentrarme en el mundo celular y a Sari porque con sus dosis de alegría la ciencia es mucho más bonita.

A Santi, porque a pesar de no acabar de entender muy bien que es esto de la Tesis, me ha acompañado en esta etapa vigilando células alguna noche o tomando unos Gin-tonic cuando llego a casa.

A mis amigas, las Klein por estar siempre ahí para hacerme desconectar de todo y porque los agobios con rumbas, son menos agobios. A Miri por acompañarme siempre con su serenidad desde que decidimos adentrarnos en esto de la Biología. A la Élite Class por entender mi falta de tiempo y haberme ayudado a alcanzar metas que, sin su comprensión, no hubieran sido posibles. A todas esas personas que de una manera u otra se han armado de paciencia para animarme y siempre han estado ahí, a pesar de las adversidades.

Por último, y a quién quiero dedicar especialmente esta Tesis, a mi familia, por entender que a veces hay que luchar por lo que realmente te gusta, por apoyarme siempre y sobre todo por haberme enseñado que con esfuerzo se puede alcanzar todo lo que te propongas por difícil que sea.

A todos vosotros, gracias. Esta Tesis también es vuestra.

Durante la realización de la presente tesis doctoral se han obtenido los siguientes artículos en revistas científicas:

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. 2018. Melatonin attenuates dysregulation of the circadian clock pathway in mice with CCl₄-induced fibrosis and human hepatic stellate cells. *Frontiers in Pharmacology*. 9:556. Factor de impacto: 4,4; 33/257 en Farmacología y Farmacia (Q1).

D. I. Sánchez, B. González-Fernández, I. Crespo, B. San-Miguel, M. Álvarez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. 2018. Melatonin modulates dysregulated circadian clocks in mice with diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Pineal Research*. e12506. Factor de impacto: 10,391; 3/84 en Fisiología (Q1).

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, M. Álvarez, M. J. Tuñón, J. González-Gallego. 2017. Inhibition of the SphK1/S1P signaling pathway by melatonin in mice with liver fibrosis and human hepatic stellate cells. *Biofactors*. 43:272-282. Factor de impacto: 3,236; 113/290 en Bioquímica y Biología Molecular (Q2).

D. I. Sánchez, B. González-Fernández, B. San-Miguel, I. Crespo, J. Ortiz de Urbina, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. 2017. Melatonin prevents deregulation of the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signaling pathway in a mice model of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Pineal Research*. 62:e12369. Factor de impacto: 10,391; 3/84 en Fisiología (Q1).

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. 2017. Sphingosine 1-phosphate signaling as a target in hepatic fibrosis therapy. *Frontiers in Pharmacology*. 8:579. Factor de impacto: 4,4; 33/257 en Farmacología y Farmacia (Q1).

I. Crespo, B. San-Miguel, D. I. Sánchez, B. González-Fernández, M. Álvarez, J. González Gallego, M. J. Tuñón. 2016. Melatonin inhibits the sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate signaling pathway in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin. *Journal of Pineal Research*. 61-2:168-176. Factor de impacto: 10,391; 3/84 en Fisiología (Q1).

B. San-Miguel, I. Crespo, D. I. Sánchez, B. González-Fernández, J. Ortiz de Urbina, M. J. Tuñón, J. González-Gallego. 2015. Melatonin inhibits autophagy and endoplasmic reticulum stress in mice with carbon tetrachloride-induced fibrosis. *Journal of Pineal Research*. 59:151-162. Factor de impacto: 10,391; 3/84 en Fisiología (Q1).

Durante la realización de la presente tesis doctoral se han llevado a cabo las siguientes comunicaciones a congresos con publicación de resúmenes en revistas científicas:

D. I. Sánchez, B. González-Fernández, I. Crespo, B. San-Miguel, F. Jorquera, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Melatonin attenuates dysregulation of circadian clock pathway in liver fibrosis and progression to hepatocarcinoma. 54^o Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 10-14 Abril 2019, Viena.

Journal of Hepatology, 2019.

D. I. Sánchez, B. González-Fernández, I. Crespo, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Efecto de la melatonina sobre la regulación del ritmo circadiano en la fibrosis hepática y la progresión a hepatocarcinoma. 44^o Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 20-22 Febrero 2019, Madrid.

Gastroenterología y Hepatología, 2019.

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Melatonin attenuates dysregulation of the circadian clock pathway in mice with CCl₄-induced fibrosis and human hepatic stellate cells. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). 18-21 Septiembre 2018, Cádiz.

Journal of Physiology and Biochemistry, 2018.

D. I. Sánchez, B. González-Fernández, I. Crespo, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Melatonin modulates dysregulated circadian clocks in a mice model of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). 18-21 Septiembre 2018, Cádiz.

Journal of Physiology and Biochemistry, 2018.

I. Crespo, D. I. Sánchez, B. González-Fernández, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Mitochondrial mediated antiviral immunity in a viral model of acute liver failure. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). 18-21 Septiembre 2018, Cádiz.

Journal of Physiology and Biochemistry, 2018.

D. I. Sánchez, I. Crespo, B. González-Fernández, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, M. Álvarez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. La melatonina regula las alteraciones de los genes *Clock* en un modelo animal de hepatocarcinoma. 43^o Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 21-23 Febrero 2018, Madrid.

Gastroenterología y Hepatología, 2018; 41:36.

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. La melatonina regula la alteración de los ritmos circadianos mediante la inhibición del receptor nuclear Rev-erba en modelos *in vivo* e *in vitro* de fibrosis hepática. 43º Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 21-23 Febrero 2018, Madrid.

Gastroenterología y Hepatología, 2018; 41:38.

I. Crespo, B. González-Fernández, D. I. Sánchez, B. San-Miguel, M. Álvarez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Efecto de la melatonina en la respuesta inmune innata y la mitofagia en un modelo animal de fallo hepático agudo. 43º Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 21-23 Febrero 2018, Madrid.

Gastroenterología y Hepatología, 2018; 41:40.

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, D. Martín-Sánchez, F. Jorquera, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Effect of melatonin on the circadian clock pathway in liver fibrosis and progression to hepatocarcinoma. 53º Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 11-15 Abril 2018, París.

Journal of Hepatology, 2018; 68:S133.

D. I. Sánchez, B. González-Fernández, I. Crespo, B. San-Miguel, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Melatonin regulates the sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling pathway in a mice model of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). 13-16 Septiembre 2016, Zaragoza.

Journal of Physiology and Biochemistry, 2016; 72(Suppl1):S34.

I. Crespo, B. San-Miguel, V. M. López, D. I. Sánchez, B. González-Fernández, J. L. Mauriz, M. Almar, J. Ortiz de Urbina, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Protocatechuic acid prevents inflammation and fibrosis, and regulates the sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphatesignaling pathway in an animal model of colitis. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). 13-16 Septiembre 2016, Zaragoza.

Journal of Physiology and Biochemistry, 2016; 72(Suppl1):S74.

D. I. Sánchez, B. San-Miguel, I. Crespo, B. González-Fernández, J. Ortiz de Urbina, M. Álvarez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Efectos de la melatonina sobre las respuestas inflamatoria y proliferativa en un modelo animal de hepatocarcinoma. 41º Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 17-19 Febrero 2016, Madrid.

Gastroenterología y Hepatología, 2016; 39:32.

B. González-Fernández, B. San-Miguel, I. Crespo, D. I. Sánchez, J. Ortiz de Urbina, M. Álvarez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. La melatonina reduce la respuesta inflamatoria y modula la respuesta inmune y la vía de los esfingolípidos en un modelo animal de fibrosis hepática. 41º Congreso Anual de

la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 17-19 Febrero 2016, Madrid.
Gastroenterología y Hepatología, 2016; 39:32.

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, M. Álvarez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Melatonin impairs the inflammatory response and inhibits the sphingosine kinase signaling pathway in an animal model of liver fibrosis. 51st *Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL)*. 13-17 Abril 2016, Barcelona.

Journal of Hepatology, 2016; 64:S705.

Financiación

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, Bárbara González Fernández ha sido beneficiaria de una Beca Predoctoral concedida por la Fundación CEPA GONZÁLEZ.



ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	V
ABREVIATURAS	VII
1 RESUMEN	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 FIBROSIS	5
2.2 FIBROSIS HEPÁTICA.....	6
2.3 MODELOS ANIMALES DE FIBROSIS HEPÁTICA	17
2.4 MECANISMOS MOLECULARES DE LA FIBROGÉNESIS.....	25
2.4.1 ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	25
2.4.2 AUTOFAGIA.....	28
2.4.3 VÍA DE LOS ESFINGOLÍPIDOS.....	40
2.4.4 RITMOS CIRCADIANOS.....	45
2.5 TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS.....	51
2.5.1 MELATONINA	52
3 OBJETIVOS	61
4 MATERIAL Y MÉTODOS	63
4.1 MATERIALES	63
4.2 ANIMALES	64
4.3 LÍNEAS CELULARES	65
4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL	65
4.4.1 MODELO <i>IN VIVO</i> DE FIBROSIS HEPÁTICA	65
4.4.2 MODELO <i>IN VITRO</i> CON CÉLULAS LX2.....	66
4.5 DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	67

4.5.1	ANÁLISIS BIOQUÍMICO EN PLASMA	67
4.5.2	ANÁLISIS HISTOLÓGICO HEPÁTICO	68
4.5.3	ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO HEPÁTICO	68
4.5.4	OBTENCIÓN DE HOMOGENEIZADOS	69
4.5.5	CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA.....	70
4.5.6	WESTERN BLOT	71
4.5.7	EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN	74
4.5.8	TRATAMIENTO DEL ARN CON ADN-ASAS	75
4.5.9	REACCIÓN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA	76
4.5.10	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (RT-PCR).....	77
4.5.11	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)	82
4.5.12	MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA.....	83
4.5.13	ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA).....	83
4.6	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	84

5 RESULTADOS **85**

5.1	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LOS MARCADORES DE DAÑO EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL₄ Y EN HSCs HUMANAS DE LA LÍNEA LX2	85
5.1.1	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LOS MARCADORES DE DAÑO HEPÁTICO EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL ₄	85
5.1.2	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LOS MARCADORES DE FIBROSIS EN HSCs HUMANAS DE LA LÍNEA LX2	91
5.2	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA VÍA DE LA AUTOFAGIA EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL₄.....	92
5.3	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL₄.....	98
5.4	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA VÍA SPHK1/S1P EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL₄ Y EN HSCs HUMANAS DE LA LÍNEA LX2	101
5.4.1	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA VÍA SPHK1/S1P EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL ₄	101

5.4.2	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA VÍA SPHK1/S1P EN HSCs HUMANAS DE LA LÍNEA LX2	107
5.5	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA VÍA DE LOS GENES <i>CLOCK</i> EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL₄ Y EN HSCs HUMANAS DE LA LÍNEA LX2	109
5.5.1	EFFECTO DEL MELATONINA SOBRE LA VÍA DE LOS GENES <i>CLOCK</i> EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL ₄	109
5.5.2	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA VÍA DE LOS GENES <i>CLOCK</i> EN HSCs HUMANAS DE LA LÍNEA LX2	115
6	<u>DISCUSIÓN</u>	119
6.1	EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE EL DAÑO HEPÁTICO EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL ₄	119
6.2	EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA VÍA DE LA AUTOFAGIA EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL ₄	121
6.3	EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL ₄	124
6.4	EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA VÍA SPHK1/S1P EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL ₄	126
6.5	EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA VÍA DE LOS GENES <i>CLOCK</i> EN UN MODELO MURINO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL ₄	130
7	<u>CONCLUSIONES</u>	135
8	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo del desarrollo de la fibrosis hepática _____	8
Figura 2. Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) _____	27
Figura 3. Diferentes tipos de autofagia _____	30
Figura 4. Proceso molecular de la autofagia _____	32
Figura 5. Regulación de la autofagia mediada por mTOR _____	33
Figura 6. Complejos de las PI3K de clase III _____	34
Figura 7. Conjugación de los complejos tipo ubiquitina _____	35
Figura 8. Procesado de LC3 _____	36
Figura 9. Fusión del autofagosoma con el lisosoma _____	37
Figura 10. Autofagia mediada por el estrés del RE _____	39
Figura 11. Esquema de la vía de la S1P/SphK1 _____	41
Figura 12. Esquema de la vía de señalización S1P/SphK1 en la célula hepática _____	43
Figura 13. Esquema representativo de la vía de los genes Clock _____	48
Figura 14. Esquema representativo de las asas de retroalimentación de la vía de los genes Clock y su ritmicidad circadiana _____	49
Figura 15. Biosíntesis de la melatonina _____	54
Figura 16. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa _____	77
Figura 17. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la histología hepática _____	86
Figura 18. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de α -SMA _____	88

Figura 19. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de TGF-β y Col I _____	89
Figura 20. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de PPARα _____	90
Figura 21. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la MET de secciones hepáticas _____	93
Figura 22. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de LC3-II _____	94
Figura 23. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de LC3-I/LC3-II, p62, LAMP-2, UVRAG y p-mTOR _____	96
Figura 24. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de CHOP _____	99
Figura 25. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre sobre la concentración de proteína de BiP, GRP94, p-IRE, ATF6 y p-PERK _____	100
Figura 26. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre los niveles hepáticos de S1P _____	102
Figura 27. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de SphK1 _____	103
Figura 28. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de SphK1 y S1PL _____	104
Figura 29. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de S1PR1 _____	106

Figura 30. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de S1PR3 _____	107
Figura 31. Efecto del tratamiento con PF543 y melatonina sobre sobre la concentración de proteína de SphK1, α-SMA y Col I en células LX2 _____	109
Figura 32. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de BMAL1, CLOCK, PER1, PER2 y CRY1 _____	110
Figura 33. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de CLOCK _____	112
Figura 34. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de REV-ERBα y RORα _____	113
Figura 35. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de REV-ERBα _____	114
Figura 36. Efecto del tratamiento con SR9009 y melatonina sobre los niveles de ARNm de BMAL1, CLOCK, PER2, CRY1, REV-ERBα y RORα en células LX2 _____	115
Figura 37. Efecto del tratamiento con SR9009 y melatonina sobre la expresión mediante inmunofluorescencia de BMAL1 en células LX2 _____	116
Figura 38. Efecto del tratamiento con SR9009 y melatonina sobre los niveles de ARNm de α-SMA, Col I y PPARα en células LX2 _____	117
Figura 39. Efecto del tratamiento con SR9009 y melatonina sobre la expresión mediante inmunofluorescencia de α-SMA en células LX2 _____	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla resumen de estudios realizados con modelos animales de fibrosis mediante la administración de CCl ₄ _____	24
Tabla 2. Tabla resumen del efecto de la melatonina en la fibrosis hepática _____	59
Tabla 3. Composición de los geles de separación _____	72
Tabla 4. Composición del gel de concentración _____	72
Tabla 5. Secuencias específicas de los iniciadores de fibrosis utilizados para la RT-PCR por Syber Green _____	78
Tabla 6. Secuencias específicas de los iniciadores de autofagia utilizados para la RT-PCR por Syber Green _____	79
Tabla 7. Secuencias específicas de los iniciadores de estrés del RE utilizados para la RT-PCR por Syber Green _____	79
Tabla 8. Secuencias específicas de los iniciadores de la vía de los esfingolípidos utilizados para la RT-PCR por Syber Green _____	80
Tabla 9. Secuencias específicas de los iniciadores de la vía de los genes clock utilizados para la RT-PCR por Syber Green _____	81
Tabla 10. Efecto del CCl ₄ y la melatonina sobre los niveles de ALT y AST _____	85
Tabla 11. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de α -SMA, TGF- β , Col I y PPAR α _____	91
Tabla 12. Efecto del tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de α -SMA, TGF- β y Col I en células LX2 _____	92
Tabla 13. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de Beclina-1, Atg5, Atg12 y Atg16 _____	97

Tabla 14. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de PERK, ATF4, ATF6, IRE1 y XBP1s _____	101
Tabla 15. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de SphK1, S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PL y ASMas _____	105
Tabla 16. Efecto del tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de SphK1, S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PL y ASMas en células LX2 _____	108
Tabla 17. Efecto del CCl ₄ y el tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de BMAL1, CLOCK, PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2, REV-ERB α y ROR α _____	113

ABREVIATURAS UTILIZADAS

α -SMA: α - actina de músculo liso

ABC: Transportadores dependientes de ATP

ABCA1: Transportadores dependientes de ATP del miembro A1 de la subfamilia ABC

ABCC1: Transportadores dependientes de ATP del miembro C de la subfamilia ABC

ABCG2: Transportadores dependientes de ATP del miembro C2 de la subfamilia ABC

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ALT: alanina aminotransferasa

AMBRA-1: Molécula activada en autofagia regulada por Beclina-1

AMC: Autofagia mediada por chaperonas

AMPC: Adenina monofosfato cíclico

AMPK: Proteína quinasa activada por adenosín monofosfato

ARN: Ácido ribonucleico

ARNasa: Endorribonucleasa

ARNi: ARN de interferencia

ARNm: ARN mensajero

ASMas: Esfingomielinasa ácida

AST: Aspartato aminotransferasa

ATF: Factor activador de transcripción

Atg: Genes reguladores de la autofagia

Bcl-2: Gen del linfoma de células B2

BDL: Ligadura del conducto biliar

Bif-1: Endofilina B1

BiP: Proteína de unión a inmunoglobulinas

BMAL1: Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo

BSA: Albúmina sérica bovina

CCl₃: Radical libre triclorometilo

CCl₃O₂: Radical peroxilo triclorometilo

CCl₄: Tetracloruro de carbono

CDAA diet: Dieta deficiente en el aminoácido colina

CHOP: Proteína homóloga a C/EBP

CK: Células de Kupffer

CK1ε: Caseína quinasa 1 épsilon

CLOCK: Del inglés, *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*

Col I: Colágeno tipo I

CREB β: Proteína de unión al elemento de respuesta activado por AMPc β

CRY: Criptocromo

DAB: 3-3 diaminobencidina

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño

DEN: Dietilnitrosamina

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMN: Dimetilnitrosamina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

EEM: Error estándar de la media

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGTA: Ácido etilén glicol tetracético

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica

eIF2 α : Subunidad α del factor 2 de iniciación de la traducción eucariótico

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

ERAD: Degradación de proteínas asociada al retículo endoplasmático

EROs: Especies reactivas del oxígeno

FBS: Suero fetal bovino

FIP200: Proteína de 200 kDa de interacción con la familia de las quinasas de adhesión

GPx: Glutati6n peroxidasa

GRP: Proteína regulada por glucosa

GSH: Glutati6n

HCC: Hepatocarcinoma

HMGB1: Del ingl3s, *High-Mobility Group Protein*

HRP: Peroxidasa de r3bano picante

HSCs: C3lulas estrelladas hep3ticas

IL: Interleucina

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina

i.p.: Vía intraperitoneal

IRE1: Enzima dependiente de inositol 1

JNK: Quinasa N-terminal de c-Jun

LAMP: Proteína de membrana lisosomal

LC3: Proteína asociada a los microt3bulos de cadena ligera 3

LPO: Lactato peroxidasa

LPP1-3: Fosfatasas de fosfato de l3pidos 1-3

LPS: Lipopolisacárido bacteriano

LX2: Línea de células estrelladas humanas

mAtg: Atg de mamífero

MCD diet: Dieta deficiente en metionina y colina

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

MEC: Matriz extracelular

Mel: Melatonina

MET: Microscopia electrónica de transmisión

MLKL: Proteína similar al dominio quinasa de linaje mixto

MMPs: Metaloproteinasas

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero

NF- κ B: Factor de transcripción nuclear Kappa B

NK: Células *Natural Killer*

NSQ: Núcleo supraquiasmático

p62 o SQSTM1: Proteína p62 o sequestrósoma- 1

PAR-1: Receptor activado por proteasa 1

PBS: Tampón fosfato salino

PBS-T: PBS-Tween

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PE: Fosfatidiletanolamina

PER: Periodo

PERK: Proteína quinasa del retículo endoplasmático activada por estrés

PI3K: Fosfatidil inositol-3 quinasa

PI3P: Fosfatidil inositol 3-fosfato

PPAR: Receptor activado por proliferadores de peroxisomas

PS1 y PS2: Proteasas del sitio 1 y 2

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

RE: Retículo endoplasmático

REV-ERB: Subfamilia de receptores nucleares 1, grupo D, miembro 1

RHDV: Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo

RQ1: ADNasa libre de ARNasa

ROR: Receptor nuclear de ácido retinoico

RT-PCR: Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

S1P: Esfingosina 1-fosfato

S1PL: Esfingosina 1-fosfato liasa

S1PR: Receptor de la esfingosina 1-fosfato

s.c.: Vía subcutánea

SDS: Dodecilsulfato sódico

SOD: Superóxido dismutasa

SphK: Esfingoquinasa

Spns2: Transportador del homólogo spinster 2

SPP1-2: Fosfatasa específica de la S1P 1 y 2

TAA: Tiacetamida

TEMED: Tetrametiletilendiamina

TGF- α : Factor de crecimiento transformante alfa

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TIMPs: Inhibidores tisulares de MMPs

TLR: Receptor del tipo *Toll*

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

ULK: Quinasa activadora de la autofagia similar a Unc-51

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas

UVRAG: Gen asociado a la resistencia a la radiación ultravioleta

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

Vps34: Proteína vacuolar tipo 34

w: Semanas, del inglés *week*

XBP1: Proteína de unión a la X-box tipo 1

XBP1s: Forma con *splicing* de XBP1

XBP1u: Forma sin *splicing* de XBP1

RESUMEN

1 RESUMEN

El hígado es un órgano vital para la destoxicación de sustancias perjudiciales presentes en el organismo. Las agresiones producidas a este órgano por agentes químicos, víricos o quirúrgicos, desencadenan un proceso fisiopatológico complejo que incluye desde una simple esteatosis hepática, pasando por una fibrosis hepática, cirrosis y finalmente pudiendo desarrollar finalmente, en algunos casos, hepatocarcinoma.

En la actualidad, millones de personas sufren daño hepático inducido por alcohol, productos químicos e infecciones. Así, enfermedades hepáticas agudas y crónicas siguen siendo uno de los problemas graves de salud a nivel mundial. Las enfermedades inflamatorias crónicas del hígado son factores de riesgo que predisponen al desarrollo de hepatocarcinoma, ya que cualquier agente que dañe de forma crónica y progresiva a los hepatocitos e induzca mitosis, hace al ADN celular más susceptible a alteraciones genéticas. Entre ellas, se pueden citar la esteatohepatitis, la cirrosis alcohólica o la cirrosis inducida por el virus de la hepatitis B o C. Mientras que la esteatosis puede considerarse un proceso benigno, las demás patologías tienen el potencial de causar inflamación hepática crónica y desarrollo de fibrosis, lo que acabaría provocado la insuficiencia del órgano. La fibrosis hepática se considera una respuesta a agresiones externas que tiene como objetivo limitar el daño como medida protectora y reversible del tejido hepático. La destrucción de la arquitectura hepática normal se debe a la aparición de cicatrices fibrosas y a la pérdida de hepatocitos, lo que provoca que el hígado pierda alguna de sus funciones fisiológicas y se pueda producir finalmente insuficiencia hepática.

En los últimos años se ha podido comprobar que este estado patológico de acumulación de proteínas de la matriz extracelular, conocido como fibrosis hepática, es un proceso reversible cuando se elimina el estímulo dañino y se aplica un tratamiento terapéutico adecuado. La inflamación, el estrés del retículo endoplasmático y otras vías de señalización relacionadas, como la autofagia, la apoptosis, la vía de los esfingolípidos o incluso los ritmos circadianos, se encuentran entre los mecanismos clave en la regulación de estas alteraciones.

Es importante tener en cuenta que, en la mayoría de los casos, las terapias existentes para el tratamiento de enfermedades que cursan con fibrosis hepática son ineficaces. Debido a la gravedad que muchas de estas enfermedades crónicas alcanzan, el trasplante de hígado se considera como única terapia eficaz para muchos pacientes cuando están en etapas avanzadas de la enfermedad y presentan una función hepática descompensada.

Mejorar el conocimiento de los mecanismos implicados en la fibrogénesis hepática es crucial para identificar las posibles dianas terapéuticas, así como para establecer terapias alternativas y eficaces que mejoren los tratamientos convencionales aumentando la esperanza de vida de los pacientes.

Por todo ello, y basándonos en los numerosos estudios que han indicado que la melatonina tiene un papel hepatoprotector tanto en modelos animales de daño hepático como en modelos celulares, el principal objetivo de esta tesis fue determinar el efecto de la melatonina en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄). Por ello, se analizaron las principales vías de señalización implicadas en su desarrollo y, además, se evaluó su efecto en las células estrelladas hepáticas humanas de la línea LX2 con el objetivo de demostrar si los resultados obtenidos podrían ser extrapolables a humanos.

La administración de CCl₄ indujo daño hepático, así como el desarrollo de fibrosis hepática, demostrado a través del aumento de los marcadores séricos de daño, junto con una expresión aumentada de los principales marcadores de fibrosis. De igual modo, la administración del tóxico provocó un aumento del proceso autofágico y el estrés del retículo endoplasmático, así como una desregulación de la vía de los esfingolípidos y los ritmos circadianos, mecanismos moleculares implicados en la progresión de la fibrogénesis.

El tratamiento con melatonina, hormona con probada acción antioxidante, logró regular los efectos provocados por el CCl₄, lo que contribuyó a reducir los marcadores de daño y fibrosis, a través de la modulación de las vías moleculares implicadas. Además,

se demostró el efecto protector del indol en las células estrelladas hepáticas humanas de la línea LX2, células clave en la progresión de la fibrosis.

En resumen, con este estudio se ha pretendido profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la fibrogénesis hepática para que, junto con otros estudios similares, se pueda contribuir a la búsqueda de nuevas posibilidades terapéuticas y con ello mejorar la esperanza de vida de los pacientes con enfermedades crónicas hepáticas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fibrosis

La fibrosis es un estadio patológico característico de muchas enfermedades crónicas de varios órganos tales como el pulmón, riñón, corazón e hígado (Hams *et al.*, 2015). Entre las posibles causas de esta alteración cabe citar la exposición prolongada a cualquier factor que dañe las células, induzca mitosis y haga que el ADN sea más sensible a alteraciones genéticas (Friedman y Bansal, 2006). La fibrogénesis posee una naturaleza dinámica, incluso en etapas avanzadas, cuya etiología determina los mecanismos y el patrón que presenta (Rosenbloom *et al.*, 2013). Este mecanismo patogénico se considera una respuesta a agresiones intensas y crónicas que desencadenan procesos de cicatrización de heridas y remodelación de la estructura de los órganos, con el objetivo de restringir la lesión tisular causada por dichas lesiones repetidas (Friedman, 2008b; Zois *et al.*, 2008; Jung y Yim, 2017). El proceso fibrogénico generalmente aparece en el área más afectada y requiere de un estímulo persistente (Gressner *et al.*, 2007; Friedman, 2008b). El desarrollo de la fibrosis puede desencadenar un estado avanzado que se caracteriza por la presencia de numerosos septos fibróticos, y nódulos parenquimatosos de regeneración (Mccuskey, 2008; Zois *et al.*, 2008; Aghemo y Colombo, 2009). Aunque la fibrosis se consideraba convencionalmente un proceso irreversible (Popper *et al.*, 1952), hoy en día la evidencia clínica y experimental sugiere lo contrario (Ebrahimi *et al.*, 2018). Actualmente se considera un proceso bidireccional dinámico, en el que se produce la recuperación y remodelación del tejido cicatrizante, principalmente en las etapas iniciales (Ebrahimi *et al.*, 2018). Sin embargo, en etapas avanzadas de la fibrosis, donde se produce la insuficiencia del órgano, ya no se considera un proceso reversible (Ebrahimi *et al.*, 2016; Rowe, 2017). Hay muchos factores que contribuyen al desarrollo de la fibrosis, como son la inflamación, el estrés del retículo endoplasmático (RE) y otras vías relacionadas como la autofagia o la apoptosis, entre otras. Las principales vías involucradas en la progresión o regresión de la fibrosis son comunes en varios órganos (Friedman y Bansal, 2006; Aghemo y Colombo, 2009). Numerosos factores determinan el desarrollo de este proceso, y en él están involucradas

tanto las células parenquimatosas como las no parenquimatosas (Trautwein *et al.*, 2015). Además, otros tipos celulares, como las células inmunes, juegan un papel clave en la respuesta multicelular causada por el daño. La muerte celular o apoptosis, induce la activación de las vías inflamatorias y pro-fibrógenicas en células no parenquimatosas y células inmunes infiltrantes, que provocan la progresión de la fibrosis, dificultando la reversión del estado patológico (Pinzani y Macias-Barragan, 2010). Por el contrario, existen otras poblaciones celulares cuyas propiedades fibrogénicas juegan un papel importante en la regresión de la fibrosis. La desregulación del proceso, con una expresión elevada de proteínas de la matriz extracelular (MEC), puede provocar una fibrosis avanzada que altera la arquitectura normal de los órganos afectados, lo que finalmente conduce a su disfunción irreversible (Wynn, 2008; Rosenbloom *et al.*, 2010; Hams *et al.*, 2015).

2.2 Fibrosis hepática

La fibrosis hepática es una de las lesiones más características de la hepatopatía crónica y presenta una alta morbilidad y mortalidad. Las enfermedades crónicas del hígado representan una de las preocupaciones más importantes de la salud pública a nivel mundial, puesto que afectan a más de 800 millones de personas, y la tasa de mortalidad es de aproximadamente dos millones de pacientes al año (Marcellin y Kutala, 2018). Esta patología se considera una respuesta a agresiones crónicas de intensidad suficiente para conducir a un proceso de cicatrización y remodelado de la estructura del hígado, que tiene el propósito de limitar el daño tisular producido por estas lesiones hepáticas crónicas, independientemente de la etiología (Friedman y Bansal, 2006; Friedman, 2008b; Jung y Yim, 2017). Este proceso de cicatrización puede producir alteración de la arquitectura hepática con la consecuente aparición de cirrosis, la cual se caracteriza por bandas de fibrosis más gruesas, nódulos parenquimatosos de regeneración y distorsión vascular (Zois *et al.*, 2008; Aghemo y Colombo, 2009; Huang *et al.*, 2017). De acuerdo con los informes de salud a nivel mundial, la cirrosis causa en torno a un millón de muertes al año (Rowe, 2017). Se considera la cuarta causa principal

de muerte en los últimos cinco años, después de otras enfermedades crónicas como las enfermedades coronarias, los accidentes cerebrovasculares o las enfermedades obstructivas del pulmón (Rowe, 2017). Actualmente, el principal tratamiento para la cirrosis es el trasplante de hígado, realizándose más de 5.000 intervenciones al año en Europa (Parola y Pinzani, 2018). Además, la cirrosis también es un riesgo importante para el desarrollo de hepatocarcinoma (HCC), que se considera la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer en el mundo (McGlynn *et al.*, 2015). La composición de la cicatriz fibrosa hepática generada por el daño, es similar, independientemente de la causa de la lesión, bien sea de origen viral [virus de la hepatitis B (VHB) o C (VHC)], causada por la exposición a drogas o alcohol, o derivada de enfermedades autoinmunes o metabólicas (Aghemo y Colombo, 2009; Duval *et al.*, 2015; Bernuth *et al.*, 2016). La fibrosis generalmente aparece en las zonas de mayor lesión y usualmente requiere que el estímulo dañino persista durante un amplio periodo de tiempo de meses o años (Friedman, 2008b; Ebrahimi *et al.*, 2018) (Figura 1).

Una característica común de la fibrosis hepática es la presencia de grandes cantidades de fibroblastos y miofibroblastos activados, que aumentan la expresión de proteínas de colágeno, α -actina de músculo liso (α -SMA) y liberan citoquinas y mediadores celulares que, junto con las células inflamatorias, crean un ambiente profibrogénico que afecta negativamente a la regeneración del parénquima hepático (Krenkel y Tacke, 2017). Además, los miofibroblastos reducen la expresión de genes que codifican enzimas degradantes de la MEC, lo que contribuye a la deposición de MEC, actuando como mediadores centrales de la fibrosis (Greenhalgh *et al.*, 2015; Karin *et al.*, 2016). Existen otros mediadores que desencadenan el proceso de fibrosis, como son las cascadas de señalización de patrones moleculares asociados a daños (DAMP), que adquieren una gran importancia en la inflamación (Zigmond *et al.*, 2014; Huebener *et al.*, 2015), así como otras citoquinas y quimiocinas proinflamatorias y profibróticas, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Hams *et al.*, 2015). También están involucradas otras citoquinas incluyendo interleucinas (IL) y nuevas vías de señalización como Wnt, Hedgehog y Notch que juegan un papel clave en el desarrollo de enfermedades

hepáticas (Rosenbloom *et al.*, 2013). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son otros de los mediadores destacables en el proceso de reparación del tejido hepático, a través de la modulación de la angiogénesis (Zhao *et al.*, 2017).

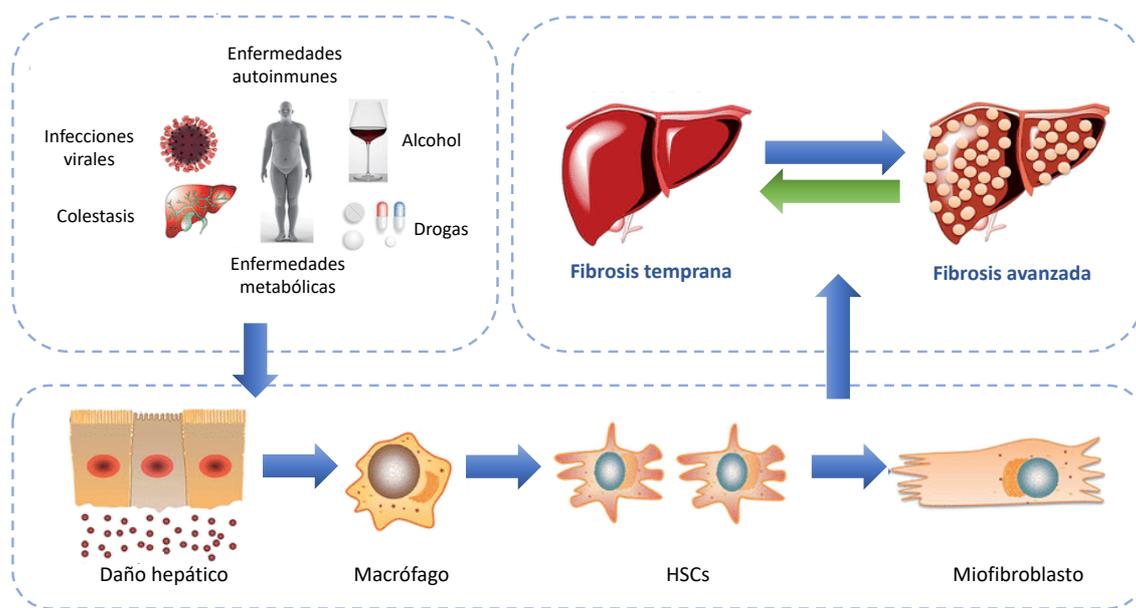


Figura 1. Esquema representativo del desarrollo de la fibrosis hepática. Los agentes externos tales como el alcohol, las drogas o las enfermedades virales entre otras, desencadenan un daño persistente en el tejido hepático que induce la activación de las células estrelladas hepáticas (HSCs) transformándose en miofibroblastos. Estas células, al ser claves en la progresión de la fibrosis, inducen la síntesis de proteínas de la MEC, lo que contribuye a la progresión de la patología dificultando su reversión.

La revisión de muestras histológicas de pacientes con enfermedades hepáticas crónicas tratadas exitosamente con sus respectivas terapias, al igual que los modelos animales de fibrosis, ponen de manifiesto que esta patología es un proceso dinámico bidireccional, en el cual puede producirse recuperación y remodelación del tejido cicatricial, fundamentalmente en las etapas iniciales (Figura 1) (Friedman, 2008b; Huang *et al.*, 2017; Jung y Yim, 2017). Sin embargo, todavía se desconoce el punto a partir del cual la cirrosis no regresa o es irreversible (Friedman y Bansal, 2006; Aghemo y Colombo, 2009; Rowe, 2017).

Histológicamente, el hígado está integrado por células parenquimatosas (hepatocitos) y células no parenquimatosas (Aghemo y Colombo, 2009). Los hepatocitos

representan más del 80% del volumen hepático y las células no parenquimatosas el 6,5% del total del hígado. El 40% de estas últimas se localizan en la zona de los sinusoides hepáticos en los cuales existen tres tipos principales de células: las células endoteliales, las células de Kupffer (CK) y las células estrelladas hepáticas (HSCs) (Aghemo y Colombo, 2009).

Las HSCs son células perisinusoidales ubicadas en el espacio subendotelial del espacio de Disse, que en su estado quiescente tienen como función principal servir como depósito de retinoides como la vitamina A y sus metabolitos (Marcos *et al.*, 2003; Friedman, 2008b; Holt *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando estas células están sometidas a estímulos agresivos, se transforman en otras totalmente distintas, morfológicamente similares a los miofibroblastos pero con múltiples funciones adicionales, como la producción de proteínas de la MEC (Friedman, 2008b; Karin *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017) y de citoquinas proinflamatorias (Holt *et al.*, 2008) mediante un mecanismo que se conoce como activación. Estos miofibroblastos se caracterizan por su proliferación, la actividad contráctil y la capacidad de desarrollar fibrogénesis. Las HSCs inicialmente conocidas como lipocitos, aracnócitos, células almacenadoras de lípidos o células de Ito, fueron identificadas en los años 90 como una importante fuente de colágeno dentro del hígado y, a partir de ese conocimiento, la fibrosis hepática comenzó a recibir mayor atención (Friedman, 2008a, b). En los últimos años se ha considerado que esta activación de las HSCs es el eje central en la progresión de la fibrogénesis hepática (Huang *et al.*, 2017). Además de su capacidad para producir fibrosis, estas células también se comportan como células presentadoras de antígenos y células progenitoras capaces de diferenciarse en células endoteliales y en hepatocitos, lo cual destaca su gran funcionalidad y su importante papel en la regeneración del hígado (Gressner *et al.*, 2007). Ahora bien, no solo contribuyen a la fibrogénesis hepática estas células, sino que se ha comprobado que existen otras fuentes celulares de miofibroblastos que favorecen este proceso, entre las cuales, las más estudiadas son las células progenitoras de la médula ósea, los fibroblastos portales y las células mesenquimales de transición provenientes de hepatocitos y colangiocitos (Gressner *et al.*, 2007; Friedman, 2008b). La transdiferenciación de las HSCs provoca la síntesis de la α -SMA, y de las células

miofibroblásticas positivas que sintetizan exceso de componentes de la MEC (Novo *et al.*, 2014; Karin *et al.*, 2016). Ante los diversos agentes lesivos del hígado, se inicia una cascada inflamatoria por diversas vías de señalización que confluirán en la activación de las HSCs. Estos mecanismos de activación son complejos y diversos, como también lo son las acciones de los diferentes tipos celulares que influyen sobre las HSCs (Rippe y Brenner, 2004; Friedman, 2008a; Karin *et al.*, 2016; Reiter *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017).

La activación de las HSCs puede ser el resultado de la interacción de los diferentes tipos celulares hepáticos: los macrófagos activados (CK), los hepatocitos dañados o lesionados, las plaquetas y las células endoteliales, con la consiguiente producción y liberación de diferentes citoquinas y especies reactivas del oxígeno (EROs) (Rippe y Brenner, 2004; Friedman, 2008a; Sato *et al.*, 2016a). Se ha propuesto que la activación es un mecanismo de cascada que involucra, en diferentes fases, células pre-inflamatorias, inflamatorias y post-inflamatorias (Gressner *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2015).

Las CK tienen como actividad fundamental eliminar y detoxificar agentes exógenos y endógenos, particularmente endotoxinas bacterianas provenientes del intestino, como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), potente inductor de la inflamación (Holt *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2016a). La respuesta de las CK a un estímulo lesivo, provoca la activación de las HSCs induciendo la actividad mitótica de las mismas y provocando importantes efectos adicionales tales como la transformación fenotípica de las HSCs a miofibroblastos, lo que induce un incremento en la síntesis de proteínas de elastina y de colágeno. Además, producen la estimulación de su proliferación y el aumento de la respuesta al PDGF (Rippe y Brenner, 2004; Borkham-Kamphorts *et al.*, 2007; Kikuchi *et al.*, 2017).

Las HSCs activadas participan en la activación de otras HSCs, por mecanismos de tipo autocrino y paracrino, a través de citoquinas y factores de crecimiento, los cuales van a generar la expresión diferencial de las proteínas de la MEC, siendo los más destacados el TGF- β y la isoforma α (TGF- α), que son proteínas altamente fibrogénicas (Gressner *et al.*, 2007; Ebrahimi *et al.*, 2016; Kikuchi *et al.*, 2017).

La exposición continuada a un agente dañino provoca la liberación de agentes citotóxicos y sustancias con actividad mitogénica similar al PDGF por parte de los hepatocitos y también puede favorecer la inducción de la síntesis de colágeno tipo I (Col I) (Gressner *et al.*, 2007; Garg *et al.*, 2017). La destrucción parcial de los hepatocitos y la apoptosis de los mismos, también son mecanismos que participan en la activación de las HSCs (Rippe y Brenner, 2004), debido al contacto permanente que existe entre ellos, tanto directamente a través de sus respectivas membranas celulares, como por mediadores solubles.

De igual manera, las plaquetas presentes en las áreas de inflamación y de necrosis son una importante fuente de citoquinas proinflamatorias y profibrogénicas que promueven el crecimiento, transformación y síntesis de las proteínas de la MEC (Borkham-Kamphorts *et al.*, 2007).

Las células progenitoras de la médula ósea también tienen la capacidad de diferenciarse en hepatocitos, colangiocitos, células endoteliales sinusoidales o CK, al igual que a HSCs o miofibroblastos en un microambiente adecuado (Gressner *et al.*, 2007; Garg *et al.*, 2017; Kikuchi *et al.*, 2017). Hay evidencias que sugieren que no solo estas células poseen la propiedad de diferenciarse a células especializadas, sino que existe una subpoblación de monocitos capaz de diferenciarse a hepatocitos o a fibrocitos bajo estímulos de interleuquinas específicas o de factores estimulantes de colonias de macrófagos (M-CSF) (Gressner *et al.*, 2007; Holt *et al.*, 2008; Dudakov *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2015).

Fases de la fibrogénesis

La fibrogénesis es un complejo proceso patológico que se puede dividir en 3 fases: iniciación, perpetuación y resolución (Gressner *et al.*, 2007; Friedman, 2008b; Ebrahimi *et al.*, 2016).

La iniciación, se refiere a los cambios primarios fenotípicos de las HSCs, los cuales brindan una mayor capacidad de respuesta a los factores de crecimiento y finalmente a

un incremento de la síntesis de moléculas de la MEC. Los cambios iniciales son de tipo paracrino, provenientes de los diferentes tipos celulares ya mencionados: hepatocitos, CK, leucocitos, células endoteliales sinusoidales y citoquinas (Friedman, 2008b; Holt *et al.*, 2008; Kikuchi *et al.*, 2017).

La perpetuación, por su parte, involucra al menos siete tipos de cambios en el comportamiento celular que comprenden: proliferación, quimiotaxis, pérdida de los retinoides, liberación de citoquinas, contractilidad, fibrogénesis propiamente dicha y degradación de la MEC.

El resultado del efecto del incremento en la secreción de factores de crecimiento y citoquinas con poder mitogénico, se define como proliferación. El PDGF es uno de los agentes mitogénicos más potentes caracterizado para las HSCs (Borkham-Kamphorts *et al.*, 2007; Schoemaker *et al.*, 2008; Kikuchi *et al.*, 2017). La inducción de los receptores tiene lugar de manera muy temprana en la activación. Otros factores con actividad mitogénica sobre las HSCs son el VEGF, la trombina y sus receptores, entre otros (Friedman, 2008b).

En la quimiotaxis se produce la migración de las HSCs a los sitios de lesión hepatocelular. Esto se debe a la actividad de varias sustancias quimioatrayentes, tales como el PDGF (Karin *et al.*, 2016).

La activación de las HSCs, se acompaña de la pérdida de los acúmulos de retinoides perinucleares (Gressner *et al.*, 2007; Friedman, 2008b; Reiter *et al.*, 2016). Como se indicó con anterioridad, estas células son el depósito del 80% del total de la vitamina A corporal, en forma de ésteres de retinol y especialmente como retinol libre en gotas lipídicas, y han sido reconocidas como células de depósito de grasa. El cambio morfológico que provoca la pérdida de los retinoides es una condición necesaria para la modificación del citoesqueleto de las HSCs activadas y los cambios que se van a producir posteriormente (Karin *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017). Aún no son claros los mecanismos intracelulares que inducen el proceso, y además los efectos de los retinoides sobre las HSCs y la fibrogénesis son en ocasiones contradictorios (Rippe y Brenner, 2004; Mezaki *et al.*, 2009).

La fibrogénesis, como fase del proceso, hace referencia a la etapa en la que las HSCs generan fibrosis, no solo por el incremento en el número de células activadas, sino también por la producción de proteínas de la MEC (Garg *et al.*, 2017). El Col I es el principal tipo de proteína fibrilar constituyente de la matriz en el hígado fibrótico, y su expresión está regulada por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales. El estímulo más potente para aumentar la producción de Col I es el TGF- β , derivado de fuentes paracrinas y autocrinas, que sigue siendo considerada como la citoquina fibrogénica clásica. Otra vía mediante la cual el TGF- β estimula la síntesis de colágeno es a través de un peróxido de hidrógeno y un mecanismo dependiente de la proteína de unión al elemento de respuesta activado por AMPc β (CREB β) (Gressner *et al.*, 2007; Friedman, 2008a, b). La fibrosis se caracteriza por varias fases que conducen finalmente al incremento de la MEC, donde se incluyen diferentes proteínas como la elastina y colágeno de tipo fibrilar (I, III, V), no fibrilar (IV y VI), gliconjugados como los proteoglicanos sulfatados y las glicoproteínas estructurales, y los glicosaminoglicanos como el hialuronato. La distribución inicial de estos depósitos de matriz ocurre en el área subendotelial del espacio de Disse, lo cual constituye casi una membrana basal que genera una barrera adicional en la difusión entre los hepatocitos y los sinusoides (Ebrahimi *et al.*, 2016). El aumento del depósito de MEC produce la oclusión y desaparición de las fenestras de las células endoteliales, fenómeno que se ha conocido como capilarización de los sinusoides (Gressner *et al.*, 2007; Friedman, 2008a,b). El proceso de cambios estructurales de la matriz, su depósito y la formación final de septos fibrosos, es un proceso activo, que se desarrolla en un largo periodo de tiempo y que está notablemente influenciado por la actividad de las HSCs, fibroblastos periportales y peribiliares, múltiples factores de crecimiento y angiogénicos (Muñoz-Luque *et al.*, 2008; Soon y Feel, 2008; Zois *et al.*, 2008).

La contractibilidad de las HSCs es un factor muy importante en los aumentos de la resistencia portal, tanto en fases tempranas como tardías de la fibrosis hepática, siendo presumiblemente reversible antes del engrosamiento de los septos (Rockey, 2003; Lee *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2017). En estadios tempranos de la fibrosis, las HSCs activadas rápidamente muestran un fenotipo parecido a las células musculares lisas,

caracterizado por un incremento de filamentos contráctiles que incluyen α -SMA y miosina, lo cual genera fuerzas dependientes o independientes de calcio (Friedman, 2008a, b). La adquisición de este fenotipo contráctil de las HSCs es mediada, en parte, por receptores que interactúan con la MEC y que conducen señales dependientes de calcio. La endotelina-1 es el principal agonista que controla la contractilidad en las HSCs, aunque también están involucrados otros mediadores como la angiotensina II, la vasopresina, los eicosanoides, la trombina y los agonistas α adrenérgicos, entre otros (Soon y Feel, 2008). Las HSCs se han reconocido como pericitos hepáticos específicos que contribuyen al desarrollo, regeneración y respuesta al daño. Cuando se produce una extirpación parcial del hígado, ellas migran junto con las células endoteliales para establecer conexiones vasculares y, junto a los hepatocitos, nuevas ramas de sinusoides (Lee *et al.*, 2007). En la fibrosis avanzada, la cirrosis, las bandas de colágeno producidas contienen un gran número de HSCs activadas que contribuyen al engrosamiento de los septos (Jung y Yim, 2017). Estas células, progresivamente, impiden el flujo sanguíneo portal por constricción individual de los sinusoides y por contracción del hígado cirrótico. Al mismo tiempo, se incrementa la densidad de las HSCs y el recubrimiento de la luz (Lee *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2014; Jung y Yim, 2017).

Como se indicó con anterioridad, las HSCs son moduladoras centrales de la inflamación hepática y de la inmunidad, y no son precisamente sujetos pasivos de una enorme lista de citoquinas inflamatorias, puesto que tienen un papel regulador de la respuesta inflamatoria frente al daño y el posterior desarrollo de la fibrosis (Jaeschke, 2006; Friedman, 2008a; Huang *et al.*, 2017).

Si bien la fibrosis refleja el equilibrio entre la producción y degradación de la matriz, esta última constituye un evento clave en la progresión de la fibrogénesis (Ebrahimi *et al.*, 2018). La disrupción en la síntesis de proteínas de la MEC en la fase temprana de la enfermedad hepática y su reemplazo por matriz cicatricial o la disrupción de la matriz normal hepática por invasión tumoral, podría ser lo que desencadenase la patología. En los últimos años, se ha incrementado el conocimiento de la remodelación de la matriz debido a que la reabsorción del exceso de MEC, en pacientes con enfermedad hepática crónica, constituye una oportunidad de revertir la disfunción

hepática y la hipertensión portal (Iredale, 2007; Jung y Yim, 2017). Uno de los factores determinantes en la remodelación de la matriz es una familia de MMPs, conocida como matrixinas. Estas son enzimas dependientes de calcio que degradan colágeno y substratos no colagenosos.

Las HSCs son la principal fuente de síntesis de algunos tipos de MMPs, como son las gelatinasas y estromelisin. El principal determinante de la progresión de la fibrosis es el fallo en la degradación de la MEC. Esto provoca un acúmulo excesivo de Col I que, en condiciones normales, sería degradado a través de la familia de MMPs-1 que son sintetizadas de manera deficiente por las HSCs. La regulación de la actividad de las MMPs de la matriz puede ocurrir a varios niveles, pero su inactivación ocurre siempre a través de la unión con los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) (Karin *et al.*, 2016; Ebrahimi *et al.*, 2018).

La última de las fases de la fibrogénesis es la resolución, que ha centrado la atención de muchos investigadores debido a su potencial terapéutico.

En los últimos años se ha generado un gran interés por la posibilidad de obtener regresión de esta patología, teniendo en cuenta los resultados logrados con el tratamiento de la enfermedad producida por el VHC (Miyaki *et al.*, 2016).

En la mayoría de los estudios, se denomina "regresión" de la fibrosis hepática a la reducción del número y tamaño de los tabiques fibróticos en la microestructura hepática, mientras que se conoce como "reversión" a la resolución más profunda de la patología llegando en algunos casos a la normalidad (Ebrahimi *et al.*, 2018). La posibilidad de detener o lograr que desaparezca la fibrosis hepática, constituye un importante foco de investigación de las últimas décadas puesto que, hasta entonces, se pensaba que era un proceso irreversible considerado como una alteración unidireccional sin posibilidad de revertir a un estado de normalidad (Perez-Tamayo, 1979; Friedman y Bansal, 2006). Existen dos enfoques principales en la reversión clínica de la fibrosis hepática: eliminar el daño subyacente y frenar el desarrollo del proceso fibrótico.

Actualmente, los mecanismos moleculares en los que se emplea ácido ribonucleico de interferencia (ARNi), junto con la terapia celular y la terapia génica, se encuentran entre las estrategias más valiosas para revertir la fibrosis hepática (Ebrahimi *et al.*, 2018). Se pueden destacar el desarrollo de estudios epigenéticos centrados en la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN), que han logrado frenar la transdiferenciación de las HSCs inhibiendo, de este modo, la progresión de la patología (Page *et al.*, 2016). Además, las modificaciones epigenéticas se están comenzando a utilizar como dianas terapéuticas en el desarrollo de moléculas para tratar la fibrosis hepática, y también como marcadores no invasivos para evaluar el estadio de la enfermedad (Ebrahimi *et al.*, 2018). De igual modo, se están abriendo nuevas áreas de investigación basadas en el uso de microARNs que regulan los mediadores inflamatorios en el desarrollo de la enfermedad y, por lo tanto, influyen de manera directa en su desarrollo (van der Ree *et al.*, 2016). Por último, la terapia celular se ha convertido en uno de los tratamientos clave que pretende sustituir el trasplante hepático en el tratamiento de la fibrosis, gracias a su capacidad para mejorar funcional y estructuralmente el tejido dañado (Matsumoto *et al.*, 2016; Mohamadnejad *et al.*, 2016). El desarrollo e investigación en los posibles tratamientos eficaces de las enfermedades hepáticas crónicas se realiza a través del diseño y experimentación con diferentes modelos animales, de los que se hablará a continuación, gracias a los cuales se establecen vías que reducen o revierten la activación de las HSCs, frenando de este modo la progresión del proceso fibrótico.

2.3 Modelos animales de fibrosis hepática

Los animales presentan una anatomía, fisiología y mecanismo de respuesta a patógenos similar a la especie humana por lo que se utilizan en la investigación biomédica, con el fin de obtener resultados que puedan ser extrapolables a la medicina humana y, por ello, se conocen como modelos animales (*Medical Dictionary*). Los modelos animales permiten (Starkel *et al.*, 2011):

- El estudio exhaustivo de las preguntas que no se pueden abordar en estudios en humanos.
- El muestreo múltiple en momentos estratégicos durante la evolución o resolución de la enfermedad.
- Y la realización de pruebas experimentales con restricción del número de variables a un mínimo.

Desde hace varias décadas se utilizan los modelos animales para estudiar la fibrogénesis y para evaluar el potencial anti-fibrótico de terapias y estrategias (Iredale, 2007). Aunque estos modelos son inmensamente valiosos para nuestra comprensión de procesos fisiopatológicos, aún siguen sin reproducir realmente una enfermedad humana (Starkel *et al.*, 2011).

Los grandes avances en este campo, como son la cinética de la fibrogénesis, la identificación de las células productoras de la MEC, los principales mecanismos de acción y las vías intracelulares que regulan la fibrogénesis, así como el concepto y los mecanismos de remodelación de la matriz y de reversibilidad de la fibrosis, derivan del estudio en modelos animales y de la confrontación de esas observaciones con estudios clínicos (Friedman, 2008b; Garg *et al.*, 2017).

La administración repetida de sustancias tóxicas para el hígado, es una manera clásica para inducir fibrosis hepática. Entre estas sustancias se encuentran el tetracloruro de carbono (CCl₄), la tioacetamida (TAA) o el dimetil o dietil nitrosamina (DMN o DEN), entre otros. La fibrosis resultante tras la administración de esas sustancias se desarrolla primero en áreas pericentrales formando puentes entre zonas centrales y

en segundo lugar, entre las áreas centrales y portales que eventualmente conducen a la cirrosis (Starkel *et al.*, 2011).

Estos modelos son relativamente fáciles de realizar y la reproducibilidad de los mismos suele ser alta. Sin embargo, el proceso se complica cuando el agente inductor de la fibrosis se administra en la dieta o en el agua potable, o cuando la absorción o el metabolismo del tóxico se ven afectados. Otro detalle a tener en cuenta son las ventajas y desventajas que presenta la administración de ciertos tóxicos y la elección de la vía de administración de los mismos. Existen diferentes modelos animales que tienen como objetivo principal la inducción de la fibrosis, entre los que destacan los siguientes:

- **Modelo de TAA.** La TAA es un tóxico ampliamente utilizado para la inducción de la fibrosis. Produce una lesión periportal más prominente que otros tóxicos. Suele administrarse de manera repetida, bien por vía intraperitoneal (i.p.), o bien administrado en el agua de bebida. Se necesita un tiempo prolongado para que se produzca una fibrosis significativa, aunque este modelo tiene como ventaja que no es invasivo y requiere una manipulación mínima de los animales (Salguero *et al.*, 2008; Czechowska *et al.*, 2015). Suele utilizarse para provocar colangiocarcinoma y HCC (Newell *et al.*, 2008).

- **Modelo de DMM y DEN.** El DMN y el DEN son compuestos tóxicos que inducen una fibrosis similar a la provocada por el CCl₄. En este caso se suele observar necrosis en la zona periportal y mutagénesis en las células afectadas. Después de varias semanas de administración del DEN, tanto por vía intravenosa como oral, se observa el desarrollo de tabiques fibróticos. También es importante destacar que en este modelo se ha descrito una fibrosis estable o incluso progresiva durante varias semanas después de la interrupción de la intoxicación (Jenkins *et al.*, 1985; Schiffer *et al.*, 2005). Este compuesto no es el más utilizado para la inducción de la fibrosis, si no que suele utilizarse como potencial cancerígeno (Sánchez *et al.*, 2017).

- **Modelo de fibrosis inducido por la dieta.** Las dietas deficientes en algunos compuestos tales como la dieta deficiente en metionina y colina (MCD) o la dieta deficiente en el aminoácido colina (CDAA), han sido utilizadas para la inducción de

fibrosis (Freitas *et al.*, 2016). Estas dietas provocan una esteatosis macrovesicular severa y homogénea, que se acompaña con una inflamación inespecífica. La fibrosis provocada es el resultado de diversos daños hepatocelulares crónicos. En las primeras semanas (6-8), la fibrosis es poco visible, y se mantiene en un periodo prolongado de latencia. Posteriormente, a las 12 semanas, la fibrosis evoluciona rápidamente formando puentes delgados entre zonas vasculares, mientras que la esteatosis se mantiene. Existe una alta incidencia en el desarrollo de HCC cuando las ratas se alimentan crónicamente de la dieta CDAA (Newell *et al.*, 2008). Por otra parte, hay grandes diferencias entre la cepa y la especie utilizada con respecto a la susceptibilidad y la respuesta a la dieta CDAA.

Generalmente, estos modelos animales de fibrosis inducida por la dieta se utilizan en combinación con endotoxinas, alcohol, bajas dosis de toxinas o hierro, entre otros. Se ha observado una aparición más rápida y más severa de esteatohepatitis fibrogénica y más severa cuando se utilizan estas dietas combinadas (Ota *et al.*, 2007).

- **Modelo de ligadura del conducto biliar (BDL).** Es un modelo de fibrosis biliar secundaria. Las ratas son las que mejor están adaptadas a este modelo puesto que carecen de vesícula biliar. La técnica consiste en una laparatomía de la mitad ventral y el aislamiento del conductor biliar por encima del duodeno seguido de dos ligaduras, una por encima del conducto pancreático, y otra por debajo de la unión de los conductos hepáticos; o una ligadura separada de la del conducto biliar de cada lóbulo, para reducir el riesgo de quistes biliares. La porción del conducto biliar entre las dos ligaduras se reseca para evitar la repermeabilización. En los animales control se realiza la laparotomía y la manipulación de la vía biliar, pero sin ligadura. Este modelo también se utiliza en ratones, pero estos desarrollan una marcada dilatación de la vesícula biliar y existe riesgo de perforación (Fickert *et al.*, 2002; Starkel *et al.*, 2011; Colares *et al.*, 2016).

- **Modelo inmunológicamente inducido.** Se realiza mediante la infección de ratones con *Schistosoma mansoni*. Los ratones desarrollan granulomas en el hígado a partir de las 6-8 semanas después de la infección por vía subcutánea (s.c.). El hígado afectado contiene hasta 20 veces más de colágeno que un hígado control y se produce una disminución en la síntesis de albúmina. La administración repetida por vía i.p.,

produce fibrosis hepática con lesión hepatocelular mínima, a través de un proceso inmunológico relacionado con la fase tardía inducida por alérgenos. Se produce una inflamación marcada con infiltración de eosinófilos y mastocitos en el hígado (Baba *et al.*, 2005; Starkel *et al.*, 2011). En estos modelos, los mecanismos de inducción de lesiones y la naturaleza de la respuesta, incluso si conduce a fibrosis, son de tipo inflamatorio e inmune específicos, y los resultados no pueden ser reproducidos en modelos de fibrosis. Sin embargo, se destaca la importancia del componente inmunológico en la fibrogénesis hepática (Starkel *et al.*, 2011; Dudakov *et al.*, 2015; Duval *et al.*, 2015).

- **Modelo de fibrosis inducido por el alcohol.** No es un modelo animal muy extrapolable a humanos, debido a la aversión que tienen los roedores por el alcohol, el rápido metabolismo del mismo y la dificultad en el control de la ingesta nutricional y el alcohol simultáneamente. El modelo consiste en la administración de alcohol *ad libitum* como la única fuente de alimento y bebida. Este tipo de modelo en roedores produce hígado graso, pero no está asociado a una fibrosis significativa (Lieber *et al.*, 1965). Sin embargo, en babuinos se han observado altos niveles de alcohol en sangre asociados a una fibrosis pericelular y perivenular. Esta fibrosis se caracteriza por la presencia de septos y la aparición de cirrosis en un tercio de los animales después de la exposición al alcohol durante 1-3 años (Rubin y Lieber, 1974). La lesión hepática y la fibrosis se inducen de manera reproducible en un intervalo de tiempo relativamente corto, pero la fibrosis es bastante moderada y nunca evoluciona a cirrosis (Tsukamoto *et al.*, 1986; 1990).

- **Modelo de fibrosis asociado a la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).** Es parte del síndrome metabólico y está fuertemente asociado con la obesidad y resistencia a la insulina. Se manifiesta como una inflamación del hígado no asociada al hábito del consumo de alcohol y se considera una complicación hepática del síndrome metabólico (Alam *et al.*, 2016). Cuando la fibrosis empieza a aparecer en los animales tratados, se describe como pericelular y rápidamente evoluciona a cirrosis en algunos animales (Starkel *et al.*, 2011; Neuschwander-Tetri *et al.*, 2015).

- **Modelo de fibrosis en infecciones virales crónicas.** La interacción de los virus de las hepatitis VHC y VHB con su hospedador es extremadamente compleja ya sea por la determinación de los factores virales y del hospedador, o por determinar si la infección es persistente o desaparece. El problema que existe con estos modelos animales es que el virus de la hepatitis humana no es infeccioso en roedores (Boonstra *et al.*, 2009), por ello se ha intentado en modelos de chimpancés (Bissig *et al.*, 2010). En este caso, se ha demostrado que pueden ser útiles para estudiar la infección viral y en algunos casos los efectos citopáticos virales (Meuleman *et al.*, 2006), pero no se ha reportado fibrosis hepática significativa en la mayoría de los estudios (Tanaka *et al.*, 2008).

- **Modelos genéticos.** Los modelos genéticamente modificados se han utilizado para evaluar el papel de los factores específicos en la fibrogénesis. Se ha comprobado un posible papel antifibrótico (o profibrótico) de la modificación genética en el aumento (o disminución) de la fibrosis en un ratón modificado genéticamente, en comparación con otro ratón *wild type* (salvaje) de la camada. Esta variación de la fibrosis podría darse de manera espontánea o como respuesta a un estímulo, y tanto de manera directa como indirecta (Leclercq *et al.*, 2007; Berres *et al.*, 2010). A pesar de las limitaciones, una estrategia de este tipo representa un avance en este campo, ya que proporciona nuevas oportunidades para el estudio de los tipos de células que participan en la fibrogénesis.

- **Modelo de administración de CCl₄.** El CCl₄ es un disolvente químico ampliamente utilizado en la industria. Se trata de una hepatotoxina bien establecida, y es uno de los compuestos más comúnmente utilizados en modelos experimentales para la inducción química de fibrosis hepática en roedores (Ogeturk *et al.*, 2008; Al-Harbi *et al.*, 2014; Garg *et al.*, 2017). El CCl₄ puede inducir necrosis centrizonal y esteatosis. Su administración prolongada da como resultado fibrosis hepática, cirrosis e incluso HCC (Weber *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015; Garg *et al.*, 2017). Se profundizará en mayor medida en este modelo puesto que es el utilizado en el diseño experimental en este estudio.

A lo largo de la historia han sido muchos los investigadores que han trabajado con este compuesto; resumimos a continuación los estudios más representativos:

Adams *et al.*, 1952, realizaron una exposición de CCl₄ a varios grupos de ratas albinas y observó que la mortalidad era mayor, y que presentaban una cirrosis hepática severa acompañada de diversos cambios patológicos. Además, comprobaron una disminución en el peso del hígado, junto con una degeneración grasa moderada.

Shimizu *et al.*, 1973, expusieron a varias ratas a la inhalación de CCl₄ durante 6-8 semanas. Mediante este estudio observaron cómo se producía una acumulación de tejido adiposo, y se producía un aumento gradual de triglicéridos en el hígado. Además, comprobaron la presencia de daño hepático grave en todos los animales tratados.

Sakata *et al.*, 1987, con un experimento similar, observaron que las ratas tratadas presentaban daño hepático crónico. Esto se comprobó con la presencia de superficies hepáticas nodulares, acompañadas de fibrosis extensa.

Ideura *et al.*, 1993, expusieron a las ratas a CCl₄ durante 7 minutos, 3 veces al día, durante 10 semanas. Este diseño experimental permitió observar que las ratas presentaban un hígado con cirrosis y se producía una destrucción de la estructura normal del órgano. Además, se observó una ascitis masiva después de 10 semanas de la exposición, en comparación con los animales control. Las ratas expuestas a CCl₄ durante 6 semanas mostraron un aumento de tejido fibroso en el hígado, mientras que los grupos control mostraban una estructura normal del hígado.

Como se observa en los diferentes diseños experimentales, la exposición a este tóxico se puede realizar de diferentes maneras, ya sea por ingestión, inyección, inhalación o absorción por la piel. Independientemente de la vía de administración, el tóxico se distribuye por todo el cuerpo, presentando elevadas concentraciones en hígado, cerebro, riñón, músculo, grasa y sangre (Ogeturk *et al.*, 2008; Garg *et al.*, 2017).

El CCl₄ provoca daño hepático a través de varias vías (Hung *et al.*, 2006), y también induce la activación de los sistemas inmunitarios a través de la inflamación de las células en la zona de exposición (Mortezaei *et al.*, 2017a, b).

La toxicidad del compuesto se debe a la liberación de radicales libres que se producen en su metabolismo. Se ha demostrado en diversos estudios sobre los mecanismos moleculares inducidos por el CCl_4 , que el radical libre triclorometilo (CCl_3), formado en su metabolismo por la acción del sistema citocromo P450, reacciona rápidamente con el oxígeno molecular para producir el radical peroxilo triclorometilo (CCl_3O_2) (Wang *et al.*, 2005b). Estos radicales altamente tóxicos, son los responsables de los ataques a los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos presentes en la membrana celular, que conducen a la peroxidación de lípidos en los hepatocitos (Recknagel *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 2003; Ogeturk *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2009). Muchos estudios indican que el CCl_4 causa necrosis, fibrosis, infiltración de células mononucleares, esteatosis, degeneración de los hepatocitos, aumento de la actividad mitótica y cirrosis en el hígado (Al-Shabanah *et al.*, 2000; Teocharis *et al.*, 2001; Kus *et al.*, 2005; Garg *et al.*, 2017). Las muestras hepáticas de ratones a los que se les ha administrado CCl_4 muestran un aumento significativo en la deposición de tejido conectivo, así como en la formación de septos fibróticos (Mitra *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015). También se ha comprobado que causa apoptosis en las células hepáticas (Sun *et al.*, 2001; Teocharis *et al.*, 2001; Noyan *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007), así como que induce la activación de las HSCs, generando una mayor expresión de marcadores fibróticos tales como α -SMA y colágeno (Wang *et al.*, 2005a; Hong *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, la vía de administración del tóxico, al igual que la especie utilizada en el diseño experimental, influye en la eficacia de la inducción de la fibrosis. En la Tabla 1 se resumen las ventajas y desventajas que presenta cada tipo de administración, y la eficacia del proceso en cada caso (Starkel *et al.*, 2011).

Tabla 1. Tabla resumen de estudios realizados con modelos animales de fibrosis mediante la administración de CCl₄.

Especie modelo	Detalles prácticos	Tiempo	Descripción fibrosis	Ventajas	Desventajas	Ref
Ratón/rata CCl ₄ i.p.	350-1.000 µL/kg 0,4-2 mL/kg 2-3 veces/sem.	2 sem.	Fibrosis pericentral con septos centrales y centro portales.	Facilmente reproducible. Bien tolerado.	Peritonitis crónica y adhesión peritoneal.	[1] [2]
Ratón CCl ₄ s.c.	1 mL/kg 2 veces/sem.	3-4 sem.	-	-	Necrosis en la zona de inyección. Fibrosis poco consistente.	[3]
Ratón/rata CCl ₄ inhalación	1-2 mL/kg 2-3 veces/sem.	> 6 sem.	-	No invasiva. No hay evidencias de sufrimiento. No hay toxicidad extra-hepática	Manejo profesional del personal. Fibrosis poco consistente.	[3] [4]
Rata CCl ₄ oral	> 1 mL/kg	> 2 sem.	-	-	Alta mortalidad.	[1]

[1] Constandinou *et al.*, 2005. [2] Salguero *et al.*, 2008. [3] Domenicali *et al.*, 2009. [4] Jimenez *et al.*, 1992.

2.4 Mecanismos moleculares de la fibrogénesis

La búsqueda de las posibles dianas terapéuticas que actúan como protección ante agentes tóxicos en el desarrollo de la fibrosis, mediante el uso de modelos animales, es un campo en el que se está investigando constantemente (Ebrahimi *et al.*, 2018). La mayoría de los estudios están diseñados para profundizar en las vías de señalización involucradas en la regresión de la fibrosis hepática, y se utilizan o modelos *in vivo* o modelos *in vitro* (Huang *et al.*, 2017; Jung y Yim, 2017). Sin embargo, no existen modelos que logren reproducir eficazmente la interacción dinámica que se produce entre el daño hepático y la reparación celular. Este proceso depende del equilibrio entre los factores que estimulan la respuesta regenerativa y las sustancias que la inhiben (Rutherford y Chung, 2008). En los siguientes epígrafes se revisa la información relativa a los principales mecanismos moleculares involucrados en la progresión o reversión de la fibrosis.

2.4.1 Estrés del retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo celular cuya función es la síntesis y el plegamiento de las proteínas para el mantenimiento de la homeostasis celular (Hetz *et al.*, 2011; Kaneko *et al.*, 2017). Para que se produzca un plegamiento óptimo, se requiere energía en forma de adenosina trifosfato (ATP), moléculas como el calcio y un entorno oxidante que permita la formación de enlaces disulfuro dentro de la luz del RE (Gaut y Hendershot, 1993). Sin embargo, si estas condiciones se perturban se pierde la capacidad de plegamiento y se acumulan proteínas mal plegadas o defectuosas lo que genera una respuesta de estrés conocida como estrés del RE (Saito, 2014). Si estas condiciones desfavorables continúan, se inician procesos celulares que conducen a la muerte celular programada. Con el objetivo de superar este estrés, las células han desarrollado una serie de respuestas de adaptación que protegen a la célula e inducen la activación de una cascada de señalización que se conoce como respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) (Malhotra y Kaufman, 2007; Janssens *et al.*, 2014). Esta respuesta permite suprimir la síntesis proteica en los ribosomas e inducir la degradación de las

proteínas defectuosas presentes en el RE (Masuyuki *et al.*, 2017). De este modo, se logra proteger a los órganos como el hígado, de los daños externos que causan estrés (Moore y Oakes, 2017).

En los mamíferos, la UPR se activa a través de tres proteínas transmembrana que actúan como sensores del estrés del RE. En primer lugar, se identificó la enzima dependiente de inositol 1 (IRE1), cuya función es la transducción directa de las señales del exterior del RE. Posteriormente fueron descritas la proteína quinasa del RE activada por estrés (PERK) y el factor activador de la transcripción (ATF) 6 (Yoshida, 2007; Hetz *et al.*, 2011).

En condiciones normales, estas proteínas están unidas a la proteína de unión a inmunoglobulinas (BiP), o proteína regulada por glucosa (GRP) 78, que es la encargada de mantenerlas en su estado inactivo. Sin embargo, cuando se produce el estrés del RE, las proteínas desnaturalizadas por el mal plegamiento generado, interaccionan con BiP/GRP78 induciendo su disociación de los sensores del estrés, PERK, ATF6 e IRE1 y provocando la activación de la cascada de señalización de la UPR (Gorman *et al.*, 2012; Zhang y Wang, 2012; Roussel *et al.*, 2013) (Figura 2).

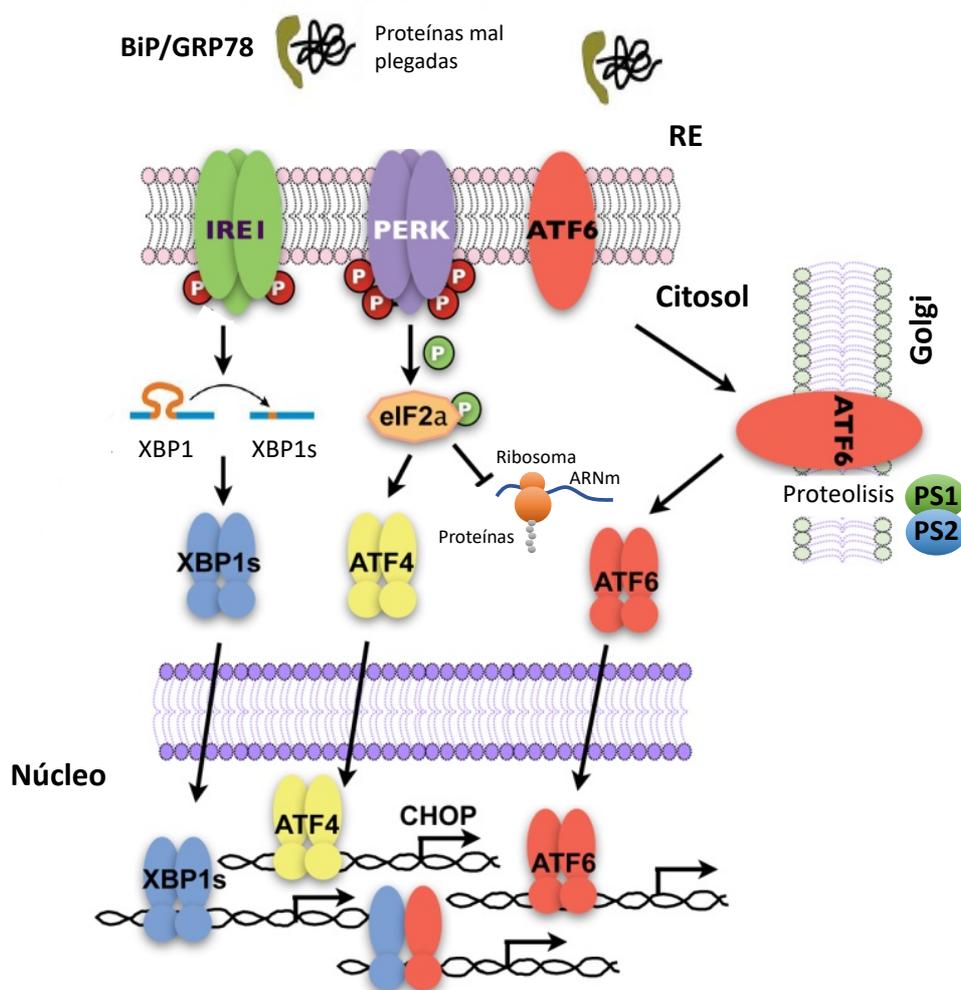


Figura 2. Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). En condiciones de estrés las proteínas mal plegadas interaccionan con la proteína BiP/GRP98 provocando la disociación de los sensores de estrés del RE, IRE1, PERK y ATF6 e induciendo la cascada de señalización a través de las tres vías mediante la interacción de la proteína homóloga a C/EBP (CHOP), que es lo que se conoce como UPR.

En la *vía de señalización de la enzima IRE1*, la proteína sufre una dimerización y una autofosforilación transmembrana en condiciones de estrés (Gardner y Walter, 2011), que estimula su actividad endonucleasa (ARNasa), que cataliza la transformación de la proteína de unión a la X-box tipo 1 (XBP1), desde su forma no procesada transcripcionalmente inactiva, *unspliced form* (XBP1u), a su forma activada, *spliced form* (XBP1s) (Lee *et al.*, 2011). La XBP1s contribuye de un modo más potente que su forma XBP1u con la inducción de la UPR, a través de la expresión de proteínas implicadas en la respuesta, donde se incluyen chaperonas, genes lipogénicos y genes

relacionados con la degradación de proteínas asociada al RE (ERAD). Sin embargo, la XBP1u, por su parte, codifica para una molécula que actúa como inhibidor de la UPR (Tirasophon *et al.*, 1998; Malhi y Kaufman, 2011; Ke y Chen, 2012; Zhang y Wang, 2012; Takayanagi *et al.*, 2013).

En cuanto a la *vía de señalización de ATF6*, en condiciones normales esta molécula se encuentra unida a la membrana del RE (Usui *et al.*, 2012). Sin embargo, cuando se produce estrés en el RE, ATF6 se separa de la proteína BiP/GRP78 y se transloca al aparato de Golgi, donde se activa mediante la escisión del extremo N-terminal, lo que se conoce como proteólisis selectiva, gracias a la acción de las proteasas del sitio 1 y 2 (PS1 y PS2) (Egawa *et al.*, 2011). PS1 actúa en la luz, y PS2 en la membrana del aparato de Golgi (Kaneko *et al.*, 2017). La fracción citosólica de ATF6 que se ha generado, se libera y entra en el núcleo, donde induce la expresión de otras de las proteínas implicadas en la UPR como son XBP1, CHOP, GRP78 y GRP94 (Szegezdi *et al.*, 2006; Malhi y Kaufman, 2011; Ke y Chen, 2012; Zhang y Wang, 2012; Takayanagi *et al.*, 2013).

Por último, en la *vía de señalización de la proteína PERK*, cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés se produce la dimerización y autofosforilación transmembrana de dicha proteína, lo que activa su actividad quinasa, permitiendo la fosforilación de la subunidad α del factor 2 de iniciación de la traducción eucariótico (eIF2 α) y la traducción del ATF4 (Kaneko *et al.*, 2017). El ATF4 induce la activación transcripcional de las chaperonas del RE como CHOP, XBP1, junto con otros genes involucrados en la UPR, el estrés oxidativo y la muerte celular por apoptosis (Acosta-Alvear *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2013).

2.4.2 Autofagia

La autofagia es un proceso altamente conservado en la evolución que tiene como objetivo principal la degradación lisosomal de los orgánulos citoplasmáticos y componentes citosólicos (Wu *et al.*, 2018). Este proceso degradativo está estrechamente regulado por una serie de genes reguladores de la autofagia (Atg), y se

considera un proceso homeostático intracelular vital, a través del cual las proteínas y orgánulos defectuosos se degradan y se reciclan bajo condiciones de hipoxia, escasez de nutrientes u otras condiciones específicas que causen estrés celular (Cao *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018).

La homeostasis celular requiere de un estricto equilibrio entre la síntesis y degradación de macromoléculas (proteínas, lípidos, ADN, ARN, segundos mensajeros, etc.). La degradación de las proteínas se puede llevar a cabo a través de dos vías principalmente: la proteosomal y la autofágica (Klionsky, 2007). La autofagia es responsable no sólo de la degradación de proteínas, sino también del reciclaje y degradación de orgánulos y material citoplasmático (Mizushima y Klionsky, 2007).

Debido a que esta vía fue identificada como un mecanismo de supervivencia inducido por la falta de nutrientes celulares (Pietrocola *et al.*, 2016), juega un papel clave en la limpieza celular eliminando no sólo agregados proteicos, proteínas mal plegadas y orgánulos dañados, sino también patógenos intracelulares (Nishida y Otsu, 2016).

La autofagia está implicada en numerosos procesos celulares, ya que promueve la senescencia celular, protege la inestabilidad del genoma, previene la necrosis y es importante en la prevención de enfermedades como el cáncer, las cardiomiopatías, la diabetes, las enfermedades hepáticas, neurodegenerativas, autoinmunes e infecciones, entre otras (Glick *et al.*, 2010; Arndtz y Hirschfield, 2016; Liberal y Grant, 2016).

Tipos de autofagia

En principio, se había considerado que la macroautofagia, microautofagia y a la autofagia mediada por chaperonas (AMC) (Figura 3), eran los únicos tipos de autofagia existentes en mamíferos encargados de la degradación proteolítica de componentes citosólicos en el lisosoma (Mizushima *et al.*, 2011; Levy *et al.*, 2017). Sin embargo, más recientemente se han descubierto dos nuevos mecanismos denominados “ARNautofagia” y “ADNautofagia” que degradan selectivamente el ARN y ADN dañados (Aizawa *et al.*, 2017).

La macroautofagia se refiere a un proceso autofágico en el cual se degrada la carga citoplásmica en el lisosoma a través de un intermediario. Este, es una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma, formada a partir de una membrana de aislamiento, el fagóforo, que secuestra una pequeña porción de citoplasma. Una vez formado, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar un autofagolisosoma (Towers y Thorburn, 2016).

En la microautofagia, por el contrario, los componentes citosólicos son directamente captados por el lisosoma mediante invaginación de la membrana lisosomal (Levy *et al.*, 2017).

La AMC, por su parte, no implica reorganización de la membrana, es decir, las proteínas diana son translocadas a través de la membrana lisosomal en un complejo con proteínas chaperonas que son reconocidas por el receptor lisosomal de membrana asociado a la proteína de membrana lisosomal (LAMP), provocando su desplegamiento y posterior degradación.

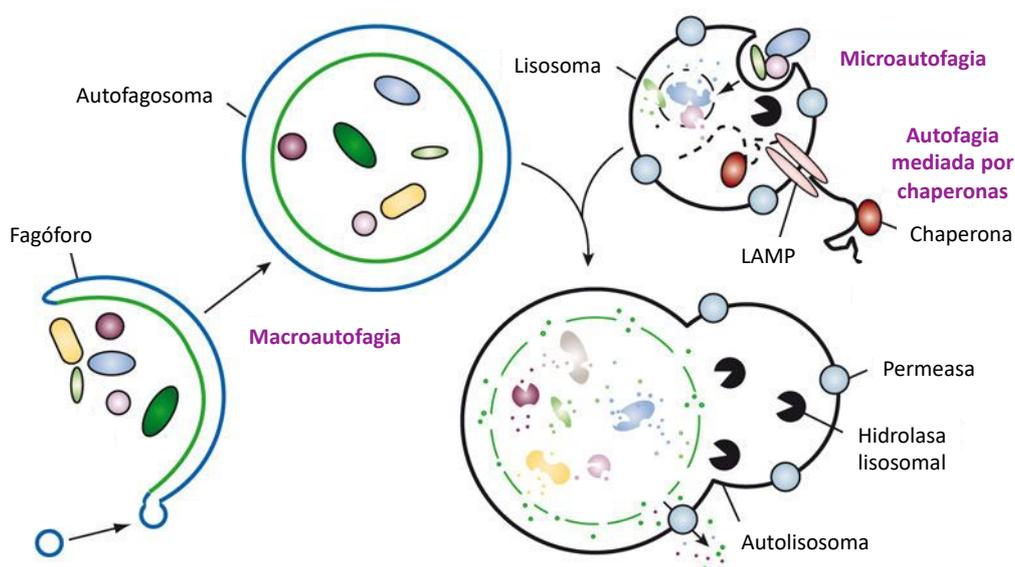


Figura 3. Diferentes tipos de autofagia. Macroautofagia, proceso degradativo realizado mediante la formación del autofagosoma, que posteriormente se fusiona con el lisosoma. Microautofagia, proceso realizado a través de la invaginación directa del material. Autofagia mediada por chaperonas (AMC), mecanismo en el que están implicados el receptor LAMP y las chaperonas.

La ARNautofagia y ADNautofagia son dos mecanismos de autofagia en los que el ARN y el ADN, respectivamente, son tomados directamente por los lisosomas y posteriormente degradados. La proteína LAMP, se une al ARN y al ADN actuando como activador de la cascada de señalización de ambas vías (Fujiwara *et al.*, 2013a, b; Aizawa *et al.*, 2017).

La macroautofagia es el tipo de proceso degradativo mejor caracterizado (Deretic y Levine, 2009; Wu *et al.*, 2018) que desempeña un papel clave en la prevención de enfermedades (Masui *et al.*, 2016), por lo que nos centraremos en este tipo de autofagia, haciendo referencia a ella con el término general de “autofagia”.

El proceso autofágico comienza con la formación de una membrana de aislamiento denominada fagóforo, cuyo origen en mamíferos ha sido conocido en los últimos años. Se ha descubierto que la formación de los autofagosomas se inicia en el lugar de contacto entre el RE y la mitocondria (Hamasaki *et al.*, 2013). El fagóforo se expande para invaginar la carga citoplasmática, que queda englobada en una estructura de doble membrana denominada autofagosoma. El contenido del autofagosoma madura mediante la fusión de su membrana externa con el lisosoma, produciéndose la degradación de la carga intracelular y de su membrana interna gracias a las proteasas lisosomales, que, junto con los transportadores, son los encargados de expulsar al citoplasma los productos de degradación. Por tanto, la autofagia puede ser considerada un proceso de reciclaje del metabolismo, que contribuye a restaurar la homeostasis y a la renovación celular mediante la formación de nuevas macromoléculas (Kroemer *et al.*, 2010; Levy *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018).

Existen diversos genes Atg que llevan a cabo este complejo proceso molecular que consta de cinco etapas clave (Levy *et al.*, 2017) (Figura 4):

1. Formación del fagóforo.
2. Conjugación de los complejos: Atg12-Atg5-Atg16L1 y la proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3 (LC3)-PE.
3. Activación de LC3 y su inserción en la membrana del fagóforo.

4. Captura de la carga selectiva para su posterior degradación.
5. Fusión del autofagosoma con el lisosoma.

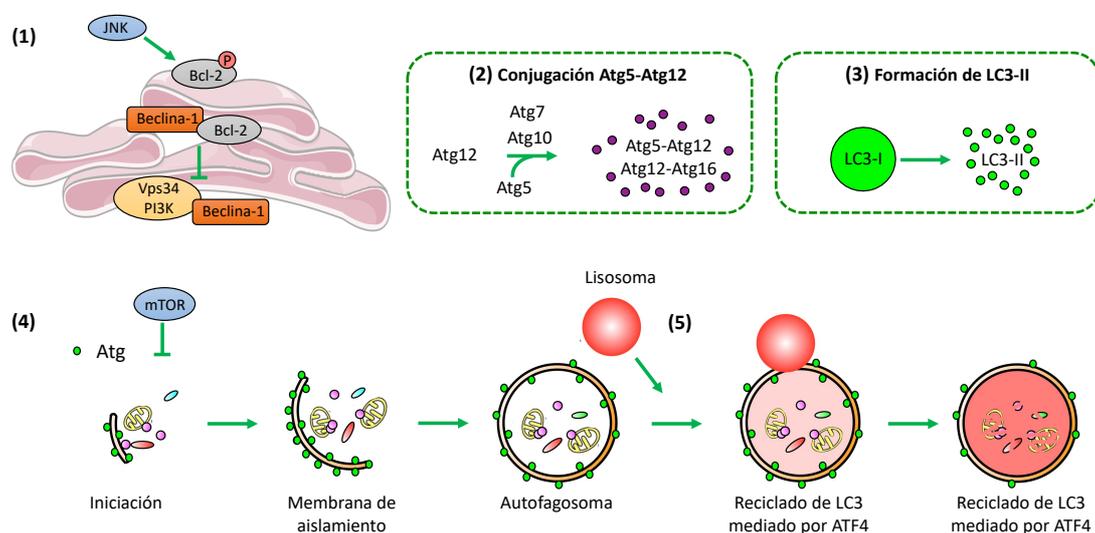


Figura 4. Proceso molecular de la autofagia. 1. Formación del fagóforo; 2. Conjugación de los complejos tipo ubiquitina; 3. Procesado de LC3 y su inserción en la membrana del fagóforo; 4. Captura de la carga selectiva para su posterior degradación; 5. Fusión del autofagosoma con el lisosoma.

1. Formación del fagóforo

En células de mamífero, el proceso de formación de la membrana del fagóforo se inicia gracias a la acción del marcador de preautofosomas Atg14 que se encuentra anclado en la zona de contacto entre el RE y la mitocondria en condiciones de déficit de nutrientes (Hamasaki *et al.*, 2013). La elongación del fagóforo es un proceso regulado por un gran número de complejos macromoleculares, que comienza con la activación del complejo de la quinasa activadora de la autofagia similar a Unc-51 (ULK) (Egan *et al.*, 2015). Este complejo incluye a las proteínas ULK1, ULK2, la proteína de la autofagia 13 en mamíferos (mAtg13) y a la proteína de 200 kDa de interacción con la familia de las quinasas de adhesión (FIP200) (McAlpine *et al.*, 2013; Levy *et al.* 2017).

La vía de señalización de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR)1, regula directamente el complejo ULK mediante la fosforilación de mAtg13, ULK1 y ULK2. En condiciones favorables de nutrientes, las quinasas ULK1 y ULK2 fosforilan a mAtg13

y FIP200 suprimiendo la expansión de la membrana autofágica. Sin embargo, en condiciones de déficit de nutrientes, la desfosforilación del complejo ULK induce la activación del proceso autofágico (Hosokawa *et al.*, 2009) (Figura 5).

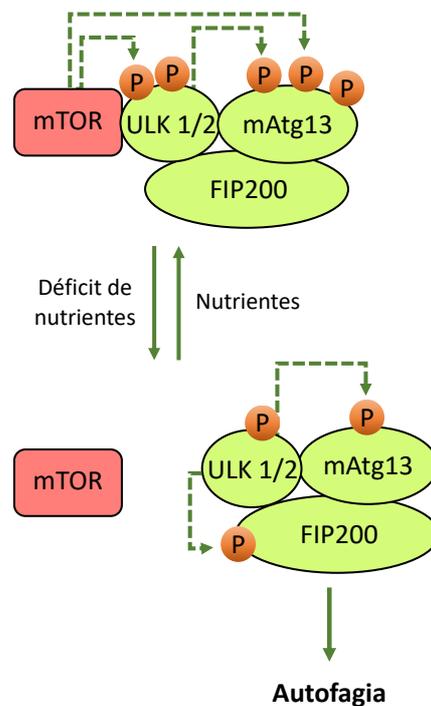


Figura 5. Regulación de la autofagia mediada por mTOR mediante la fosforilación de los complejos ULK. mTOR fosforila a las quinasas ULK1, ULK2, mAtg13 y FIP200 en presencia de nutrientes, mientras que, cuando existe un déficit, la desfosforilación del complejo provoca la activación de la autofagia.

La fosforilación del complejo ULK induce la formación de vesículas autofágicas a través de la activación de otro de los complejos multiprotéicos de la familia de las fosfatidil inositol-3 quinasas (PI3K) de clase III, donde destaca la proteína vacuolar tipo 34 (Vps34), Beclina-1 y Atg14 (Towers y Thorburn, 2016). Vps34 es la principal fuente de fosfatidil inositol-3-fosfato (PI3P) durante la autofagia, esencial para la formación y elongación del fagóforo, así como para el reclutamiento de otras proteínas Atg (Xie y Klionsky, 2007; Devereaux *et al.*, 2013). El gen asociado a la resistencia a la radiación ultravioleta (UVRAG), es el encargado de unir los componentes del complejo Vps34-

Beclina-1 para formar el complejo. Atg14 se localiza en el fagóforo y, a diferencia de UVRAG, presente sobre todo en endosomas tardíos, es esencial desde las fases tempranas del proceso para la formación del autofagosoma. Una sobreexpresión de Atg14 estimula la actividad de la proteína Vps34 e induce autofagia, en condiciones desfavorables de nutrientes. Por tanto, el complejo Vps34-Beclina-1 tiene al menos dos funciones diferentes, en función de la disponibilidad energética, según se unan a Atg14 o UVRAG (Itakura y Mizushima, 2009; Klionsky *et al.*, 2016) (Figura 6).

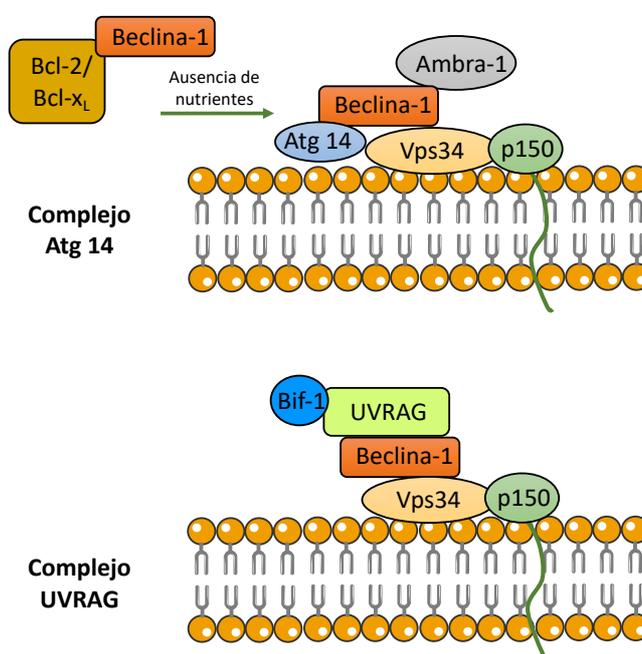


Figura 6. Complejos de las PI3K de clase III. En ausencia de nutrientes se forma el complejo Vps34-Beclina-1 con Atg14. Sin embargo, cuando las condiciones son favorables, este complejo se forma con UVRAG.

Existen otras proteínas reguladoras de la autofagia, la endofilina B1 (Bif-1) y la molécula activada en autofagia regulada por Beclina-1 (AMBRA-1), que actúan induciendo el mecanismo autofágico (Levy *et al.*, 2017). La Bif-1 interactúa con el gen del linfoma de células B2 (Bcl-2) a través de UVRAG y funciona como un inductor de quinasas PI3K de clase III. En respuesta a la ausencia de nutrientes, Bif-1 se sitúa en los autofagosomas promoviendo su formación (Fimia *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007). Las moléculas como Bcl-2 actúan como reguladores negativos de la autofagia debido a que, al unirse con Beclina-1, logran inhibir el proceso autofágico.

2. Conjugación de los complejos de tipo ubiquitina.

En esta etapa son esenciales dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina. En el primero, Atg12 se une covalentemente a Atg5 y juntos forman un complejo con Atg16, el cual se sitúa en el exterior de la membrana del autofagosoma. El segundo sistema ubiquitina, por su parte, lo constituye la LC3, que se une a la fosfatidiletanolamina (PE) en la membrana interna y externa del autofagosoma (Klionsky *et al.*, 2016). A diferencia del complejo Atg12-Atg5-Atg16, que es reciclado, el complejo LC3-PE permanece asociado con la membrana interna del autofagosoma convirtiéndose en un importante marcador de autofagia (Kroemer *et al.*, 2010; Mehrpour *et al.*, 2010). La conjugación de Atg5-Atg12 no depende de la activación de la autofagia, y una vez que el autofagosoma está formado, el complejo Atg12-Atg5-Atg16 se disocia de la membrana haciendo que el conjugado Atg5-Atg12 actúe como otro marcador clave en la autofagia (Barth *et al.*, 2010) (Figura 7).

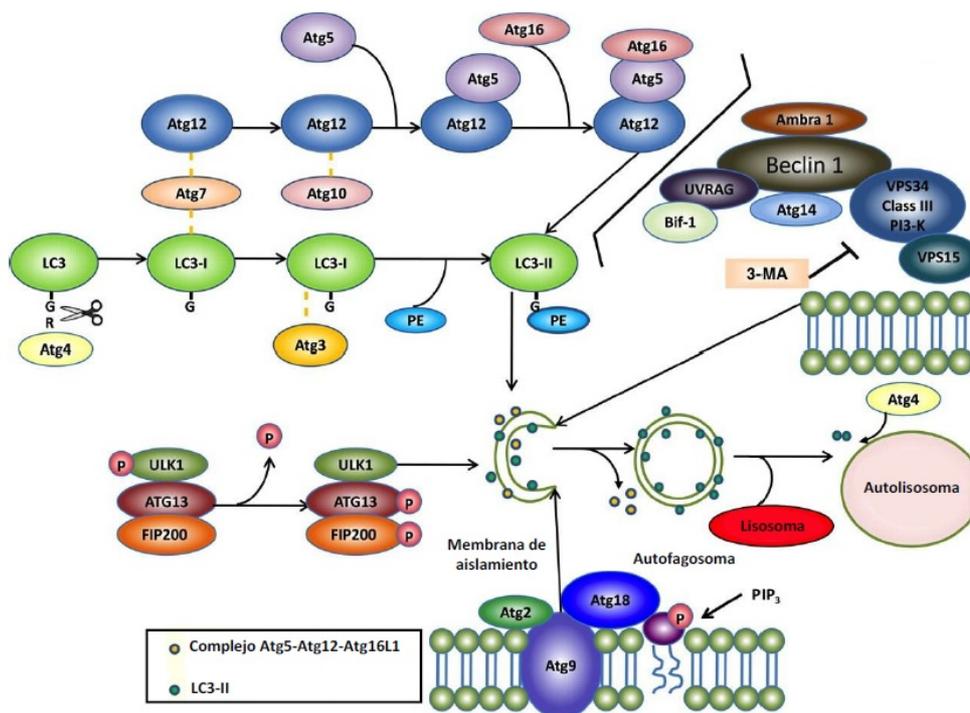


Figura 7. Conjugación de los complejos tipo ubiquitina. Atg12 se une a Atg15 y posteriormente a Atg16 para formar el complejo Atg12-Atg15-Atg16. El otro complejo tipo ubiquitina lo forman LC3 y la PE.

3. Activación de LC3

LC3 es una proteína citosólica que se escinde por Atg4 para generar su forma activada, LC3-I. Posteriormente, se conjuga gracias a la acción de Atg13 para generar LC3-II (Figura 8). LC3-II se puede localizar tanto en la membrana interna como en la externa del autofagosoma donde interviene en la fusión de las membranas, o bien se encarga de seleccionar la carga para su posterior degradación. Debido a que la síntesis y el procesamiento de LC3 se encuentran aumentados durante la autofagia, convierten a esta molécula en un marcador clave de los niveles de autofagia celular (Barth *et al.*, 2010; Klionsky *et al.*, 2016). Una vez formado el autofagosoma, LC3-II es eliminada de su membrana (Fujita *et al.*, 2008).

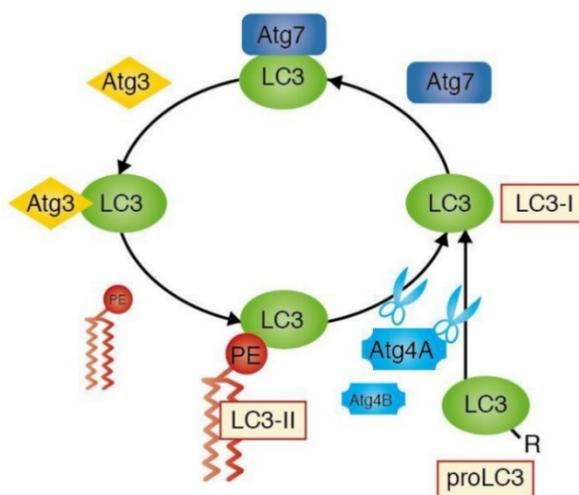


Figura 8. Procesado de LC3. LC3 es escindida por Atg14 para formar LC3-I. Esta forma activada se conjuga a través de Atg13 para unirse a la PE y formar el complejo.

4. Selección del contenido a eliminar

La degradación de proteínas citosólicas no es un proceso aleatorio, sino que es mediado por la proteína p62 o sequestrosoma-1 (p62/SQSTM1) (Bjørkøy *et al.*, 2005). Esta proteína multifuncional tiene la capacidad de capturar proteínas ubiquitinadas y fijarlas a la LC3-II en el autofagosoma (Klionsky *et al.*, 2016). La interacción entre las

proteínas p62 y LC3-II, junto con otras proteínas que intervienen en el proceso, permite la autofagia selectiva de moléculas ubiquitinadas solubles y agregados proteicos (Abounit *et al.*, 2012).

5. Fusión con el lisosoma

Una vez seleccionada la carga a eliminar, los autofagosomas se fusionan con los endosomas y los lisosomas facilitando de este modo la degradación de su contenido (Figura 9). Posteriormente, se produce la maduración del autofagosoma y su fusión con el lisosoma (Tumbarello *et al.*, 2012; Levy *et al.*, 2017).

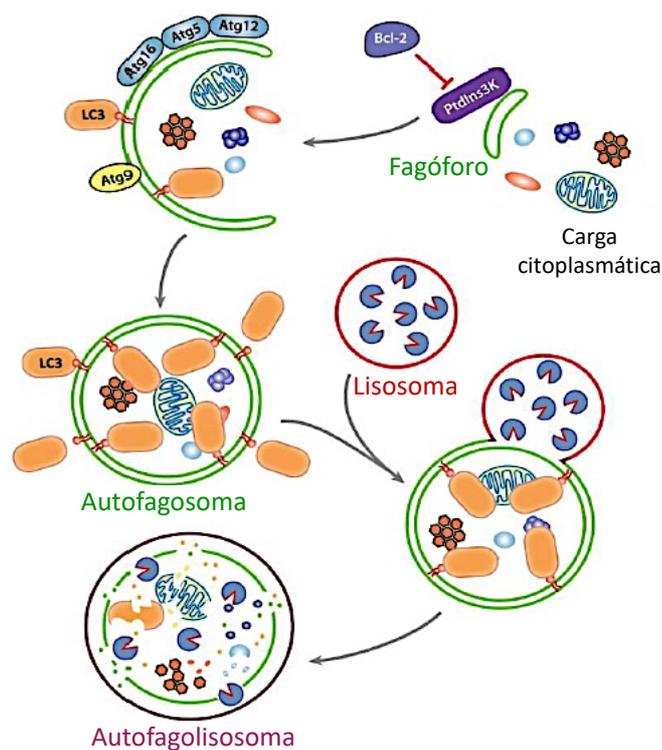


Figura 9. Fusión del autofagosoma con el lisosoma. El autofagosoma con la carga a eliminar, madura para fusionarse con el lisosoma, lo que constituye la última fase del proceso de la autofagia.

Autofagia y estrés del retículo endoplasmático

En los últimos años se ha comprobado la existencia de una estrecha relación entre la autofagia y el estrés del RE (Li et al., 2017) aunque generalmente la autofagia siempre se había asociado a la apoptosis o mecanismo de muerte celular programada. Esto se debe, en parte, a que cuando se ejerce un daño persistente en la célula, los orgánulos comienzan a verse afectados y se induce la respuesta autofágica como último mecanismo de defensa de la célula para protegerse (Hong et al., 2018). De manera similar ocurre con el estrés del RE, que se activa ante el daño generado en los orgánulos, por el acúmulo de proteínas mal plegadas en su luz. Se trata de un importante mecanismo cuya función principal es mantener la fisiología de las células sanas mediante la disminución de la síntesis de proteínas a través de la UPR, manteniendo la homeostasis (Schröder, 2008; Kaneko et al., 2017). A pesar de la compleja relación que existe entre la activación del estrés del RE y la autofagia, cada vez son más numerosos los hallazgos que confirman la interconexión que existe entre ambos procesos. La autofagia es activada tras la respuesta al estrés del RE, como mecanismo de defensa para la supervivencia, y algunos grupos han descrito la existencia de una relación directa entre los tres sensores de la UPR y la formación de autofagosomas en la autofagia (Ogata et al., 2006; Ding et al., 2007; Sir et al., 2008) (Figura 10).

La autofagia inducida por el estrés del RE juega un papel fundamental en la conservación de la homeostasis aliviando el estrés celular, ya que el RE está relacionado con los dos principales procesos de degradación en células eucariotas: el sistema ubiquitina-proteasoma y la vía de la autofagia-lisosoma (Rubinsztein, 2006; Li et al., 2017b). Tanto el estrés extracelular como el intracelular pueden inducir autofagia, permitiendo que el organismo se adapte o sobrepase estas condiciones desfavorables. En diversos estudios se ha comprobado la importancia que tiene la regulación de los mecanismos moleculares que modulan la autofagia en respuesta a diferentes señales de estrés del RE en el tratamiento de alteraciones hepáticas (He y Klionsky, 2009; Li et al., 2017b).

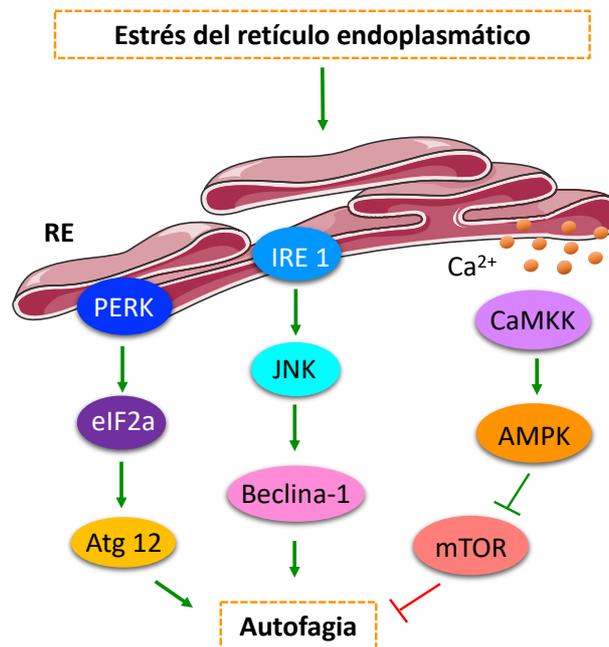


Figura 10. Autofagia mediada por el estrés del RE. Las proteínas sensoras del estrés del RE, PERK e IRE1 activan la cascada de señalización que induce la activación del proceso autofágico.

La vía de la autofagia y el estrés del RE en la fibrosis

Estudios recientes indican que la autofagia es una vía reguladora en la fibrosis hepática, con efectos profibrogénicos relacionados con una contribución directa de la activación de las HSCs (Mallat *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2018). Aunque la autofagia es un mecanismo que se activa como medida de protección ante la lesión hepática crónica (Mallat *et al.*, 2014), la inducción del proceso autofágico puede suministrar la energía necesaria para la activación de las HSCs, mediante la administración de triglicéridos y otros componentes en las gotas lipídicas de los autofagosomas a los lisosomas para la degradación (Hernández-Gea *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014a, b; Hong *et al.*, 2018). Además, existen investigaciones que constatan que la inhibición de la autofagia logra disminuir el acúmulo de proteínas de la MEC y por lo tanto frena la progresión de la fibrogenesis (Dong *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018).

Debido a la estrecha relación que existe entre la activación del proceso autofágico y el estrés del RE, se ha comprobado que la activación de la UPR ante un

estrés induce la actividad fibrogénica de las HSCs a través de la autofagia (Hernández-Gea *et al.*, 2013), así como que su inhibición contribuye a la mejora de la fibrosis en órganos como el pulmón (Patel *et al.*, 2012).

2.4.3 Vía de los esfingolípidos

Los esfingolípidos son componentes muy importantes de las membranas celulares que incluyen en su estructura las denominadas bases esfingoides, conocidas también como bases de cadena larga o esfingosinas (Pruett *et al.*, 2008). Inicialmente, bajo el término esfingolípidos se incluían todos aquellos lípidos derivados de la esfingosina (Carter *et al.*, 1947). Actualmente se definen como componentes funcionales y dinámicos que, además de su papel estructural en las células eucarióticas, (Futerman y Hannun, 2004) intervienen en aspectos cruciales de su actividad celular a través de la transducción de señales (Dickson, 2008) y del transporte intracelular (Kurz *et al.*, 2018). Los esfingolípidos desempeñan funciones importantes en la célula, como la regulación de los procesos de muerte celular, la proliferación, diferenciación, senescencia, inflamación y transformación, entre otros (Zeidan y Hannun, 2007; Zheng *et al.*, 2018). Debido a que promueven tanto la muerte celular como la supervivencia, son determinantes en la progresión de enfermedades como las degenerativas o el cáncer (Cuvillier, 2008; Ruckhäberle *et al.*, 2009; Coant y Hannun, 2018; Nagahashi *et al.*, 2018a).

La esfingosina 1-fosfato (S1P), se considera uno de los componentes centrales de la vía, que actúa como un potente mediador lipídico bioactivo sintetizado a partir del sustrato esfingosina, por la esfingoquinasa (SphK)-1. Esta proteína está principalmente localizada en el citosol, mientras que la SphK2, está presente en diversos orgánulos celulares (Maceyka *et al.*, 2012; Kunkel *et al.*, 2013; Hatoum *et al.*, 2017). La SphK1 es la isoforma predominante de la enzima en la mayoría de células y cataliza la formación de S1P, clave en la regulación de diversos procesos celulares importantes para la salud y la enfermedad (Hait *et al.*, 2009; Arish *et al.*, 2017; Yuza *et al.*, 2018). El mantenimiento de los niveles de S1P constantes se realiza gracias a las SphKs, enzimas encargadas de su

síntesis, y a las enzimas que la degradan, donde se incluyen la esfingosina 1-fosfato liasa (S1PL), dos fosfatasas específicas de S1P 1 y 2 (SPP1-2) y tres fosfatasas de fosfato de lípidos 1-3 (LPP1-3) (Maceyka *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2017) (Figura 11).

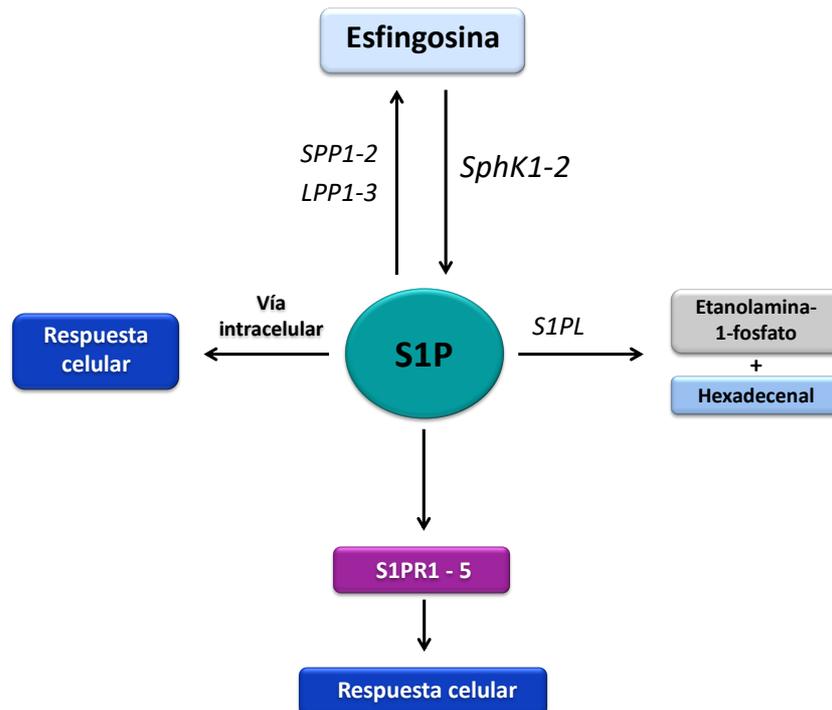


Figura 11. Esquema de la vía de la S1P/SphK1. El sustrato esfingosina se transforma en S1P por la acción de las SphKs, para unirse a sus receptores (S1PR1-5). La S1P puede ser degradada por la S1PL formando etanolamina-1-fosfato y hexadecenal.

La S1P participa en multitud de vías de señalización iniciadas por citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y sus receptores, tales como TGF- β , PDGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), VEGF, factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), receptores de tipo *Toll* (TLR), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y receptores activados por proteasas (PAR-1), entre otros. La S1P funciona como un mensajero extracelular e intracelular (Zhang *et al.*, 2013), que ejerce diferentes funciones

biológicas dependiendo de donde se genere y la SphK implicada en su metabolismo (Schwalm *et al.*, 2013).

Se ha identificado una familia de receptores de S1P (S1PR), clave en la regulación de la vía, así como múltiples moléculas diana intracelulares que tienen una gran influencia, lo que ha favorecido la comprensión de la amplia gama de acciones que ejerce la S1P (Spiegel y Milstien, 2000; Xia y Wadham, 2011; Adada *et al.*, 2015; Pyne *et al.*, 2016). Para unirse a sus receptores, la S1P tiene que ser transportada a través de la membrana plasmática. Esta acción la realizan los transportadores dependientes de ATP (ABC), a los que se une la S1P (Yamada *et al.*, 2018) y que han sido identificados en diferentes líneas celulares, como el miembro C de la subfamilia ABC (ABCC1) en mastocitos (Mitra *et al.*, 2006), el miembro A1 de la subfamilia ABC (ABCA1) en astrocitos (Sato *et al.*, 2007), o ABCC1 y el miembro C2 de la subfamilia ABC (ABCG2) en células de cáncer de mama (Takabe *et al.*, 2010). Además, existe otro transportador específico de S1P que se ha encontrado en diferentes tejidos, incluido en hígado, que es el homólogo spinster 2 (Spns2) (Hisano *et al.*, 2011; Fukuhara *et al.*, 2012). Cuando la S1P se exporta desde la célula a través de estos transportadores, se une a sus receptores específicos acoplados a la proteína G, S1PR1-5, para regular diferentes procesos celulares a través de una señalización autocrina y/o paracrina. Los receptores S1PR1, S1PR2 y S1PR3 se expresan por un gran número de tejidos, donde se incluye el hígado (Figura 12), mientras que la expresión del receptor S1PR4 se limita al tejido hematopoyético y linfoide, y la expresión del receptor S1PR5 al sistema nervioso central (Sánchez y Hla, 2004).

La activación de los receptores de S1P conduce a una serie de respuestas celulares, como la formación de MEC, la proliferación, la estimulación de uniones adherentes, la inhibición de la angiogénesis, la apoptosis, la inmunidad o el tráfico de linfocitos, entre otros (Kee *et al.*, 2005; Brunati *et al.*, 2008; Aoki *et al.*, 2016). Las SphKs, a su vez, se activan mediante numerosos estímulos que incluyen citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión intercelular (Rivera *et al.*, 2008).

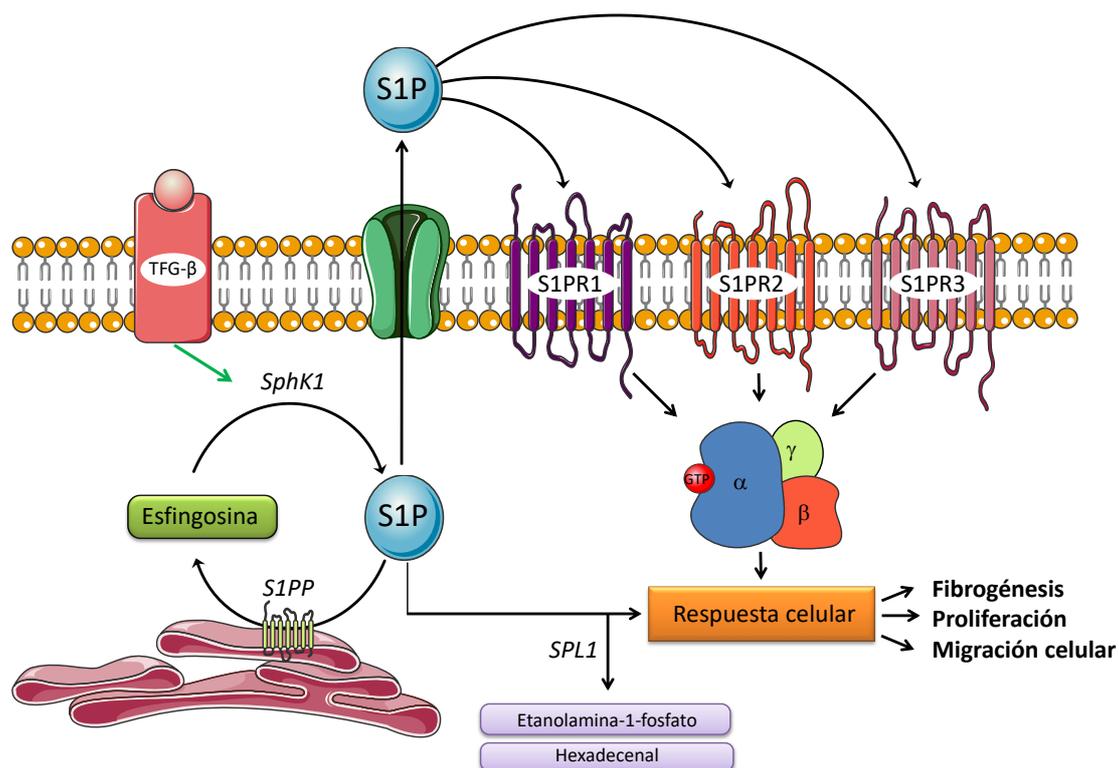


Figura 12. Esquema de la vía de señalización S1P/SphK1 en la célula hepática. La S1P tras ser sintetizada por la SphK1, puede inducir directamente una respuesta celular o ser exportada para unirse a sus receptores específicos (S1PR1-3).

La S1P se considera un importante mediador en la red de citoquinas, de hecho, un amplio número de estas y otros agonistas pro o antiinflamatorios actúan, al menos en parte, a través de ella (Xia y Wadham, 2011). Debido a esta función, tiene un papel crucial en la regulación de importantes procesos biológicos, tales como el crecimiento, la diferenciación y la motilidad celular (Donati *et al.*, 2013).

Una gran parte de la investigación sobre los esfingolípidos, se ha enfocado en el conocimiento de la vía de señalización de S1P a través de sus receptores (Nagahashi *et al.*, 2018b). Estudios recientes sugieren que los receptores de S1P pueden ser objetivos potenciales para el desarrollo de tratamientos eficaces, no solo de los trastornos del endotelio arterial, sino también de la disfunción microvascular por lesiones isquémicas o inflamatorias (Sánchez, 2016; Nagahashi *et al.*, 2018a). Además, la unión de la S1P a sus receptores induce, en parte, la disfunción endotelial a través de la inhibición de la

vía de señalización PI3K/AKT (Liu *et al.*, 2016). Los moduladores de los S1PRs, también constituyen un nuevo enfoque que podría ser prometedor para el tratamiento de una amplia variedad de trastornos inflamatorios (Pyne *et al.*, 2016), incluidas las enfermedades inflamatorias intestinales (Crespo *et al.*, 2017; Nielsen *et al.*, 2017). La modulación de la vía S1P/SphK1 podría ser útil para el tratamiento de la patología de resistencia a la insulina, la progresión de la diabetes tipo 2 (Fayyaz y Kleuser, 2014; Ng *et al.*, 2017) o el desarrollo de cáncer, entre otros (Evangelisti *et al.*, 2016; Hatoum *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2017; Ogretmen, 2018).

La vía de los esfingolípidos y la fibrosis hepática

Diferentes estudios han demostrado que el sistema S1P es crucial en la regulación de la fibrosis en numerosos órganos (Zhang *et al.*, 2018). Esto se debe a que los receptores S1PR1-3, las SphKs y la S1P juegan un papel crucial en la diferenciación de fibroblastos (Kono *et al.*, 2007), en la producción de colágeno (Gellings Lowe *et al.*, 2009), o en la transdiferenciación de mioblastos a miofibroblastos (Cencetti *et al.*, 2010), lo que contribuye al desarrollo de la fibrosis hepática. Además, también se ha comprobado que la S1P induce la proliferación y la migración de las HSCs (Ikeda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2016).

En los últimos años, numerosos estudios han demostrado que la S1P actúa como un factor determinante en el desarrollo de la fibrogénesis hepática, debido a su capacidad para inducir la expresión de proteínas de la MEC (Li *et al.*, 2009, 2011; Zhang *et al.*, 2018).

Los niveles de S1P en el hígado fibrótico humano aumentan a través de la regulación positiva de las SphKs, independientemente de la etiología de la fibrosis. Se ha comprobado que existen asociaciones significativas entre los metabolitos de esfingolípidos sanguíneos y la etapa de fibrosis hepática en la que se encuentran los pacientes, lo que convertiría a la S1P en un posible biomarcador para la identificación del HCC en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas (Grammatikos *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2016b; Kurz *et al.*, 2018).

Aunque hay estudios que afirman que la S1P participa en la deposición de colágeno de una forma independiente de sus receptores (Xiu *et al.*, 2015), se ha demostrado la contribución de estos en el efecto profibrogénico de S1P, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* de fibrosis hepática, así como en pacientes con fibrosis avanzada (Schwalm *et al.*, 2013; Takuwa *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2016b; Nagahashi *et al.*, 2018).

Algunos estudios *in vivo* e *in vitro* han comprobado que existe una importante relación entre el desarrollo de la fibrogénesis y la activación de otras vías como la autofagia (Lee *et al.*, 2015) o el estrés del RE (Allen y Seo, 2018). La regulación a la baja del proceso autofágico, disminuye la expresión de los marcadores fibróticos (Patel *et al.*, 2012), y se ha demostrado que la sobreexpresión de la S1PL atenúa los niveles de S1P inducidos por el daño (Taniguchi *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2017). Debido a ello, la autofagia mediada por S1P se ha identificado como una importante vía en la regulación de la fibrosis hepática (Tatler y Jenkins, 2015).

En resumen, la participación del eje S1P en los mecanismos patogénicos relacionados con el proceso fibrótico lo convierte en una diana farmacológica deseable que podría ser útil para el tratamiento de pacientes con fibrosis hepática.

2.4.4 Ritmos circadianos

Los ritmos circadianos son oscilaciones de las variables biológicas en intervalos regulares de tiempo, que tienen influencia en nuestra actividad metabólica, hormonal y conductual diaria. Se encuentran en la mayoría de los seres vivos, incluidos los animales (Guerrero-Vargas *et al.*, 2017), las plantas (Singh y Mas, 2018) y muchos microorganismos (Ananthasubramaniam *et al.*, 2018). Los ciclos diarios de la fisiología y el comportamiento, son impulsados por un oscilador endógeno con un período de aproximadamente 24 horas (Reppert y Weaver, 2002; Schibler y Sassome-Corsi, 2002). Un amplio espectro de parámetros fisiológicos, que incluyen el ciclo sueño-vigilia, la secreción de hormonas, el latido cardíaco, el flujo sanguíneo o la temperatura corporal, se encuentran regulados por estos ciclos diarios (Martinek *et al.*, 2001; Damhoff y

Huecker, 2018). Estos ritmos se establecen por la actividad transcripcional de un grupo de genes conocidos como genes reloj o genes *Clock*, quienes se expresan rítmicamente en multitud de tejidos como el cerebro o el hígado entre otros (Hardin, 2004; Shetty *et al.*, 2018).

En los mamíferos, los ritmos circadianos son generados por un reloj biológico, localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del sistema nervioso central (Reppert y Weaver, 2002), y por relojes periféricos localizados en las células de los diferentes tejidos (Hardin, 2004; Firsov y Bonny, 2018).

Este reloj es el responsable, entre otras funciones, de la sincronización de las señales ambientales que generan los ritmos circadianos y de las oscilaciones periféricas diarias que se producen en los tejidos (Fu y Lee 2003). Está compuesto por dos bucles de retroalimentación transcripcionales intracelulares, que miden y regulan estos patrones de oscilación constantes (Reppert y Weaver, 2002; Lesicka *et al.*, 2018).

Aunque los ritmos circadianos internos en los mamíferos se conocen desde hace siglos (Clairambault, 2010), la naturaleza molecular de estas oscilaciones y los mecanismos implicados se han descrito recientemente (Hastings *et al.*, 2003; Kettner *et al.*, 2016).

En los últimos años, se ha identificado la influencia que tienen los ritmos circadianos en la regulación de muchos procesos moleculares, fisiológicos, bioquímicos y conductuales (Kang y Sancar, 2009; Innominato *et al.*, 2010). Estos juegan un papel clave en la regulación del metabolismo y la detoxificación de fármacos (Cho *et al.*, 2012; Guerrero-Vargas *et al.*, 2017), el ciclo celular (Bieler *et al.*, 2014; Matsu-Ura *et al.*, 2016; El-Athman *et al.*, 2017), la apoptosis y la angiogénesis entre otros muchos procesos (Takahashi *et al.*, 2008; Jouffe *et al.*, 2013; Lesicka *et al.*, 2018).

En mamíferos, debido a la ritmicidad que posee el metabolismo celular, puesto que el catabolismo y anabolismo están sincronizados con los ciclos de luz/oscuridad, todas las hormonas y metabolitos implicados en el proceso presentan una expresión cíclica y constante. Se ha comprobado que muchos de estos genes metabólicos tienen un pico de expresión máxima que varía a lo largo del ciclo de 24 horas (Ma *et al.*, 2012;

Zhu *et al.*, 2018). Es por ello que, debido a la disponibilidad energética que posee la célula en ciertos periodos específicos del día, procesos como la proliferación celular están controlados de manera directa por los ritmos circadianos (Mormont *et al.*, 2003).

La desregulación del reloj circadiano, ocasionada por daños externos o por mutaciones en modelos animales, o por los cambios en los turnos de trabajo en humanos, se asocia con una mayor predisposición al desarrollo de enfermedades en múltiples órganos (Hardin, 2004; Antle y Silver, 2005; Guerrero-Vargas *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017a). A su vez, muchos procesos patológicos como el Alzheimer, el Parkinson, la obesidad, la diabetes o la hipertensión están influidos por las expresiones circadianas de los genes *Clock* en múltiples tejidos periféricos (Duffield *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2002; Lemmer y Oster, 2018; Wang *et al.*, 2018).

El mecanismo molecular del reloj circadiano central y los osciladores circadianos periféricos, se componen de dos bucles de retroalimentación interconectados que regulan la transcripción rítmica de los genes reloj (Partch *et al.*, 2014). La primera de las asas de retroalimentación está formada por los activadores transcripcionales, el receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo (BMAL1) junto con CLOCK (de sus siglas en inglés *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) (Ruan *et al.*, 2012). Estos forman un heterodímero (BMAL1/CLOCK) que activa la transcripción de los genes *Periodo* (PER1, PER2 y PER3) y de los genes del criptocromo (CRY1 y CRY2) (Ko y Takahashi, 2006; Pett *et al.*, 2018) (Figura 13).

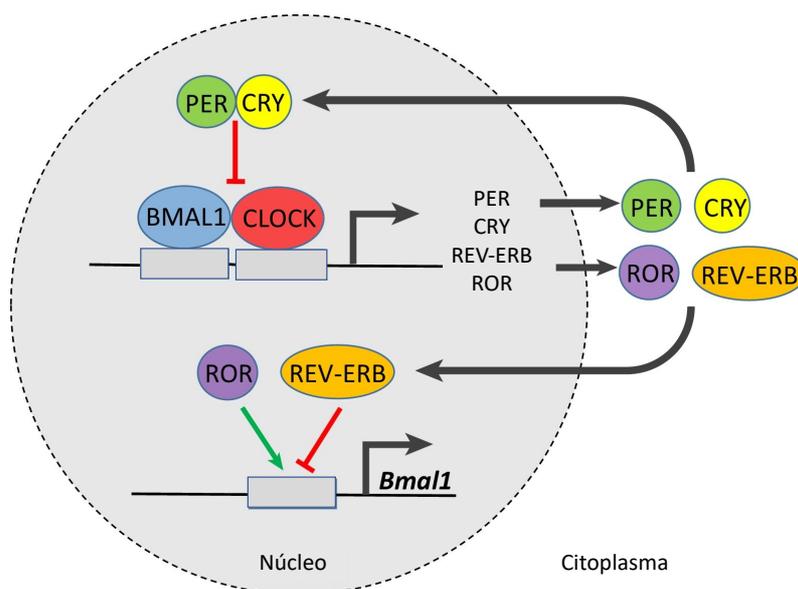


Figura 13. Esquema representativo de la vía de los genes Clock. BMAL1 y CLOCK forman un heterodímero que activa la expresión de PER y CRY. Estos, a su vez, forman un complejo que inhibe la formación del heterodímero BMAL1/CLOCK y su expresión génica. ROR actúa activando la vía a través de BMAL1, mientras que REV-ERB la inhibe.

La otra asa de retroalimentación, en este caso negativa, la componen las proteínas PER y CRY. Estas proteínas son transportadas al citoplasma, y forman el complejo PER/CRY que, posteriormente, se transloca al núcleo y se asocia con el heterodímero BMAL1/CLOCK, inhibiendo su activación transcripcional y suprimiendo su propia transcripción génica (Chiou et al., 2016). Además, el complejo PER/CRY puede ser fosforilado por la caseína quinasa 1 épsilon (CK1 ϵ), lo que conduce a su degradación (Kobayashi et al., 2017). Existe otro circuito alternativo de retroalimentación negativa, representado por la subfamilia de receptores nucleares 1, grupo D, miembros 1 y 2 (REV-ERB α y β), y por el receptor nuclear de ácido retinoico alpha (ROR α). Estas proteínas se translocan al núcleo con el objetivo de reprimir y promover la expresión de BMAL1, respectivamente (Kochan y Kovalchuk, 2015; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2015). ROR α activa la transcripción de BMAL1, mientras que, REV-ERB reprime su expresión, reforzando la estabilidad y el ritmo del reloj interno (Curtis et al., 2014; Sulli et al., 2018) (Figura 13).

Los efectos opuestos de los dímeros BMAL1/CLOCK y PER/CRY en la transcripción, aseguran que los mensajeros de PER y CRY oscilen de manera opuesta con el mensajero de BMAL1 (Firsov y Bonny, 2018). Los niveles máximos y mínimos en la expresión de estos genes ocurre con una periodicidad cercana a las 24 horas, de esta manera, se establecen los ritmos circadianos en los organismos. Un ejemplo de ello es que el pico máximo de expresión de BMAL1 en el NSQ se produce en mitad de la noche, mientras que el pico máximo de los mensajeros de PER y CRY ocurre a medio día (Reppert y Weaver, 2002) (Figura 14).

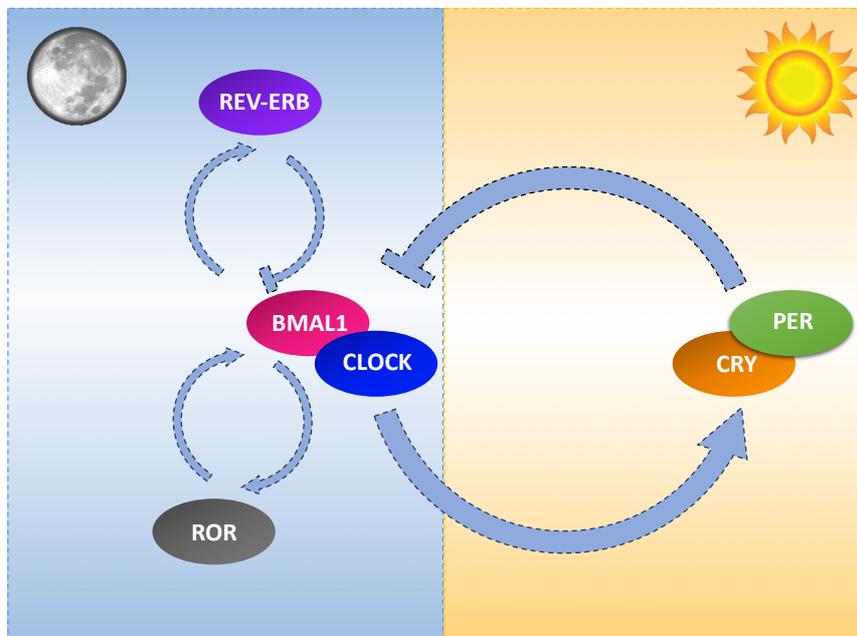


Figura 14. Esquema representativo de las asas de retroalimentación de la vía de los genes Clock y su ritmicidad circadiana. El gen circadiano BMAL1 tiene su pico de máxima expresión en medio de la noche, mientras que los de PER y CRY se producen al medio día.

La vía de los genes *Clock* y la fibrosis hepática

Cada vez son más los resultados que respaldan que la alteración del ritmo circadiano es un mecanismo molecular crítico en la patogénesis de la fibrosis (Touw *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2013; Pekovic-Vaughan *et al.*, 2014; Kwon *et al.*, 2018). Se ha demostrado que el hígado expresa diversos genes controlados de manera circadiana

(Nguyen *et al.*, 2014), y que las diferentes funciones que tienen muchos genes están bajo control circadiano de manera directa o indirecta (Hirao *et al.*, 2010; Kettner *et al.*, 2016).

Además, se ha comprobado que existe una gran variedad de parámetros fisiológicos que se encuentran regulados por los ritmos circadianos tales como la fibrinólisis (Piscaglia *et al.*, 2000), la hemorragia varicosa (Mann *et al.*, 1999), el catabolismo hepático de la melatonina (Steindl *et al.*, 1997), la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Alvarez *et al.*, 1994; Møller *et al.*, 1995), la acidez gástrica (Savarino *et al.*, 1996) e incluso el sueño (Córdoba *et al.*, 1998), que se encuentran alterados en pacientes con cirrosis o en modelos murinos de fibrosis. Recientemente, numerosos estudios han comprobado que las alteraciones en la expresión de los genes *Clock* inducen una disfunción hepática y aceleran el desarrollo de las lesiones en el hígado, por lo que podrían actuar como dianas terapéuticas para el tratamiento del daño hepático (Zhou *et al.*, 2016).

Existen numerosos resultados que indican que los agentes que inducen daño hepático, provocan una desregulación de los ritmos circadianos (Kwon *et al.*, 2018). Agentes quimioterapéuticos como la ciclofosfamida, que causan toxicidad hepática, generan una alteración significativa en la expresión de los principales marcadores involucrados en la vía de los genes *Clock*. Sin embargo, los compuestos de selenio muestran un papel protector en el hígado a través de la regulación de la vía (Hu *et al.*, 2011). Se ha indicado que la exposición continuada al alcohol en el hígado provoca una alteración del sistema circadiano, lo que confiere una mayor vulnerabilidad al órgano hacia el desarrollo de la patología (Wang *et al.*, 2013a; Forsyth *et al.*, 2015; Summa *et al.*, 2015). En modelos murinos con alteración genética de la vía circadiana, se ha indicado que muestran una mayor predisposición al desarrollo de esteatohepatitis (Kudo *et al.*, 2009; Summa *et al.*, 2013; Kettner *et al.*, 2016; Kwon *et al.*, 2018).

Los genes circadianos, junto con otros importantes genes regulados de manera circadiana como son el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) α y el citocromo P450 (Cyp450), pierden su ritmicidad en modelos animales de fibrosis hepática (Chen *et al.*, 2010b). Esta desregulación del reloj circadiano, durante la

fibrogénesis (Thomas *et al.*, 2013), conduce a cambios en parámetros fisiológicos, como el metabolismo de lípidos o de fármacos, lo que favorece la progresión del estado patológico. De hecho, el reloj circadiano controla la mayoría de las vías metabólicas en el hígado, mediante la regulación en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de una manera cíclica (Borengasser *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Mazzacoli *et al.*, 2018).

En los últimos años, se ha demostrado no solo la estrecha relación que existe entre la regulación de los genes *Clock* y el desarrollo de la fibrosis, sino su interrelación con otro de los mecanismos clave como son el estrés del RE (Maillo *et al.*, 2017; Moore y Oakes, 2017; Bu *et al.*, 2018) o la autofagia (Huang *et al.*, 2016), provocando una mayor contribución al desarrollo del proceso fibrótico.

2.5 Tratamiento de la fibrosis

La fibrosis hepática es una de las enfermedades crónicas del hígado que afecta a miles de pacientes en nuestro país. Esta patología puede ser revertida tras la retirada del agente etiológico subyacente, evitando así la progresión hacia cirrosis (Ebrahimi *et al.*, 2018), lo que abre la posibilidad para el desarrollo de enfoques terapéuticos antifibróticos. Sin embargo, hay una necesidad de búsqueda de estrategias antifibróticas que puedan prevenir, detener o revertir la fibrosis hepática debido a que las terapias clínicas efectivas actuales siguen siendo escasas. Existen varias líneas de evidencia que sugieren que el estrés oxidativo juega un papel importante en la etiopatogenia de la fibrosis hepática (Huang *et al.*, 2017).

Entre alguna de las sustancias con potencial antioxidante que favorecen el tratamiento de la fibrosis, se encuentra la riboflavina o vitamina B2. Es un micronutriente de fácil absorción, con un papel clave en el mantenimiento de la salud en animales y seres humanos (Powers, 2003; Depeint *et al.*, 2006). Se ha comprobado que esta vitamina produce un efecto protector contra el daño hepático inducido por CCl₄ y otros agentes químicos (Al-Harbi *et al.*, 2014).

De manera similar al caso de la rivoflavina se desarrolla el mecanismo de acción de la vitamina C, que permite que el L-ascorbato se convierta en su forma oxidada, L-deshidroascorbato, que puede ser reducida y por lo tanto activada por la acción de diferentes enzimas en presencia de glutatión (GSH) (Nualart *et al.*, 2003). La N-acetilcisteína, el ácido lipoico y la vitamina C, actúan de forma conjunta controlando el mecanismo inflamatorio de la fibrosis (Perricone *et al.*, 2009). Se ha comprobado que la N-acetilcisteína reduce los procesos de fibrosis hepática, con menor degeneración de los hepatocitos ante la exposición a compuestos tóxicos (Gillissen, 2011).

Otras sustancias que han demostrado tener un efecto hepatoprotector son los flavonoides presentes generalmente en frutas y verduras (Tao *et al.*, 2016). En diversos estudios se ha demostrado que el tratamiento de la fibrosis hepática con la quercetina, un conocido flavonoide, disminuye la acumulación de colágeno y la activación de las HSCs (Elbe *et al.*, 2015), mostrando un potencial antifibrótico que se asocia con la capacidad de modular el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) (de David *et al.*, 2011; Marcolin *et al.*, 2012) y la producción de TGF- β (Wan *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que la quercetina también puede ser una estrategia terapéutica eficaz en el tratamiento de los pacientes con daño hepático (Wan *et al.*, 2014).

A pesar de la existencia de diversos compuestos antioxidantes que mejoran el desarrollo de esta patología sigue sin existir una terapia eficaz con efectos antifibrogénicos disponibles en la actualidad, de ahí la necesidad de investigar en otros posibles tratamientos.

2.5.1 Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptofamina) es la principal hormona secretada por la glándula pineal, sustancia aislada por primera vez por el dermatólogo Aaron Lerner y colaboradores en 1958. Estos autores comprobaron que esta molécula aclaraba los melanocitos en la piel de anfibios, y le dieron el nombre de melatonina debido a la relación de su función con el pigmento melanina y de su estructura con la serotonina (Lerner *et al.*, 1958). La melatonina es un mediador ubicuo que se encuentra en la

mayoría de los organismos desde los eucariotas unicelulares hasta las plantas (Reiter *et al.*, 2001; Kolar y Machackova, 2005) y los animales vertebrados (Reiter, 1995; Hardeland, 2009).

En los mamíferos se produce en la glándula pineal, que es una glándula endocrina presente en el centro del cerebro de todos los vertebrados, pero también por una gran variedad de tejidos extrapineales (Kobayashi *et al.*, 2005; Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014). Las variaciones en la síntesis del indol se deben a las necesidades requeridas de los órganos, especialmente del hígado. Es un poderoso antioxidante endógeno (Zhang y Zhang, 2014; Mortezaee *et al.*, 2016), que regula los ritmos circadianos, el sueño y la actividad del sistema inmune. Se comporta como un captador de radicales libres (Torok, 2016), ya que elimina los radicales libres de oxígeno e intermediarios reactivos (Yang *et al.*, 2017).

Estructura y metabolismo de la melatonina

La melatonina es una indolamina altamente soluble, que presenta una ritmicidad circadiana y necesita de ciclos de luz/oscuridad para su producción y liberación (Jiménez-Jorge *et al.*, 2005). Se sintetiza en tres etapas (Figura 15). Comienza con la transformación del triptófano, un aminoácido aromático esencial que proviene de los vasos cerebrales y entra en el pinealocito, donde experimenta una hidroxilación gracias a la acción de la triptófano hidrolasa, convirtiéndose en 5-hidroxitriptófano. Posteriormente, se produce la descarboxilación mediante la L-aminoácido aromático descarboxilasa, generando serotonina o 5-hidroxitriptamina. A continuación, la serotonina N-acetiltransferasa metaboliza la serotonina. Esta actividad se encuentra aumentada entre un 30 a un 70% durante la noche, presentando un marcado ritmo circadiano y obteniéndose como producto N-acetil serotonina (Klein *et al.*, 1997).

Finalmente, se produce la conversión de la N-acetil serotonina en N-acetil-5-metoxitriptamina, es decir, melatonina, a través de la acción de la enzima acetilserotonina O-metiltransferasa (Ekmekcioglu, 2006).

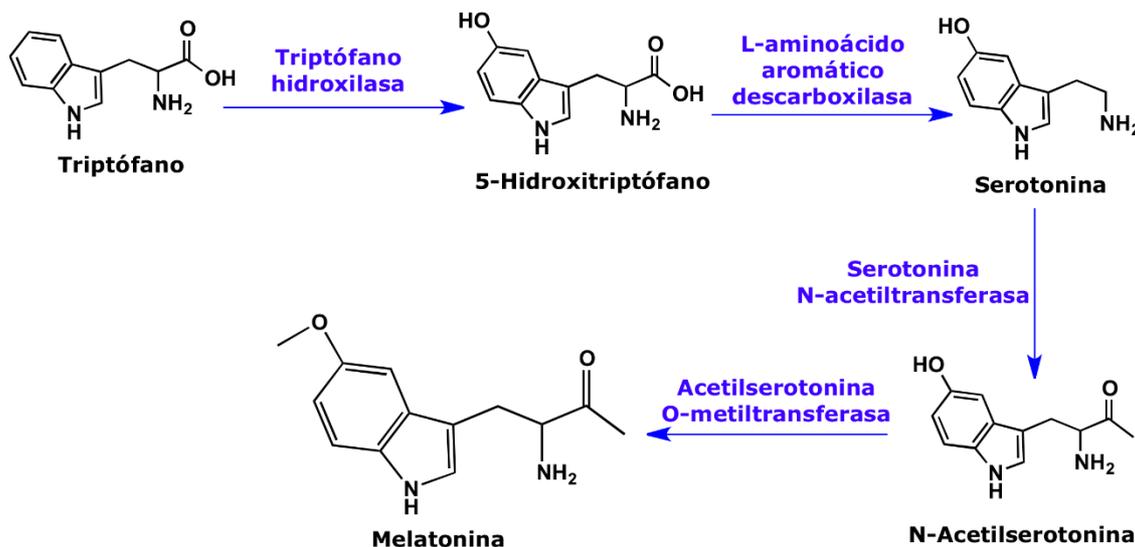


Figura 15. Biosíntesis de la melatonina. El proceso se inicia con el triptófano, y a través de una serie de reacciones catalizadas por enzimas cuya expresión está regulada de manera circadiana, se genera melatonina.

La actividad de la N-acetiltransferasa, determina el ritmo pineal de producción de la hormona y puede regularse mediante su expresión génica o a través de la activación de la enzima (Hardeland, 2008). La expresión enzimática a su vez puede ser regulada por una vía nerviosa controlada por el NSQ del hipotálamo, el llamado reloj biológico o circadiano. Esta vía comienza en la retina, donde se captan los estímulos lumínicos y continúa a través de los axones de las células ganglionares (Lewy *et al.*, 1980). Durante el día, la luz mantiene hiperpolarizados a los fotorreceptores lo que evita la liberación de noradrenalina. En oscuridad, los fotorreceptores generan potenciales de acción que se transmiten a través de la vía neuronal hasta los terminales simpáticos que liberan noradrenalina, que se une a receptores adrenérgicos β_1 y β_2 del pinealocito (Reiter, 1991). Esta unión, provoca una reacción bioquímica intracelular que se traduce en un aumento de la expresión y actividad de la N-acetiltransferasa, lo que genera el incremento de las concentraciones de N-acetil-serotonina y melatonina (Hardeland *et*

al., 1993). Es importante destacar que, en vertebrados, la melatonina no sólo se forma en la glándula pineal, sino también en múltiples tejidos extrapineales (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014), como la glándula lacrimal (Mhatre *et al.*, 1988), la retina (Grace *et al.*, 1991), el cuerpo ciliado del iris (Aimoto *et al.*, 1985), los leucocitos mononucleares (Guerrero y Reiter, 2002), el tracto gastrointestinal (Bubenik, 1980), el ovario (Itoh *et al.*, 1997), la placenta (Reiter *et al.*, 2014) o el sistema portal hepático (Huether *et al.*, 1992), entre otros.

Las concentraciones de melatonina en el organismo difieren bastante entre las diferentes especies. Se trata de una hormona con una corta vida media (aproximadamente 10 minutos) y, debido a su carácter lipofílico, es capaz de cruzar fácilmente cualquier membrana alcanzando todos los fluidos, tejidos, y compartimentos celulares, por lo que es difícil cuantificar la concentración exacta de melatonina presente en la sangre circulante. Además de las fluctuaciones circadianas que se producen debido a los ciclos de luz-oscuridad, la síntesis de melatonina también varía en función de la edad. Así, en los recién nacidos y hasta los tres meses de vida, se producen grandes cantidades de melatonina, pero carecen de ritmicidad circadiana, mientras que en el adulto se reduce la síntesis y las diferencias en los niveles plasmáticos diurnos y nocturnos comienzan a hacerse notables (Waldhauser *et al.*, 1993; Reiter, 1998). El ritmo circadiano se mantiene desde la pubertad hasta los 45-65 años, cuando decae progresivamente hasta igualarse los niveles séricos diurnos y nocturnos (Reiter, 1995). Otros factores que afectan a la síntesis de melatonina son el ciclo menstrual, el tiempo diario de exposición al sol, el consumo de algunos fármacos, el estrés y el ejercicio, entre otros (Ariznavarreta *et al.*, 2002).

Funciones de la melatonina

Una de las principales funciones de la melatonina es su capacidad para regular los ritmos circadianos (Pandi-Perumal *et al.*, 2013). Este indol puede ser considerado un nexo de unión entre el medio ambiente luminoso y los sistemas nervioso y endocrino (Jin *et al.*, 2003; Dubocovich y Markowska, 2005), actuando como mediador de la

respuesta fisiológica ante los ritmos anuales. Se ha observado que la administración exógena de melatonina sincroniza los ritmos circadianos (Cassone *et al.*, 1986; Reiter, 1993) y además produce hipotermia (Deacon y Arendt, 1995), regulando así la variación circadiana de la temperatura corporal (Koster-van Hoffen *et al.*, 1993).

La melatonina ha sido identificada como una molécula antioxidante clave, capaz de eliminar eficazmente radicales libres para proteger a la célula contra las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Zhang y Zhang, 2014). Además de la capacidad intrínseca para depurar radicales libres, este indol estimula la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes (Yang *et al.*, 2017), así como la regulación de las reacciones redox (Torok, 2016). Esta hormona también ejerce una acción sinérgica con otros antioxidantes como las vitaminas E y C (Reiter *et al.*, 2003).

Los efectos inmunomoduladores de la melatonina representan otra línea de defensa (Guerrero y Reiter, 2002; Hardeland, 2008), puesto que, muestra un papel antiinflamatorio gracias a sus efectos antioxidantes y mitocondriales que atenúan la señal proinflamatoria (Hardeland, 2008; Laliena *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2016). Se han observado efectos positivos en la administración del indol en modelos animales de enfermedades caracterizadas por edema, inflamación y fibrosis (Taslidere *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2017). La melatonina también ejerce una acción estimulante de la respuesta inmune, mediante la activación de varios tipos celulares como los linfocitos T y B, NK, monocitos y células del sistema mononuclear fagocítico (Freitas *et al.*, 2016).

Se ha demostrado, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, que la melatonina protege a las células, tejidos y órganos contra el daño oxidativo inducido por una gran variedad de agentes y procesos generadores de radicales libres, como pueden ser la administración de CCl₄ (Kang *et al.*, 2016; Mortezaee *et al.*, 2017b), la reperusión isquémica (Deng *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017) y las radiaciones ionizantes, entre otros (Rozov *et al.*, 2003; Hold *et al.*, 2004; Tuñón *et al.*, 2013). Además, esta hormona tiene un efecto protector indirecto a través del aumento de los niveles de compuestos antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx), la superóxido dismutasa (SOD), y el GSH (Czechowska *et al.*, 2015).

En los últimos años, mediante estudios *in vivo* e *in vitro* se ha profundizado en el papel del indol como un potente agente antiapoptótico (Choi *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2017) y antiproliferativo (Loureiro *et al.*, 2015). Existen investigaciones que demuestran que la melatonina ejerce sus efectos citoprotectores en varios modelos experimentales de lesión hepática aguda, a través de la inhibición de la proliferación de fibroblastos y de la síntesis de proteínas como el colágeno (Das *et al.*, 2017; Mortezaee y Khanlarkhani, 2018). Esto demuestra su papel terapéutico en la lesión hepática aguda y crónica, gracias a su acción antioxidante y antiproliferativa. Además, se ha comprobado que los cambios apoptóticos, producidos por la administración crónica de tóxicos como el CCl₄, se reducen considerablemente cuando se tratan con melatonina, lo que implica que regula en gran medida la apoptosis (Choi *et al.*, 2015) y reduce el daño oxidativo en el hígado (San-Miguel *et al.*, 2015; Colares *et al.*, 2016), en ocasiones a través de la supresión de la inflamación (Yang *et al.*, 2017).

Melatonina y fibrosis hepática

Un amplio número de estudios han demostrado el papel protector de la melatonina en diferentes situaciones fisiopatológicas del hígado, como en el caso del daño por la isquemia y reperfusión hepática (Sun *et al.*, 2017), por la BDL (Colares *et al.*, 2016) o por el daño inducido por estrés oxidativo (Yang *et al.*, 2017).

También se ha comprobado que la administración de melatonina mejora la EHNA inducida por una dieta deficiente en metionina y colina (Freitas *et al.*, 2016), impide la hepatotoxicidad generada por diferentes fármacos (Kurus *et al.*, 2009) y previene la fibrosis hepática inducida por varios tóxicos (Tabla 2). Las investigaciones que proponen al indol como tratamiento eficaz de la fibrosis hepática, se basan en su capacidad para atenuar la lesión generada por tóxicos como el CCl₄ (Liedke *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2016), la TAA (Túnez *et al.*, 2007; Czechowska *et al.*, 2015) o el DMN (Tahan *et al.*, 2004) en modelos animales de fibrosis hepática. A esta hormona también se le ha atribuido un papel relacionado con la supresión de la activación de las HSCs, células determinantes

en el desarrollo de la fibrosis, en modelos *in vitro* (Gu *et al.*, 2006; Shajari *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2017).

Los efectos hepatoprotectores del indol se deben a su capacidad para reducir los valores séricos de aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), hidroxiprolina y amoniaco, moléculas causantes de daño hepático (Cho *et al.*, 2015). Además, esta hormona logra disminuir la expresión de las principales proteínas de la MEC, cuyo acúmulo se encuentra incrementando ante el daño y es determinante en el desarrollo de la fibrogénesis, como son α -SMA y colágeno (Das *et al.*, 2017). Este efecto se consigue, en parte, a través de la inhibición en la expresión de factores profibrogénicos o MMPs (Crespo *et al.*, 2015).

La melatonina también regula alguno de los mecanismos moleculares involucrados de manera directa en la progresión de la fibrosis, como son la autofagia (Kang *et al.*, 2016) o el estrés del RE (Heo, 2017). Debido a ello, disminuye los marcadores de daño hepático contribuyendo a la reversión de la fibrosis hepática.

Todas estas propiedades del indol, junto con las demostradas funciones protectoras que juega en diferentes modelos animales y celulares de fibrosis hepática, lo convierten en una molécula que podría tener un elevado potencial terapéutico y representar una terapia eficaz en el tratamiento de la fibrosis hepática en humanos.

Tabla 2. Tabla resumen del efecto de la melatonina en la fibrosis hepática.

Inductor fibrosis	Tratamiento melatonina	Efecto del daño	Efecto de la melatonina	Efecto global	Ref
CCl ₄	5 y 10 mg/kg i.p. 4 y 6 sem.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ALT y AST ↑ α-SMA, Col(I/II) ↑ MMP ↓ TIMP-1 ↑ TGF-β, PDGF, CTGF, anfiregulina, Smad-3 y Nrf2 ↑ Área fibrótica (%) 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ ALT y AST ↓ α-SMA, Col(I/II) ↓ MMP ↑ TIMP-1 ↓ TGF-β, PDGF, CTGF, anfiregulina, Smad-3 y Nrf2 ↓ Área fibrótica (%) 	<ul style="list-style-type: none"> Reduce el estrés oxidativo. Protección hepática. Detiene la progresión de la fibrosis 	[1]
CCl ₄	20 mg/kg i.p. 10 sem.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ALT y AST ↑ TBARs ↑ Colágeno ↑ Fibrosis nodular ↓ SOD y GPx 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ ALT y AST ↓ TBARs ↓ Colágeno ↓ Fibrosis nodular ↑ SOD = GPx 	<ul style="list-style-type: none"> Acción antioxidante. Reduce el daño hepático. 	[2]
CCl ₄	5-10 mg/kg 20 mg/kg i.p. 6 sem.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ALT y AST ↓ A/G ↑ Hidroxiprolina ↑ MDA ↓ SOD y GSHpx ↑ NF-κB ↑ TNF-α y IL-1β (<i>in vitro</i>) ↑ Scores de fibrosis ↑ Inflamación y deposición de colágeno 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ ALT y AST ↑ A/G ↓ Hidroxiprolina ↓ MDA ↑ SOD y GSHpx ↓ NF-κB ↓ TNF-α y IL-1β (<i>in vitro</i>) ↓ Scores de fibrosis ↓ Inflamación y deposición de colágeno 	<ul style="list-style-type: none"> Reduce el estrés oxidativo. Reduce la fibrosis hepática. Inhibe la activación de las HSCs. 	[3]
CCl ₄	2,5-5 mg/kg 10 mg/kg s.c. 12 sem.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ALT y AST ↑ Hidroxiprolina ↑ MDA ↓ GSHpx ↑ Laminina sérica ↑ Ácido hialurónico ↑ Procolágeno II N-terminal 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ ALT y AST ↓ Hidroxiprolina ↓ MDA ↑ GSHpx ↓ Laminina sérica ↓ Ácido hialurónico ↓ Procolágeno II N-terminal 	<ul style="list-style-type: none"> Reduce el estrés oxidativo. Efecto protector sobre el hígado. 	[4]
CCl ₄	2,5-5 mg/kg 10 mg/kg oral 8 sem.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ALT y AST ↑ Hidroxiprolina ↑ TGF-β, α-SMA y caspasa-3 ↑ RIP-1 y RIP-3 ↑ MLKL ↑ HMGB1, IL-1α 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ ALT y AST ↓ Hidroxiprolina ↓ TGF-β, α-SMA y caspasa-3 ↓ RIP-1 y RIP-3 ↓ MLKL ↓ HMGB1, IL-1α 	<ul style="list-style-type: none"> Inhibe la fibrosis hepática a través de la supresión de la apoptosis. 	[5]

Inductor fibrosis	Tratamiento melatonina	Efecto del daño	Efecto de la melatonina	Efecto global	Ref
CCl ₄	5 y 10 mg/kg i.p. 4 y 6 sem.	↑ α-SMA ↑ Vesículas autofágicas ↑ LC3 I/II, p62, LAMP2, UVRAG y p-mTOR ↑ Beclina-1, Atg5, Atg12, Atg 16L1, PERK, ATF4, ATF6, IRE1, BiP, GRP94, CHOP y XBP1s	↓ α-SMA ↓ Vesículas autofágicas ↓ LC3 I/II, p62, LAMP2, UVRAG y p-mTOR ↓ Beclina-1, Atg5, Atg12, Atg 16L1, PERK, ATF4, ATF6, IRE1, BiP, GRP94, CHOP y XBP1s	Inhíbe la autofagia y el estrés del RE. Efecto protector sobre el hígado.	[6]
CCl ₄	5 mg/kg i.p. 4 sem.	↑ ALT y AST ↑ Concentración de amonio ↑ BMP-2 ↑ Smad 1/5/8 ↑ p38 ↑ ERK ↑ JNK ↑ NF-κB	↓ ALT y AST ↓ Concentración de amonio ↓ BMP-2 ↓ Smad 1/5/8 ↓ p38 ↓ ERK ↓ JNK ↓ NF-κB	Podría convertirse en un nuevo tratamiento para la cirrosis hepática.	[7]
TAA	1 mg/kg i.p. 1-3 meses	↑ Cirrosis micro y macronodular ↑ α-SMA ↑ AP y bilirrubina ↑ LPO ↓ CAT y SOD ↓ GSH	↓ Cirrosis micro y macronodular ↓ α-SMA ↓ AP y bilirrubina ↓ LPO ↑ CAT y SOD ↑ GSH	Reduce el estrés oxidativo, y el número de células dañadas	[8]
TAA	10 mg/kg i.p. 4 sem.	↑ ALT, AST y AP ↓ GSH ↑ TGF-β ↑ IL-1β, IL-6, TNF-α y PDGFAB ↓ PON-1	↓ ALT, AST y AP ↑ GSH ↓ TGF-β ↓ IL-1β, IL-6, TNF-α y PDGFAB ↑ PON-1	Inhíbe la inflamación y reduce los cambios patológicos provocados por el inductor fibrótico.	[9]
DMN	100 mg/kg i.p. 14 días	↑ Deposición de colágeno ↑ Hidroxiprolina ↑ MDA ↓ SOD y GSH	↓ Deposición de colágeno ↓ Hidroxiprolina ↓ MDA ↑ SOD y GSH	Efecto protector frente al estrés oxidativo. Mejora el daño hepático.	[10]

[1] Crespo *et al.*, 2015. [2] Rosa *et al.*, 2010. [3] Wang *et al.*, 2005a. [4] Hong *et al.*, 2009. [5] Choi *et al.*, 2015. [6] San-Miguel *et al.*, 2015. [7] Cho *et al.*, 2015. [8] Cruz *et al.*, 2005. [9] Czechowska *et al.*, 2015. [10] Tahan *et al.*, 2004.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis fue determinar el efecto del tratamiento experimental con melatonina, en un modelo animal de la fibrosis hepática inducida por CCl₄, así como en las células hepáticas estrelladas humanas de la línea LX2, centrando la investigación en diversas vías de señalización que se relacionan con el establecimiento y evolución de la fibrogénesis.

Objetivos específicos

Con el fin de alcanzar el objetivo general, planteamos los siguientes objetivos específicos recogidos a continuación.

- Determinar las alteraciones moleculares y el daño hepático que se producen tras la administración de CCl₄, comprobando, así, la idoneidad del modelo animal experimental de fibrosis hepática elegido para nuestro estudio.
- Evaluar los efectos de la administración de melatonina sobre el daño hepático inducido por CCl₄ en un modelo *in vivo* de fibrosis, así como en la activación de las células hepáticas estrelladas humanas.
- Valorar los efectos de la administración de melatonina sobre la autofagia, el estrés del retículo endoplasmático y la vía de señalización SphK/S1P, así como establecer la relación que existe entre la inhibición de la vía de los esfingolípidos y la progresión de la fibrosis.
- Estudiar el papel de la melatonina en la regulación del ritmo circadiano y de los genes reloj implicados en su control, tanto en el modelo animal como en las células hepáticas estrelladas humanas, y determinar si dicho efecto modula, a su vez, la progresión de la fibrosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Para el presente estudio se han utilizado los siguientes medios instrumentales:

- Autoclave: Raypa, modelo Sterilmatic.
- Balanzas de precisión: Mettler Toledo, modelo AB104-S; Mettler Toledo, modelo PB1501-S.
- Baños termostáticos: Selecta, modelo 135925; Selecta, modelo CE95; Selecta, modelo Unitronic 32.
- Centrifugas: Beckman, modelo XL-10k. Rotor 70:1 Ti; Eppendorf, modelo 5451C; Sorvall, modelo RC-5B.
- Cubeta electroforesis vertical: Bio-Rad, modelo Mini-PROTEAN Tetra Cell.
- Espectrofotómetro: NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific.
- Fuente de alimentación: Bio-Rad, modelo 200/2.
- Homogeneizador: Polytron.
- Lector Multi-Modal de Microplacas Synergy HT, BioTek.
- Material quirúrgico: bisturís, pinzas, tijeras, agujas, jeringuillas, cánulas, guantes estériles, etc.
- Material de laboratorio de carácter general: pipetas y micropipetas automáticas, agitadores de tubo, gradillas, frigoríficos, arcones congeladores de -80°C, ordenadores, etc.
- Microscopios ópticos: Nikon OPTIPHOT-2®; Nikon Eclipse E 400®; Nikon Provisc AX 70®.
- Microscopio electrónico de transmisión: JEOL LTD.

- Microscopio de fluorescencia: Nikon Eclipse Ti®.
- Micrótopo de rotación: Leitz 1512.
- pHmetros: Mettler Toledo, modelo SevenMultiTM.
- Sistema de transferencia de proteínas: Bio-Rad, modelo Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cells.
- Sonificador: Hielscher-Ultrasound Technology, modelo UP50H, Teltow, Alemania.
- Termociclador: Applied Biosystems, modelo Step One Plus *Sequence Detection System*.
- Ultramicrotomo automático: Reichert Ultracut E.

4.2 Animales

Para el estudio *in vivo* se emplearon 80 ratones machos C57BL/6J (Harlan Laboratories, Barcelona, España) de 10 semanas de edad con un peso de entre 20-25 g. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (21-22°C), humedad (50%) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, en el animalario de la Universidad de León. El alimento y el agua se administraron *ad libitum*. Durante una semana se les mantuvo en periodo de aclimatación.

Los experimentos fueron realizados de acuerdo con la Declaración de Helsinki (2000) de la Asociación Médica Mundial y las regulaciones españolas del uso de animales de laboratorio (RD 1201/2005), y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de León. Se procuró, en todo momento, minimizar el sufrimiento animal y reducir en lo posible el número de animales utilizados.

4.3 Líneas celulares

Para el estudio *in vitro*, se emplearon HSCs humanas de la línea LX2, cedidas por el Dr. J. Prieto, CIMA, Navarra, España. Las células fueron cultivadas en monocapa y mantenidas en medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL), glutamina (4 mM) y piruvato (100 µg/mL). Las células se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (37°C) y humedad (95%), con una concentración de aire del 95% y de CO₂ del 5%.

Las líneas celulares fueron cultivadas en *flasks* T-75 hasta el momento del tratamiento, cuando se les reemplazó el medio por DMEM 2% FBS.

4.4 Diseño experimental

4.4.1 Modelo *in vivo* de fibrosis hepática

La fibrosis hepática se indujo en ratones mediante la administración intraperitoneal de CCl₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) (Perugorria *et al.*, 2008).

Los animales sin ningún tratamiento previo fueron sometidos a la administración de 0,6 µL de una solución de CCl₄ diluido en aceite de maíz (1:4) dos veces por semana durante 4 ó 6 semanas. En este modelo experimental se trata de comprobar la posible utilidad terapéutica de la melatonina (Mel). La melatonina (Sigma-Aldrich) se administró i.p. a dos concentraciones 5 ó 10 mg/Kg empleando etanol como vehículo (2,5%) en los animales control y con fibrosis (Grupos Control+Mel y CCl₄+Mel, respectivamente) durante 2 ó 4 semanas tras 2 semanas de la inducción de la fibrosis (Crespo *et al.*, 2015).

Los animales fueron aleatoriamente incluidos en 5 grupos experimentales (n= 4-8 ratones):

- Grupo Control: Animales control sometidos a inyección i.p. con aceite de maíz, durante 4 y 6 semanas.

- Grupo Control+Mel: Animales control sometidos a inyección i.p. con aceite de maíz que recibieron a partir de la segunda semana, diariamente 10 mg/kg de Mel i.p., durante 2 y 4 semanas.
- Grupo CCl₄ 4w y CCl₄ 6w: Animales sometidos a inducción de fibrosis con CCl₄, durante 4 y 6 semanas (w), respectivamente.
- Grupo CCl₄ + 5Mel 4w y CCl₄ + 5Mel 6w: Animales sometidos a inducción de fibrosis con CCl₄ que recibieron a partir de la segunda semana de la misma, diariamente, 5 mg/kg de Mel i.p., durante 2 y 4 semanas, respectivamente.
- Grupo CCl₄ + 10Mel 4w y CCl₄ + 10Mel 6w: Animales sometidos a inducción de fibrosis con CCl₄ que recibieron a partir de la segunda semana de la misma, diariamente, 10 mg/kg de Mel i.p., durante 2 y 4 semanas, respectivamente.

El sacrificio de los animales, de los diferentes grupos experimentales, se realizó a las 4 y 6 semanas del comienzo de la inducción de la fibrosis, previa anestesia del animal mediante administración i.p. de fármacos anestésicos: una mezcla de clorhidrato de xilazina al 2% (50 mg/kg de peso corporal) y clorhidrato de ketamina (100 mg/kg peso corporal) y posterior extracción de sangre de la cavidad cardíaca. Finalmente, tras la tricotomía manual de la región abdominal, se realizó una laparotomía ventral media, exposición y extracción del hígado.

4.4.2 Modelo *in vitro* con células LX2

Con el objetivo de profundizar en las principales vías implicadas en el desarrollo de la fibrosis hepática y la utilidad de la melatonina en humanos, se realizaron dos tratamientos experimentales en HSCs humanas activadas con TGF- β [2 ng/mL, en dimetilsulfóxido (DMSO) al 2,5 %: R&D System, Minneapolis, MN, EE.UU.].

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (300.000 células por pocillo) en 2 mL de medio DMEM. Para los estudios relacionados con los genes *Clock*, las células fueron sincronizadas antes de los tratamientos con un shock de suero (Yagita *et al.*, 2001).

Se realizaron dos diseños experimentales. En el primero de ellos se evaluó el efecto que ejerce el inhibidor de la SphK1, PF543 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), y su acción combinada con el indol en la expresión de los marcadores fibrogénicos en HSCs humanas activadas. En el segundo diseño experimental se valoró la acción del ligando de REV-ERB, SR9009, (Merck KGaA) y su efecto combinado con la melatonina en la regulación de la fibrosis en LX2 activadas.

Se realizaron los siguientes grupos experimentales.

- Grupo Control: Células que recibieron el vehículo, DMSO.
- Grupo Control+Mel: Células que recibieron Mel a una concentración de 500 μ M.
- Grupo TGF- β : Células que recibieron el TGF- β a una concentración de 2 ng/mL.
- Grupo TGF- β +ligandos (PF543/SR9009): Células con TGF- β y administración de los ligandos específicos a una concentración de 10 μ M.
- Grupo TGF- β +ligandos (PF543/SR9009) + 100Mel: Células con TGF- β y administración de los ligandos específicos, tratadas con Mel (100 μ M), 1 hora después de la adición de los ligandos.
- Grupo TGF- β +ligandos (PF543/SR9009) + 500Mel: Células con TGF- β y administración de los ligandos específicos, tratadas con Mel (500 μ M), 1 hora después de la adición de los ligandos.

Todos los grupos experimentales se incubaron durante 24 horas. La concentración final de DMSO en todos ellos fue del 0,05%.

4.5 Determinaciones analíticas

4.5.1 Análisis bioquímico en plasma

Se determinaron las actividades de las transaminasas, ALT y AST, en muestras de plasma obtenidas en el momento del sacrificio de los ratones. Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León.

4.5.2 Análisis histológico hepático

Tras el sacrificio de ratones, se realizó la extracción y limpieza del hígado, y se procedió al estudio histológico. El tejido se fijó en formalina tamponada al 10% durante 24 horas. Las muestras fueron deshidratadas a través de una serie creciente de alcoholes (etanol 80°, 96°, 100°) y posteriormente embebidas en xilol. Seguidamente se incluyeron en parafina para realizar los cortes histológicos de 3 μm de grosor. Las secciones fueron colocadas en portaobjetos y posteriormente desparafinadas en xilol e hidratadas a través de una serie decreciente de alcoholes (etanol 100°, 96°, 80° y agua destilada). Las secciones hepáticas fueron teñidas con una tinción Van Gieson, específica para las fibras de colágeno. Se trata de una mezcla de ácido pícrico-fucsina ácida y hematoxilina férrica de Weigert. Las secciones se sumergieron en la tinción durante 5 minutos y posteriormente fueron deshidratadas de nuevo a través de una serie creciente de alcoholes. Para hacer miscible el tejido con el medio de montaje se embebieron las muestras en xilol y finalmente se les colocó el cubreobjetos. Los septos fibróticos fueron cuantificados con el *software WinRoof* versión 6.3, mediante el análisis de 10 campos no consecutivos aleatorios. Los resultados fueron expresados en porcentaje de células teñidas en cada campo.

4.5.3 Análisis inmunohistoquímico hepático

Las muestras hepáticas fueron obtenidas como se indica en el apartado del análisis histológico, fijadas en formalina tamponada al 10% durante 24 horas y posteriormente incluidas en parafina para la realización de los cortes en secciones de 4 μm de grosor. Seguidamente se desparafinaron e hidrataron mediante un gradiente descendente de etanol. Las muestras se introdujeron en una olla a presión con solución de citrato (25 mM; pH 6,0) durante 10 minutos; a continuación, fueron transferidas a un recipiente con agua desionizada hirviendo y se dejaron enfriar durante 20 minutos. Las secciones de tejido hepático fueron tratadas con peroxidasa endógena (Sternberger *et al.*, 1970) con el fin de inactivar su actividad. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos específicos frente a α -SMA, LC3-II, SphK1, S1PR1 y S1PR3

(Abcam, Cambridge, Reino Unido), CHOP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) CLOCK y REV-ERB α (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) en una dilución 1:200-1:500 y seguido de la incubación con el anticuerpo secundario (Biotinylated Anti-Rabbit IgG; Vector Laboratoires, Burlingame, CA, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 45 minutos de amplificación con avidina-biotina (ABC Standard; Vector Laboratoires), las muestras se incubaron durante 30 minutos usando el sistema EnVision+ y se revelaron con una solución de 3-3-diaminobencidina (DAB) (Vector Laboratoires). En la primera fase de la reacción, la peroxidasa y el peróxido de hidrógeno forman un complejo que interacciona con la DAB, quedando esta última en estado oxidado. Las moléculas de DAB, una vez oxidadas, presentan unos radicales libres que reaccionan entre sí para formar polímeros insolubles de color marrón oscuro resistentes a los solventes de los lípidos, permitiendo obtener preparaciones histológicas permanentes.

Las secciones fueron teñidas con hematoxilina durante 10 segundos y montadas. La especificidad de la técnica fue evaluada mediante controles séricos negativos en los que se omitió la incubación con el suero inmune primario sustituyéndose por suero preinmune.

Las muestras fueron analizadas por el software WinRoof versión 6.3 con 10 campos histológicos no consecutivos elegidos al azar. Los resultados fueron expresados en porcentaje de células teñidas en cada campo.

4.5.4 Obtención de homogeneizados

En el tejido hepático se realizó la homogeneización de 25 mg de tejido al que se le añadió 1 mL de tampón TrisHCl-Sacarosa (Tris 10 mM, sacarosa 0,25 M y EDTA 1 mM; pH 7,4) y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Posteriormente, se pasaron a un *Eppendorf* donde fueron homogeneizadas físicamente mediante el uso del *Polytron*.

En las células se añadieron 50-75 μL de tampón a cada pocillo de las placas de cultivo de 6 pocillos (700×10^3 - $1,2 \times 10^6$ células). Posteriormente, fueron despegadas de la placa con una espátula o *scraper* de cultivo celular y fueron sonicadas con un procesador de ultrasonidos compacto (Hielscher-Ultrasound Technology, Teltow, Alemania) con 2 pulsos de 20 segundos a una amplitud del 60%.

Posteriormente, las muestras fueron incubadas en hielo durante 30 minutos. Seguidamente se centrifugaron a 13.000 g durante 30 minutos a 4°C, y finalmente se realizaron alícuotas del sobrenadante en tubos *Eppendorf* almacenados a -80°C hasta el momento de su uso.

4.5.5 Concentración de la proteína

Para cuantificar la proteína en las muestras hepáticas y celulares se utilizó la técnica descrita por Bradford (Bradford, 1976). Este método se basa en la unión cuantitativa de un colorante, *Coomassie Brilliant Blue*, a una proteína desconocida y en comparar esta unión a diferentes cantidades de proteína estándar, albúmina sérica bovina (BSA). El *Coomassie Brilliant Blue* es un pigmento de tipo trifenilmetano amónico, que se une de forma no covalente a los restos de lisina de las proteínas. Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Solución de BSA patrón (0,5 mg/mL) (Sigma-Aldrich).
- H₂O miliQ.
- *Coomassie Brilliant Blue solution Bradford* (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU.).

Se realizó la curva patrón y las muestras problema por triplicado en una placa de 96 pocillos. La placa se agitó con el fin de mezclar las muestras y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se leyó la absorbancia a 596 nm. La concentración se expresó en mg de proteína/mL en el lector de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments).

4.5.6 Western blot

La determinación de la expresión protéica en tejido hepático y en células se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot utilizando el sistema modificado de Laemmli (Laemmli, 1970). Los reactivos utilizados para esta técnica fueron los siguientes:

- Solución de ebullición: H₂O; Tris/HCl 2 M; glicerol 60%; SDS 10%; pirrolina 0,5%.
- Tampón de electroforesis: Tris 25 mM; glicina 0,2 M; SDS 3,5 mM; pH 8,8.
- Tampón de transferencia: Tris 25 mM; glicina 0,2 M y metanol 20%.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0,14 M; KH₂PO₄ 8 mM; KCl 2,7 mM.
- Solución salina con 0,05% de Tween 20 [PBS-Tween 0,05% (PBS-T)].
- Solución de bloqueo y de incubación de anticuerpos: 2,5-5% de leche en polvo desnatada en PBS-T.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se tomaron entre 20-30 µg de proteína de los tejidos hepáticos y entre 10-20 µg de proteína procedente de los cultivos celulares diluida en TrisHCl (0,1M; pH 6,8) con un volumen final de 15 µL. Posteriormente, se añadieron 10 µL de la solución de ebullición y se incubó 2 minutos a 100°C. A continuación, se cargaron las muestras en un gel de poliacrilamida (Sigma-Aldrich) en tampón de electroforesis.

Se realizaron diferentes geles de separación al 12-15%, utilizando las mezclas mostradas en la Tabla 3.

Tras rellenar los geles se añadió cuidadosamente isobutanol para evitar la formación de burbujas. Cuando el gel polimerizó, se eliminó el isobutanol mediante varios lavados con agua y finalmente se secó con papel *Whatman*. Seguidamente se realizó el gel de concentración, añadiendo las soluciones mostradas en la Tabla 4.

Tabla 3. Composición de los geles de separación.

Soluciones	12%	15%
Acrilamida (mL)	4,2	6,2
Tris/HCl pH 8,8 1,5 M (mL)	3,5	3,0
SDS 10% (μL)	140	125
APS 10% (μL)	100	62,5
TEMED 1% (μL)	7,0	6,2
Agua (mL)	6,1	2,9

Tabla 4. Composición del gel de concentración.

Soluciones	
Acrilamida (mL)	1,0
Tris/HCl pH 6,8 0,5 M (mL)	2,5
SDS 10% (μL)	100
APS 10% (μL)	200
TEMED 1% (μL)	10
Agua (mL)	6,3

Finalmente se introdujeron los peines intentando evitar la formación de burbujas. Cuando el gel estaba completamente polimerizado se retiraron los peines y se cargaron las muestras.

La electroforesis se realizó a 55 V durante 30-45 minutos, hasta que las muestras se alinean en la parte inferior del gel de concentración, y a partir de ese momento a 110 V hasta que alcanzan la parte inferior del gel de separación.

Transferencia

Las proteínas ya separadas se transfirieron a unas membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) para permitir su exposición a los anticuerpos. Para realizar la transferencia se utilizó un sistema semiseco a 13 V durante 20 minutos (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cells; Bio-Rad).

Bloqueo

Las membranas fueron bloqueadas con leche en polvo al 5% en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y en movimiento.

Incubación con el anticuerpo primario

Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con cada uno de los siguientes anticuerpos policlonales específicos: anti- α -SMA, LC3-I/II, fosfo-mTOR, BiP/GRP78, IRE, fosfo-IRE, ATF6, SphK1, S1PL y CRY1 (Abcam); TGF- β , Col I, PPAR α , p62, LAMP-2, UVRAG, PERK, fosfo-PERK, GRP94 y ROR α (Santa Cruz Biotechnology); BMAL1, CLOCK, PER1, PER2 y REV-ERV α (Thermo Fisher Scientific) con diluciones entre 1:200 a 1:1.000 en leche al 2,5% en PBS-T. Con el fin de comprobar que todas las muestras contenían la misma cantidad de proteína se emplearon anticuerpos policlonales de conejo anti- β -Actina (1:20.000, Sigma-Aldrich).

Transcurrido este periodo de incubación, las membranas se dejaron unos 30 minutos a temperatura ambiente en movimiento, y se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS-T. Posteriormente, se incubaron 1 hora y media con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en una dilución 1:5.000 en leche al 2,5% en PBS-T (Dako, Glostrup, Dinamarca). Finalmente se realizó un lavado de 10 minutos en PBS-T.

Revelado

La detección de la proteína se realizó incubando la membrana con un kit de quimioluminiscencia (Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology) durante 1 minuto en oscuridad. Posteriormente, se introdujo la membrana en un *cassette* junto con una película fotográfica (Amersham Hyperfilm ECL, Amersham, Little Chalfont, Reino Unido)

durante aproximadamente 7-30 minutos. Finalmente, se introdujo la película en la solución reveladora, agua y solución fijadora, y se dejó secar. Tras el revelado y secado de la película se llevó a cabo la cuantificación de las bandas por densitometría utilizando un *software* comercial (Scion Image J Software 1.46a, Bethesda, MD, EE.UU.).

4.5.7 Extracción, purificación y cuantificación de ARN

La extracción de ARN total se realizó a partir de muestras congeladas de hígado y células empleando para ello el reactivo Trizol (Life Technologies, Madrid, España), solución monofásica formada por una mezcla de fenol e isotiocianato de guanidina. Este reactivo es capaz de provocar la ruptura celular y disolver todos los componentes celulares a la vez que mantiene la integridad del ARN. Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Trizol®LS.
- Cloroformo (Sigma-Aldrich).
- Alcohol isopropílico (Sigma-Aldrich).
- Etanol al 75% en agua con dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich).
- Agua libre de ARNasas (Ambion, Paisley, Reino Unido).

En primer lugar, se realizó el homogeneizado del tejido añadiendo 750 μ L de Trizol por cada 100 mg de tejido hepático, y 350 μ L por cada pocillo de 35 mm para los cultivos celulares. En el caso de las líneas celulares se juntaron dos pocillos de células sumando un total de 750 μ L recogidos y siendo, por tanto, el proceso igual que para el tejido hepático. A continuación, se incubó durante 5 minutos a 15-30°C para la completa disociación de los complejos de nucleoproteína. Seguidamente, se añadieron 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente durante unos 15 segundos, dejándose incubar nuevamente durante 5 minutos a 25°C. El homogeneizado obtenido se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 12.000 g, obteniéndose así tres fases: una fase inferior orgánica de color rosa que contiene proteínas, ADN y fenol; una fase intermedia con fenol y cloroformo; y una fase superior acuosa incolora en la que se encuentra el ARN en suspensión.

A la fase acuosa obtenida se le añadió 0,5 mL de alcohol isopropílico y se mezcló por inversión. Seguidamente, se incubó durante 10 minutos a 25°C y se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 12.000 g. El ARN precipitado en forma de *pellet* se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Para ello, se agitó en *vórtex* y se centrifugó nuevamente a 4°C durante 5 minutos a 7.500 g. El *pellet* de ARN se dejó secar durante 30 minutos, dejando así que se evaporasen los restos de trizol, cloroformo, isopropanol y etanol. A continuación, el ARN se resuspendió en agua libre de ARNasas. Finalmente, se incubó a 55°C durante 10 minutos y se almacenó a -80°C.

La cuantificación del ARN se realizó usando un espectrofotómetro Nano Drop1000 (Thermo Fisher Scientific).

4.5.8 Tratamiento del ARN con ADN-asas

Se realizó mediante un kit comercial *RQ1 RNase-free DNase* (Promega, Madison, WI, EE.UU.) que tiene como finalidad degradar las cadenas de ADN simples y dobles, en presencia de Mg^{2+} , y así poder disponer de oligonucleótidos con extremos 3'-OH libres. Los reactivos utilizados fueron:

- Tampón RQ1 ADNasa 10x: Tris HCl 400 mM, pH 8; $MgSO_4$ 100 mM; $CaCl_2$ 10 mM.
- ADNasa libre de ARNasa RQ1.
- ADNasa RQ1 *Stop Solution* 20 mM ácido etilén glicol tetraacético (EGTA), pH 8.

El tratamiento de ADNasas se llevó a cabo al mezclar los siguientes volúmenes:

- 2 µg de ARN
- Enzima ADNasa libre de ARNasa (1 U/µg ARN).
- Tampón RQ1 ADNasa 10x.

La mezcla de reacción se completó con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 18 µL. A continuación, se incubó a 37°C durante 30 minutos en el termociclador (Applied Biosystems, modelo Step One Plus *Sequence Detection System*), tras los cuales se añadió 2 µL de ADNasa RQ1 *Stop Solution* para parar la reacción.

Seguidamente, se incubó de nuevo a 65°C durante 10 minutos para inactivar así las ADNasas.

4.5.9 Reacción de la transcriptasa reversa

Se utilizó el sistema *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), basado en la capacidad de la transcriptasa reversa para sintetizar una cadena complementaria de ADN (ADNc) a partir de una secuencia molde de ARN. Para ello, se utilizaron cantidades idénticas de ARN total de cada uno de los animales de los diferentes grupos experimentales, y de los grupos celulares. Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Tampón RT-PCR 10x: Tris HCl 100 mM; KCl 500 mM; MgCl₂ 15 mM; pH 8,3.
- Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 25x .
- Iniciadores (mezcla de nucleósidos) 10x.
- Transcriptasa reversa *MultiScribe* (50 U/mL).
- Inhibidor de ARNasas (1 U/mL).
- Agua libre de nucleasas (Ambion).

Con el fin de desnaturalizar las posibles estructuras secundarias del ARN y facilitar el anillamiento de los iniciadores, se añadieron a los 20 µL de ARN tratado con ADNasas, los siguientes reactivos:

- 4 µL de tampón RT-PCR.
- 1,6 µL de mezcla de dNTP.
- 4 µL de iniciadores.
- 2 µL de la enzima transcriptasa reversa *MultiScribe*.
- 1 µL de inhibidor de ARNasas.

La mezcla de reacción se completó con agua libre de nucleasas hasta un volumen de 40 µL. Posteriormente, se incubaron las muestras en el termociclador (Applied Biosystems, modelo Step One Plus *Sequence Detection System*) durante 10 minutos a

25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C y finalmente 2 minutos a 4°C. El ADNc obtenido se congeló a -20°C hasta el momento de su utilización.

4.5.10 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR)

La PCR se realizó según un procedimiento basado en el proceso natural de replicación del ADN con amplificación cíclica (Mullis y Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1989). Partiendo de una molécula de ADN diana es posible amplificar una secuencia específica contenida en ella mediante la utilización de oligonucleótidos iniciadores diseñados a tal efecto. El método consta de tres etapas: desnaturalización, anillamiento y elongación, efectuados de forma sucesiva en unas condiciones controladas de temperatura y de tiempo (Figura 16).

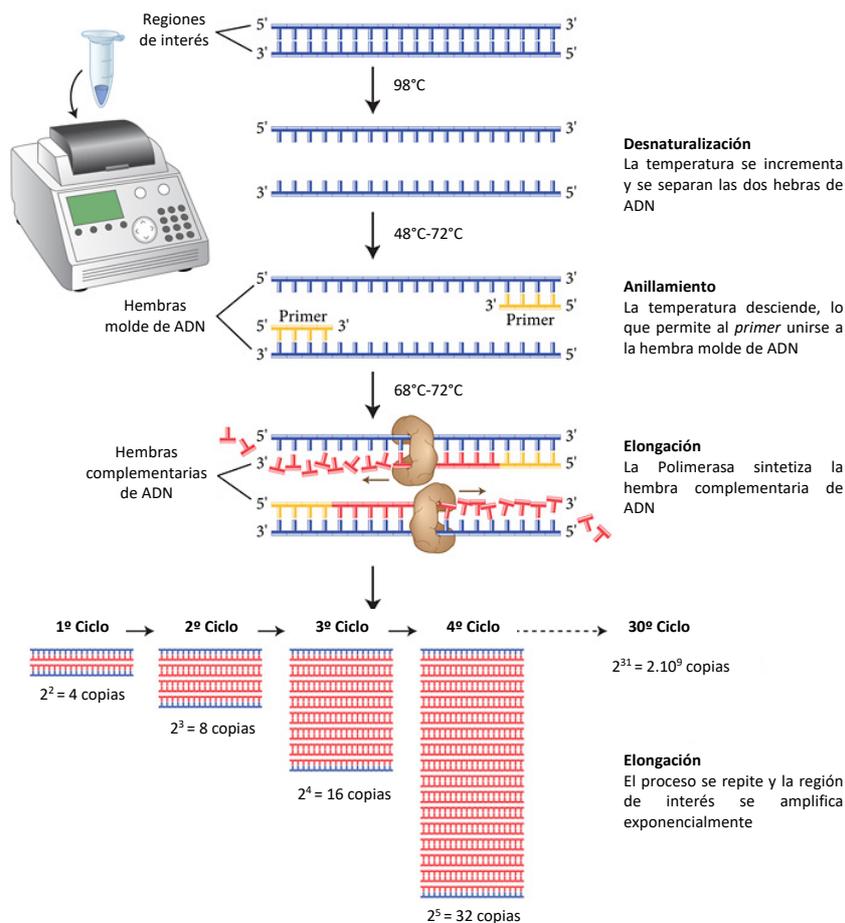


Figura 16. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa.

En el presente estudio, se realizó la metodología de la RT-PCR para la estimación de la concentración de ARNm mediante el uso de *SYBR Green Master (Rox) 2x* (Roche Diagnostics GmbH) y los iniciadores correspondientes (Tablas 3-7). Como gen constitutivo, para normalizar los resultados, se utilizó β -Actina.

En una placa de 96 pocillos se preparó la siguiente mezcla de reacción con un volumen final de 20 μ L:

- 0,4 μ L de Iniciadores 15 μ M (sentido y antisentido).
- 2 μ L de ADNc.
- 10 μ L de *FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 2x* (Roche Diagnostics GmbH)
- 7,2 μ L de agua libre de nucleasas (Ambion).

Tabla 5. Secuencias específicas de los iniciadores de fibrosis utilizados para la RT-PCR por Syber Green.

	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')
Gen de ratón		
α -SMA	CCGACCGAATGCAGAAGG	AAGGTAGACAGCGAAGCCAA
TFG- β	TCGTGGAACATGACAAGGAATTC	AAGATCAAACCGGGAAGCTCTCGAT
Col I	GAGACTGTTCTGTTCTTGTGTAAGT	CCCCGGTGACACATCAAGAC
PPAR α	AGCTGGTGTAGCAAGTGT	TCTGCTTTCAGTTTTGCTTT
β -Actina	AATCGTGCGTGACATCAAAGAG	GCCATCTCTGCTCGAAGTCT
Gen de humano		
α -SMA	GACAGCTACGTGGGTGACGAA	CGGGTACTTCAGGGTCAGGAT
TGF- β	TCGTGGAACATGACAAGGAATTC	AAGATCAAACCGGGAAGCTCTCGAT
COL I	GAGACTGTTCTGTTCTTGTGTAAGT	CCCCGGTGACACATCAAGAC
β -Actina	TTGCCGACAGGATGCAGAA	GCCGATCCACACGGAGTACT

Tabla 6. Secuencias específicas de los iniciadores de autofagia utilizados para la RT-PCR por Syber Green.

Gen	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')
Atg5	CGGAGCGGCCTTTCATC	AAGTGTGTGCAGCTGTCCATCT
Atg12	GGTTCTTGCGCCTCATCCT	GGTGCCTGAGCGCTGAGA
Atg16	GCAGGGCCGGGTTACCT	TCTCGGGAACAGCTAAGCAGAT
Beclina-1	GGACAAGCTCAAGAAAACCAATGT	TGTCCGCTGTGCCAGATG
β -Actina	AATCGTGCGTGACATCAAAGAG	GCCATCTCCTGCTCGAAGTCT

Tabla 7. Secuencias específicas de los iniciadores de estrés del RE utilizados para la RT-PCR por Syber Green.

Gen	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')
ATF4	CTCAGACAGTGAACCCAATTGG	GGCAACCTGGTCGACTTTTATT
ATF6	TTTCAGGGCAGGGCCATT	CCCGAGAGCCAATCAGGAT
IRE1	GCTCAAGGACATGGCTACCATTA	TGAACGCCACCCATCCA
PERK	GATGACTGCAATTACGCTATCAAGA	CCTTCTCCCGTGCCAATC
XBP1	TGCCCCCGACATG	AGAAAGAAATGCTAAGGGCCATT
β -Actina	AATCGTGCGTGACATCAAAGAG	GCCATCTCCTGCTCGAAGTCT

Tabla 8. Secuencias específicas de los iniciadores de la vía de los esfingolípidos utilizados para la RT-PCR por Syber Green.

	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')
Gen de ratón		
SphK1	ACTGATACTCACCGAACGGAA	CCATCACCGGACATGACTGC
S1PR1	ATGGTGTCCACTAGCATCCC	CGATGTTCAACTTGCCTGTGTAG
S1PR2	ATGGGCGGCTTATACTCAGAG	GCGCAGCACAAAGATGATGAT
S1PR3	ACTCTCCGGGAACATTACGAT	CAAGACGATGAAGCTACAGGTG
S1PL	ACCAGACCCTTTCCACATTT	ACTGCCACATGTGCAGGAT
ASMasa	CAAGCTGGAAGCGCCTCTAC	AGGCAGGCATCGCATCTG
β -Actina	AATCGTGCGTGACATCAAAGAG	GCCATCTCCTGCTCGAAGTCT
Gen de humano		
SphK1	TGGCAGCTTCCTGAACCAT	TGGTCAGGAGGTCTTCATTGG
S1PR1	ACTCCCGCCCAGTGGTTT	AGGCTGACAGGGCCACAA
S1PR2	CCATCTTCTCCATCATCCTGTTG	GAGCGGACCACGCAGTAGA
S1PR3	ACAACTCGGAGCGGTCCAT	TGAACACGCTCACCACAATCA
S1PL	GCTCTGGGATCCCGTGATT	TTCAAGTTCCACCCCTTAGCA
ASMasa	CTGACTCTCGGTTCTCTGG	AGGTTGATGGCGGTGAATAG
β -Actina	TTGCCGACAGGATGCAGAA	GCCGATCCACACGGAGTACT

Tabla 9. Secuencias específicas de los iniciadores de la vía de los genes *clock* utilizados para la RT-PCR por Syber Green.

	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')
Gen de ratón		
Bmal1 (Arntl)	GATCGAAAAAGCTTCTGCACAA	GGGTGGCCAGCTTTTCAA
Clock	TTAGTGACTGCTCCTGTAGCTTGTG	CACCACCTGACCATAAGCAT
Per1	GCCAGGTGTCGTGATTAATTAGTC	GGGCTTTTGAGGTCTGGATAAA
Per2	CACGCTGGCAACCTGAAGT	TGGTAGTACTCCTCATTAGCCTTCAC
Per3	AGCCTCCCGCCTTGA	GATTGGCTTGGCTTCTTCTGA
Cry1	TCGCCGGCTCTTCAA	TCAAGACACTGAAGCAAAAATCG
Cry2	CGGCCCATCGTCAATCAT	TGGAGATCTGCTTCATTGTTCA
Rev-erb α (Nr1d1)	CCCAACGACAACAACCTTTTG	CCCTGGCGTAGACCATTGAG
Ror α (Rora)	GCGGTTGACCTCGGCATAT	ACGCTGGACTCTGCTGTTACC
β -Actina	AATCGTGCGTGACATCAAAGAG	GCCATCTCCTGCTCGAAGTCT
Gen de humano		
BMAL1 (ARNTL)	AGCTGCCTCGTCGCAATT	CCGTTCACTGGTTGTGGAAC
CLOCK	AAATATGCAAGGCCAAGTTGTTT	AAATATGCAAGGCCAAGTTGTTT
PER2	GCGAAGGTGTCGGCTATGA	GTCCTCCACGGAGAAATTCAAG
CRY1	TTGAGTCAAGGTCCAGTTTGAATG	GGAGTCCAGGGTCGTCATGT
ROR α (RORA)	GCTTCTTCCCTACTGTTGTTCA	GCTGGAGCTCTTCTCTCAAGTATTG
REV-ERB α (NR1D1)	TTGAGTCAAGGTCCAGTTTGAATG	GGAGTCCAGGGTCGTCATGT
β -Actina	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG

Las condiciones del termociclador Step One Plus *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) fueron las siguientes:

- Etapa inicial de desnaturalización de 10 minutos a 95°C.
- Etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95°C.
- Etapa de anillamiento/elongación de 1 minuto a 60°C.

Las etapas 2 y 3 se repitieron a lo largo de 50 ciclos. Los cambios relativos en los niveles de expresión de genes se determinaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El ciclo en el cual las transcripciones fueron detectables (Ct) se normalizó para el número de ciclos de detección del gen de β -Actina, referido como DCt.

4.5.11 Microscopia electrónica de transmisión (MET)

Para el análisis de microscopía electrónica de transmisión (MET), se utilizaron muestras de hígado previamente seccionadas en porciones de 1 mm³, con el fin de que hubiese una buena penetración del fijador. El fijador utilizado fue una variedad del Karnovsky [2% de glutaraldehído + 4% de formalina tamponada (tampón fosfato 0,1 M)], y se dejó actuar durante toda la noche. Posteriormente, se realizó otra fijación en 2% de tetraóxido de osmio durante 2 horas a 4°C y finalmente las muestras se deshidrataron con grados ascendentes de alcohol.

Para realizar los cortes se embebieron los bloques de tejido en resina EPON a 60°C durante 72 horas y se dejaron secar. Los cortes ultrafinos (70 nm) se realizaron con un ultra-micrótopo automático (Reichert Ultracut E; Viena, Austria), utilizando una cuchilla de diamante.

Las secciones se recogieron en rejillas de cobre (200 mallas) y se tiñeron con soluciones de acetato de uranilo y citrato de plomo.

Las muestras fueron observadas bajo el microscopio electrónico de transmisión (JEOL Ltd; Tokio, Japón), que funciona a un voltaje de aceleración de 80 Kv.

4.5.12 Microscopía de fluorescencia

Para realizar la inmunofluorescencia en las células LX2, estas fueron sembradas y tratadas en portas de vidrio específicos. Se utilizaron placas de 48 pocillos con 100×10^3 células por pocillo. Una vez realizados los tratamientos específicos del experimento, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS. Se permeabilizaron con Saponina al 0,2% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron incubadas con los anticuerpos policlonales anti-BMAL1 (Thermo Fisher Scientific) y α -SMA (Abcam) a una concentración de entre 1:500-1:1.000 en PBS 1X al 1% de BSA, durante toda la noche a 4°C. A continuación, se lavaron con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 a una concentración 1:1.000 anti-conejo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para el contraste de los núcleos se utilizó DAPI (Sigma-Aldrich). Tras el montaje, las muestras se visualizaron en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse Ti®).

4.5.13 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La concentración de S1P fue cuantificada mediante una prueba ELISA usando un kit comercial (Echelon Biosciences, UT, USA). La evaluación cuantitativa de S1P se realizó empleando duplicados de muestras de homogeneizados de hígado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los niveles se expresaron en pmol/ μ g de proteína.

4.6 Tratamiento estadístico

Los resultados se expresaron en valores medios \pm error estándar de la media (EEM). Los datos fueron comparados por un análisis de varianza (ANOVA); cuando el análisis indicó la presencia de una diferencia significativa, las medias fueron comparadas con la prueba de Newman-Keul's. Se aceptó que las diferencias eran significativas cuando $p < 0,05$.

Los valores fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS 22.0 (IBM Corporation; Armonk, Nueva York, EE.UU.).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Efecto del tratamiento con melatonina sobre los marcadores de daño en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄ y en HSCs humanas de la línea LX2

5.1.1 Efecto del tratamiento con melatonina sobre los marcadores de daño hepático en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄

En el modelo animal de fibrosis hepática, inducida mediante la administración de CCl₄, se observó un aumento significativo de los niveles de las enzimas hepáticas AST y ALT en el suero de los animales tras el sacrificio tanto a las 4 como a las 6 semanas de administrar el hepatotóxico. Como se observa en la Tabla 10 el tratamiento con melatonina (5 ó 10 mg/Kg) disminuyó el daño hepático como indica la reducción de dichos niveles en ambos periodos.

Tabla 10. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre los niveles de ALT y AST en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w).

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)
Control	25,6 ± 0,5	57,8 ± 5,9
Control + Mel	22,3 ± 0,7	52,5 ± 9,6
CCl₄ 4w	1474 ± 152 ^a	940 ± 134 ^a
CCl₄ + 5Mel 4w	753 ± 198 ^{ab}	664 ± 75 ^{ab}
CCl₄ + 10Mel 4w	499 ± 70 ^{abc}	416 ± 100 ^{abc}
CCl₄ 6w	3915 ± 587 ^a	2721 ± 163 ^a
CCl₄ + 5Mel 6w	1917 ± 529 ^{abc}	1137 ± 264 ^{ab}
CCl₄ + 10Mel 6w	1473 ± 242 ^{ab}	860 ± 86 ^{abc}

Valores medios ± EEM (n=7). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp<0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

El daño hepático producido por la administración del agente químico también provocó el desarrollo de septos fibróticos formados por la acumulación excesiva de

tejido conectivo como se muestra en la Figura 17 (c y f), en comparación con los animales del grupo Control, donde se puede observar una arquitectura hepática normal con una vena central de la que parten los cordones radiales de hepatocitos (Figura 17 a y b).

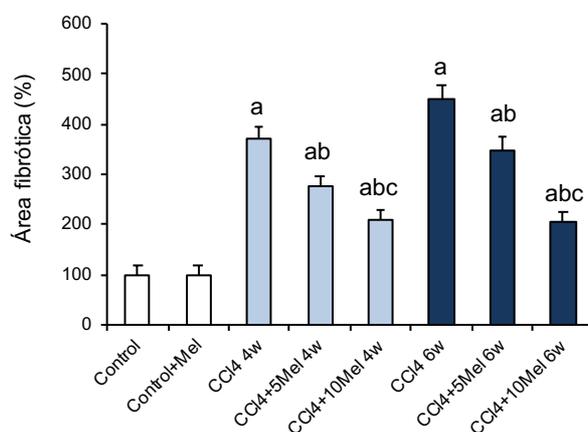
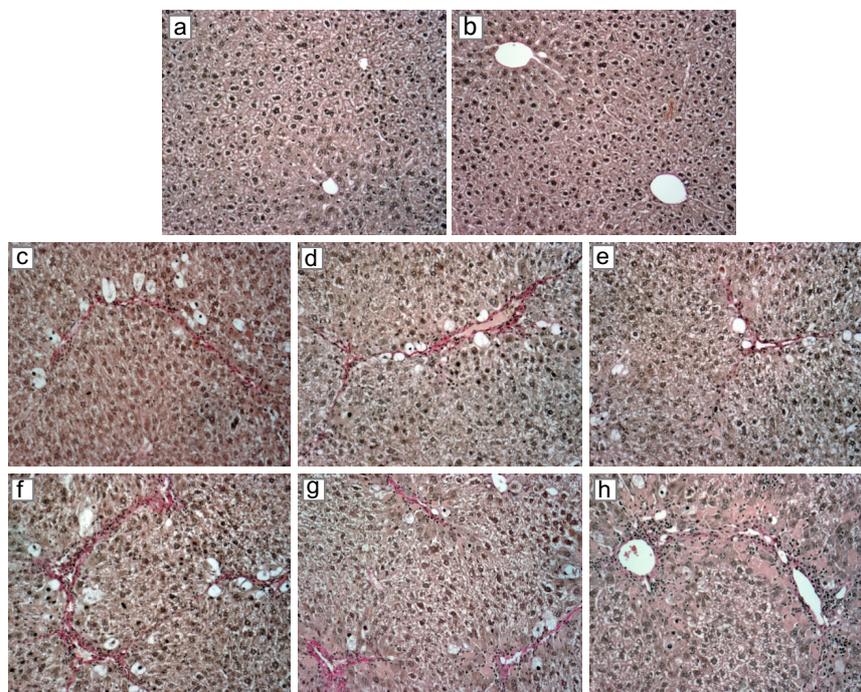


Figura 17. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la histología en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra la histología hepática en los diferentes grupos de estudio. a: Control, b: Control+Mel, c: CCl₄ 4w, d: CCl₄+5Mel 4w, e: CCl₄+10Mel 4w, f: CCl₄ 6w, g: CCl₄+5Mel 6w, h: CCl₄+10Mel 6w. El panel inferior muestra el análisis de las áreas positivas frente al Control. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp<0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

La administración del indol indujo una disminución del tamaño de los septos, mostrándose más finos, así como una mayor preservación del tejido parenquimatoso. La cuantificación de las áreas fibróticas mostró una disminución significativa en los animales tratados con la melatonina a ambas dosis en los dos periodos estudiados (Figura 17).

Como se mencionó anteriormente, la activación de las HSCs induce la síntesis de α -SMA, por lo que se realizó un análisis inmunohistoquímico para ese marcador con el objetivo de evaluar el grado de activación de las principales células responsables de desencadenar la fibrogénesis. Los resultados muestran una elevada acumulación de HSCs activadas en los animales a los que se les administró CCl₄, siendo más significativo a las 6 semanas de la inducción de la fibrosis, comparados con los grupos Control. Sin embargo, la administración de melatonina indujo una reducción significativa de la expresión del marcador de fibrogénesis de manera dosis dependiente (Figura 18).

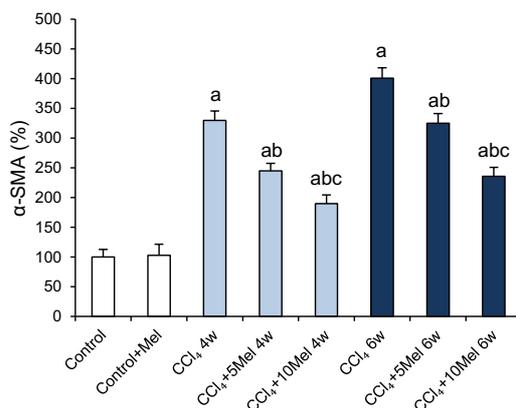
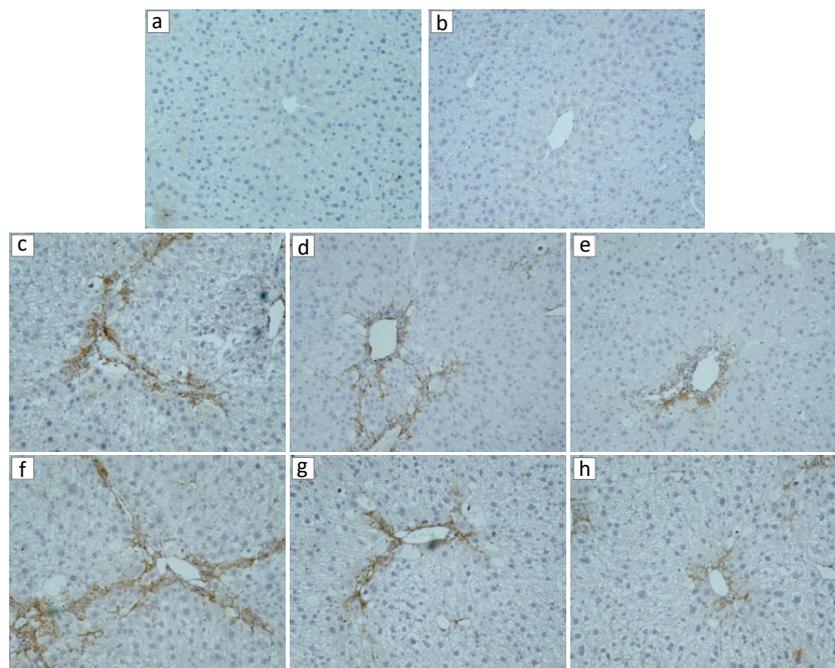


Figura 18. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de α -SMA en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra la detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de α -SMA en los diferentes grupos de estudio. a: Control, b: Control+Mel, c: CCl₄ 4w, d: CCl₄+5Mel 4w, e: CCl₄+10Mel 4w, f: CCl₄ 6w, g: CCl₄+5Mel 6w, h: CCl₄+10Mel 6w. El panel inferior muestra el análisis de las áreas positivas frente al Control. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp<0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

Asimismo, se determinaron la expresión proteica y de ARNm de α -SMA junto con la de las principales proteínas involucradas en la progresión del proceso fibrogénico como son TGF- β , Col I y PPAR α . La expresión de TGF- β y Col I aumentó de manera significativa en los animales con fibrosis hepática, mientras que la melatonina consiguió disminuir dicho efecto llegando en algunos casos a niveles similares a los animales Control (Figura 19). PPAR α tiene un importante efecto en el desarrollo de la fibrosis puesto que realiza una acción inhibitoria sobre la activación de las HSCs y sobre el efecto profibrótico de TGF- β , que induce la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos aumentando el proceso fibrogénico (Zardi *et al.*, 2013). La expresión de esta proteína disminuyó significativamente en los animales a los que se les administró el CCl₄; sin embargo, la administración de ambas dosis de melatonina aminoró dicho efecto (Figura 20).

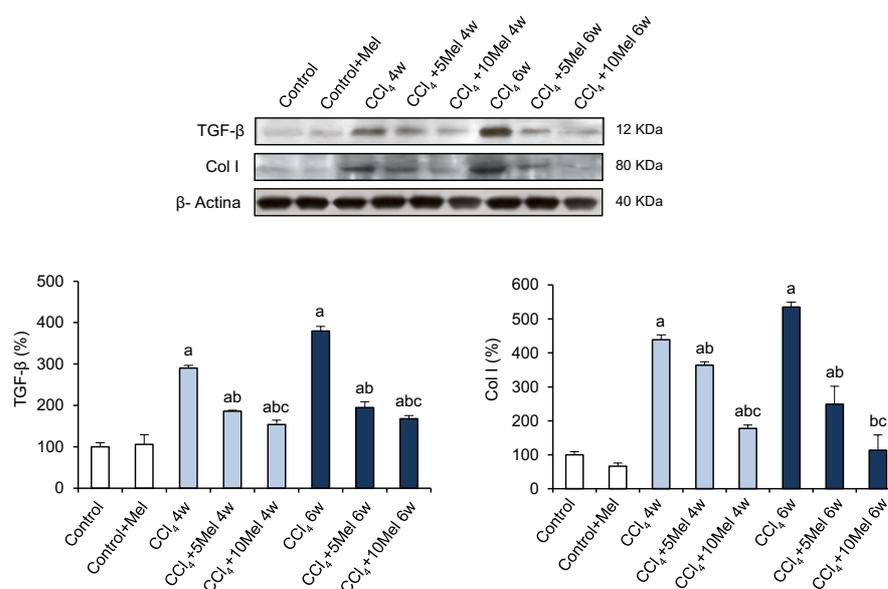


Figura 19. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de TGF- β y Col I en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra los Western blots representativos de la expresión hepática de TGF- β y Col I. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -Actina. Los paneles inferiores muestran el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap < 0,05 con respecto al grupo Control. ^bp < 0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp < 0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

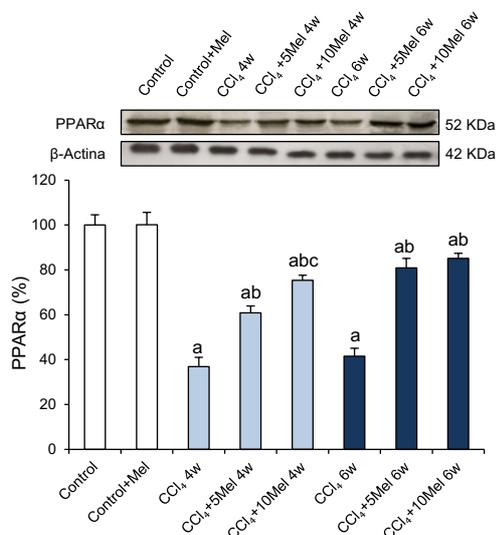


Figura 20. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de PPAR α en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra el Western blot representativo de la expresión hepática de PPAR α . La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp <0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

Los resultados de la expresión proteica de algunos de los principales marcadores involucrados en la fibrogénesis, fueron similares a los niveles de ARNm obtenidos para los mismos genes. Así, el tratamiento con melatonina redujo la expresión de los marcadores de fibrosis (α -SMA, TGF- β y Col I) mientras que aminoró la reducción de los niveles de PPAR α inducida por el CCl₄ (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de α -SMA, TGF- β , Col I y PPAR α en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w).

	α -SMA	TGF- β	Col I	PPAR α
Control	100 \pm 6	100 \pm 3	100 \pm 5	100 \pm 6
Control + Mel	97 \pm 5	99 \pm 5	90 \pm 6	97 \pm 3
CCl₄ 4w	596 \pm 24 ^a	252 \pm 32 ^a	986 \pm 83 ^a	53 \pm 6 ^a
CCl₄ + 5Mel 4w	491 \pm 9 ^{ab}	206 \pm 4 ^b	871 \pm 57 ^{ab}	61 \pm 8 ^a
CCl₄ + 10Mel 4w	356 \pm 13 ^{abc}	108 \pm 3 ^b	532 \pm 44 ^{abc}	72 \pm 7 ^{abc}
CCl₄ 6w	657 \pm 24 ^a	367 \pm 1 ^a	1217 \pm 5 ^a	47 \pm 10 ^a
CCl₄ + 5Mel 6w	564 \pm 19 ^{ab}	253 \pm 32 ^b	1023 \pm 54 ^b	59 \pm 8 ^{ab}
CCl₄ + 10Mel 6w	391 \pm 20 ^{abc}	174 \pm 5 ^{bc}	970 \pm 33 ^{bc}	78 \pm 9 ^{abc}

Expresión analizada mediante ensayos de RT-PCR, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -Actina. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp <0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

5.1.2 Efecto del tratamiento con melatonina sobre los marcadores de fibrosis en HSCs humanas de la línea LX2

Con el objetivo de corroborar si el efecto antifibrótico que ejerce la melatonina en el modelo animal de fibrosis hepática era extrapolable a humanos, se realizaron los tratamientos con melatonina en HSCs humanas de la línea LX2 activadas. Los resultados obtenidos indican que el efecto protector ejercido en las células de la línea LX2 es similar al realizado en el modelo animal. En la Tabla 12 se puede observar que la activación de las células LX2 con TGF- β , provocó un aumento en los niveles de ARNm de los marcadores profibróticos α -SMA, TGF- β y Col I, junto con una disminución del marcador antifibrótico PPAR α . Estos valores se regularon con la administración de la melatonina a ambas dosis y de manera dosis dependiente, en el caso de los marcadores α -SMA y TGF- β .

Tabla 12. Efecto del tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de α -SMA, TGF- β y Col I en las LX2.

	α -SMA	TGF- β	Col I
Control	100 \pm 5	100 \pm 7	100 \pm 6
Control + Mel	84 \pm 8	113 \pm 8	82 \pm 5
TGF-β	285 \pm 21 ^a	168 \pm 12 ^a	395 \pm 17 ^a
TGF-β + 100Mel	175 \pm 4 ^{ab}	110 \pm 5 ^{ab}	271 \pm 11 ^{ab}
TGF-β + 500Mel	130 \pm 6 ^{abc}	67 \pm 7 ^{abc}	235 \pm 12 ^{ab}

Expresión analizada mediante ensayos de RT-PCR, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -Actina. Valores medios \pm EEM (n=6). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo TGF- β . ^cp <0,05 con respecto al grupo 100Mel.

5.2 Efecto del tratamiento con melatonina sobre la vía de la autofagia en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄

Una técnica muy útil para comprobar el mecanismo de autofagia, es la detección de vesículas autofágicas o autofagosomas mediante MET. Recurriendo por tanto a esta técnica, se observó un aumento de diversas estructuras autofágicas en el hígado de los ratones expuestos a CCl₄. Se observó una apariencia normal en los hepatocitos de los ratones Control (Figura 21 a y b), mientras que en los grupos tratados con CCl₄ (Figura 21 c y f) se puede observar la presencia de fagóforos, autofagosomas de doble membrana con orgánulos dañados, y autolisosomas con una gran vacuola que contiene gran cantidad de restos celulares, tanto a las 4 como a las 6 semanas de la administración del agente químico (Figura 21). Sin embargo, en los ratones tratados con ambas dosis de melatonina, se identificó un menor número de vacuolas autofágicas (Figura 21 d, e, g y h).

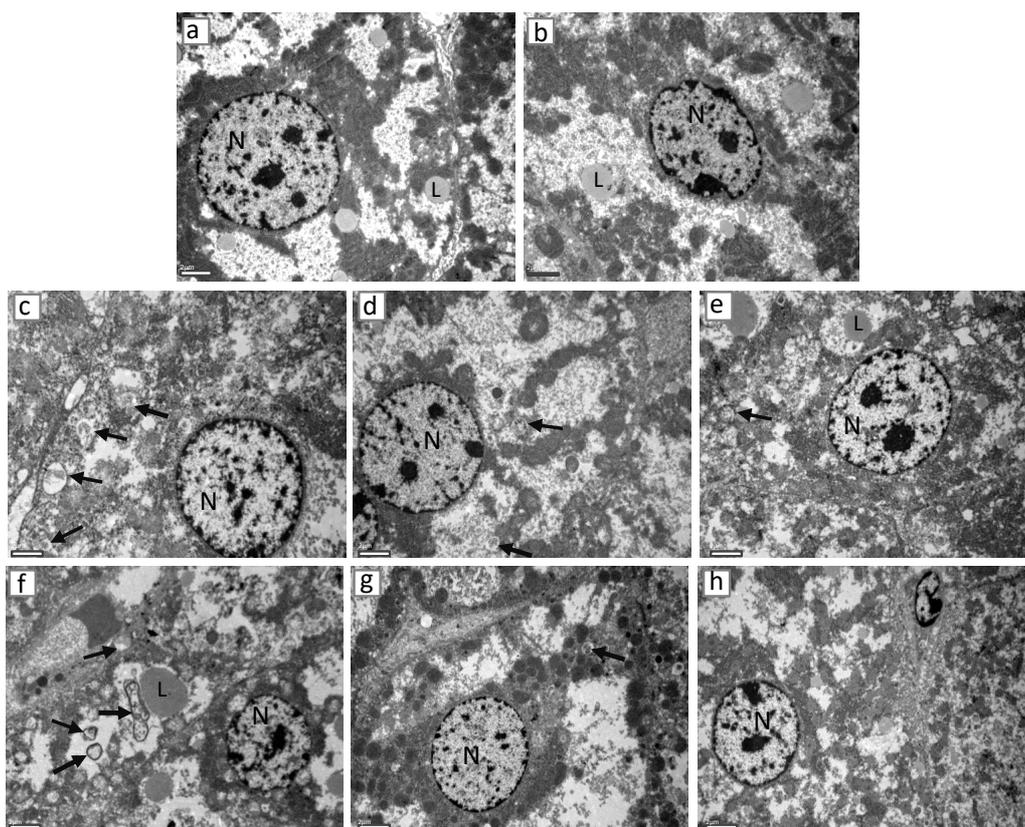


Figura 21. Efecto del CCl_4 y el tratamiento con melatonina sobre la MET de secciones hepáticas en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). a: Control, b: Control+Mel, c: CCl_4 4w, d: CCl_4 +5Mel 4w, e: CCl_4 +10Mel 4w, f: CCl_4 6w, g: CCl_4 +5Mel 6w, h: CCl_4 +10Mel 6w.

La molécula más usada como marcador de autofagia es la proteína LC3, ya que interviene de forma directa en la formación del autofagosoma. Ante un estrés celular, como puede ser la administración de una sustancia tóxica, la expresión de LC3 se ve regulada de forma positiva, promoviendo la unión de fosfoetanolamina citosólica (LC3-I), para convertirse en la forma específica del autofagosoma, LC3-II, que posteriormente se unirá a la membrana autofagosomal, para la formación del autofagosoma (Pankiv *et al.*, 2007; Mehta *et al.*, 2014). Por lo tanto, la conversión de LC3-I a LC3-II se constituye como un marcador específico de la autofagia. Mediante inmunofluorescencia dirigida hacia LC3 (LC3-II), se observó un aumento significativo de la expresión proteica, que fue parcialmente inhibido en los grupos tratados con melatonina (Figura 22).

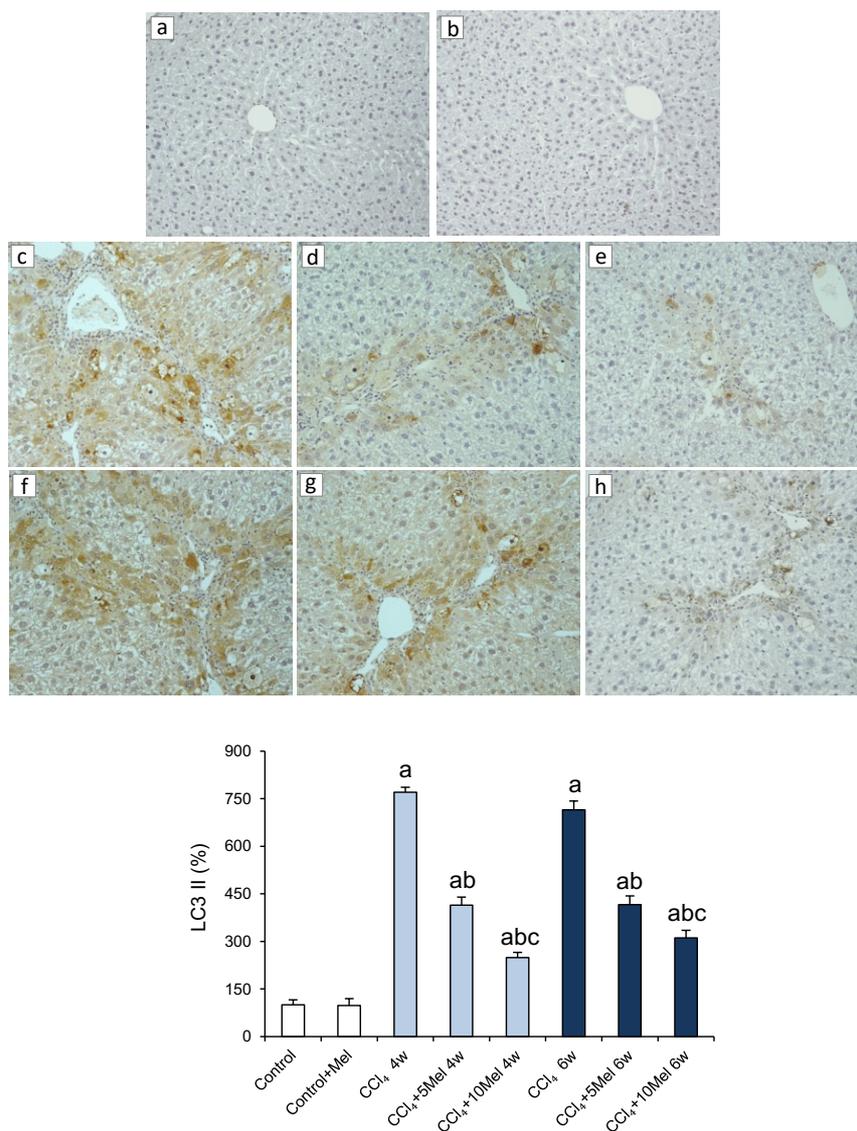


Figura 22. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de LC3-II en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra la detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de LC3-II en los diferentes grupos de estudio. a: Control, b: Control+Mel, c: CCl₄ 4w, d: CCl₄+5Mel 4w, e: CCl₄+10Mel 4w, f: CCl₄ 6w, g: CCl₄+5Mel 6w, h: CCl₄+10Mel 6w. El panel inferior muestra el análisis de las áreas positivas frente al Control. Valores medios ± EEM (n=7). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo período de estudio. ^cp <0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

Con el fin de determinar con mayor profundidad los efectos del CCl₄ y la melatonina sobre la autofagia, se estudiaron los marcadores más importantes involucrados en la autofagia, mediante RT-PCR y Western blot.

Cuando se analizaron los homogeneizados de hígado de ratón expuestos a CCl₄ mediante Western blot, con el fin de detectar las diferentes formas de LC3, se observó un aumento significativo de la relación LC3-II/LC3-I. Además, el marcador lisosomal LAMP-2 aumentó su expresión, probablemente debido a una mayor acumulación de autofagolisosomas. Por otro lado, se observó una disminución en la expresión de p62, proteína adaptadora que sirve como receptor de la autofagia para dirigir proteínas de ubiquitina hacia los autofagosomas para su degradación. Esta disminución podría ser indicativa de un aumento del flujo autofágico. Todos estos resultados fueron observados tanto a las 4 como a las 6 semanas de la administración del CCl₄ (Figura 23).

Además del sistema LC3, hay un segundo sistema similar a ubiquitina esencial para la formación del autofagosoma que está formado por el complejo Atg12-Atg5-Atg16 (Komatsu, 2012; Sorbara *et al.*, 2013), situado en la capa externa de la membrana de aislamiento. Para confirmar que la administración de CCl₄ estimula la autofagia, se cuantificó la activación de la expresión de los niveles de ARNm de los componentes del complejo de proteínas Atg. Los resultados obtenidos indican que los niveles de ARNm de Atg12, Atg5 y Atg16 se incrementaron significativamente a las 4 y 6 semanas de la administración del CCl₄ (Tabla 13).

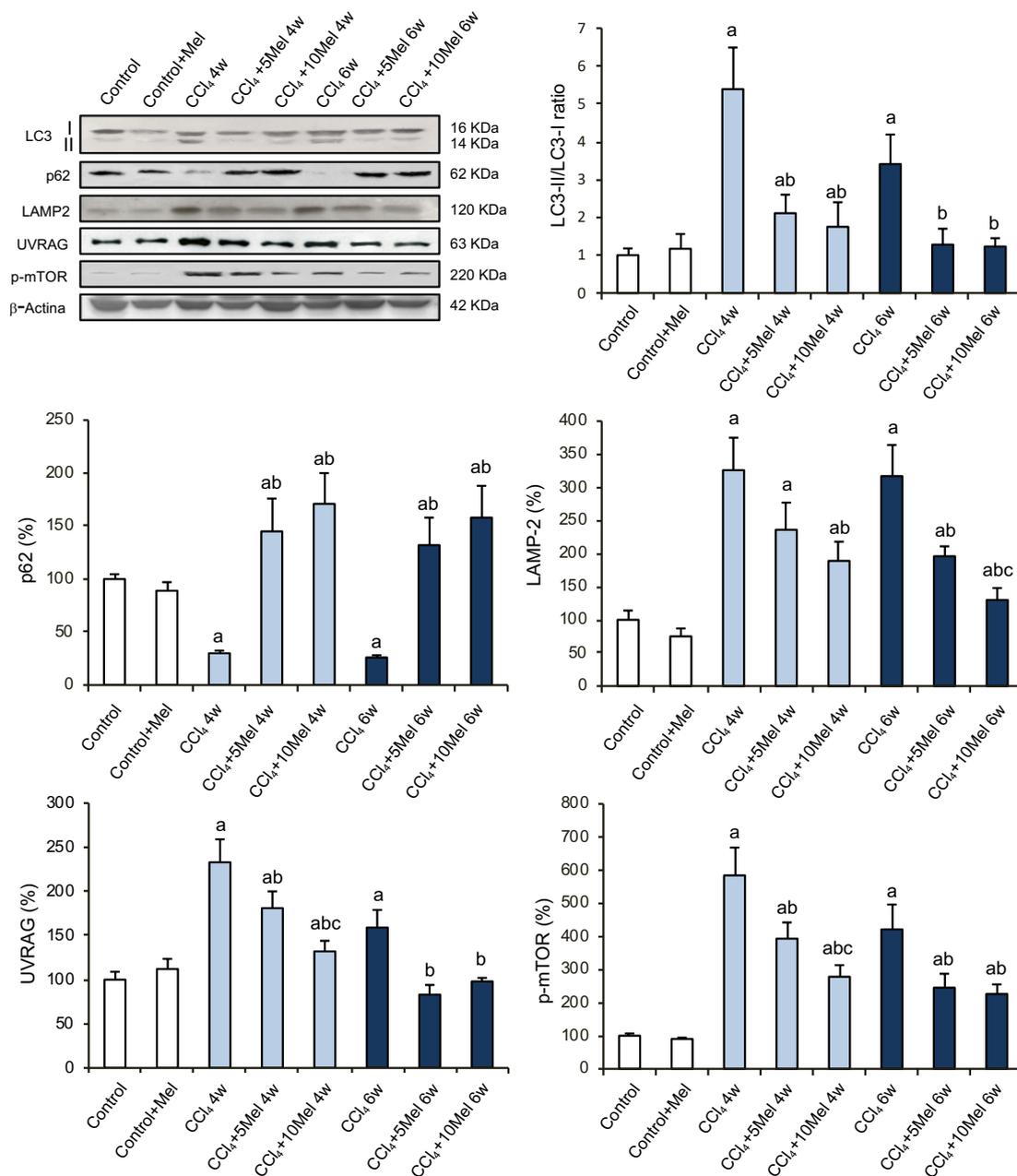


Figura 23. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de LC3-I/II, p62, LAMP-2, UVRAG y p-mTOR en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior izquierdo muestra los Western blots representativos de la expresión hepática de LC3-I, LC3-II, p62, LAMP-2, UVRAG y p-mTOR. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β-Actina. El resto de paneles muestran el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ± EEM (n=7). ^ap < 0,05 con respecto al grupo Control. ^bp < 0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp < 0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

Tabla 13. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de Beclina-1, Atg5, Atg12 y Atg16 en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w).

	Beclina-1	Atg5	Atg12	Atg16
Control	100 ± 4	100 ± 7	100 ± 10	100 ± 5
Control+Mel	94 ± 3	102 ± 11	103 ± 3	99 ± 5
CCl₄ 4w	190 ± 9 ^a	187 ± 22 ^a	141 ± 14 ^a	176 ± 4 ^a
CCl₄+5Mel 4w	163 ± 8 ^a	132 ± 5 ^{ab}	135 ± 4 ^a	136 ± 8 ^{ab}
CCl₄+10Mel 4w	128 ± 16 ^{bc}	123 ± 10 ^b	106 ± 2 ^{bc}	90 ± 2 ^{bc}
CCl₄ 6w	202 ± 8 ^a	201 ± 16 ^a	129 ± 1 ^a	120 ± 6 ^a
CCl₄+5Mel 6w	153 ± 12 ^{ab}	135 ± 6 ^{ab}	103 ± 5 ^b	89 ± 1 ^b
CCl₄+10Mel 6w	122 ± 15 ^b	103 ± 19 ^{bc}	95 ± 10 ^b	81 ± 11 ^b

Expresión analizada mediante ensayos de RT-PCR, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β-Actina. Valores medios ± EEM (n=7). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp<0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

De igual modo, el complejo Beclina-1-PI3K es otro de los elementos críticos en la vía de señalización de la autofagia. Los resultados muestran un aumento de los niveles de ARNm de Beclina-1 paralelamente a los cambios detectados en ambos sistemas similares a ubiquitina. Este efecto se asoció a un aumento de la expresión de UVRAG, que interactúa con Beclina-1 en las primeras etapas, conduciendo a la activación de la autofagia a través de la maduración del autofagosoma (Pankiv *et al.*, 2007).

Una de las principales vías de regulación de la autofagia, es la realizada a través del factor mTOR (Komatsu, 2012; Choi *et al.*, 2013; Shinohara *et al.*, 2013; Booth *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014a) ya que participa en la activación de la autofagia cuando la célula sufre un estrés por escasez de nutrientes, aunque los mecanismos de inducción de la autofagia a través del factor son aún desconocidos. Sin embargo, los datos obtenidos en nuestro estudio indican que la expresión hepática de fosfo-mTOR se incrementó significativamente en los ratones que recibieron CCl₄ (Figura 23), retroalimentando positivamente la vía.

El tratamiento con melatonina, logró aminorar los efectos producidos por el CCl₄ en los diferentes marcadores de autofagia que, sin embargo, no siempre fue un efecto dependiente de la dosis (Figura 23 y Tabla 13).

5.3 Efecto del tratamiento con melatonina sobre el estrés del retículo endoplasmático en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄

Se ha comprobado que el estrés del RE induce la actividad fibrogénica a través de la autofagia. Durante el estrés del RE, diferentes factores de transcripción regulan la expresión de chaperonas del RE que mejoran la capacidad de plegado, incluyendo CHOP, BiP y GRP94. Por todo ello, se analizó la expresión de diversos genes relacionados con esta vía. Además, la señalización de la UPR tiene tres efectores reguladores: PERK, ATF6 e IRE-1. Estos efectores modulan la expresión de las chaperonas del RE con la contribución de ATF4 y XBP1.

La inducción de la fibrogénesis mediante la administración de CCl₄ provocó un aumento significativo en la inmunoexpresión de CHOP (Figura 24), así como un aumento en la expresión de las proteínas BiP y GRP94 (Figura 25). Además, la administración del tóxico generó un aumento en los niveles de ARNm de PERK, ATF4, ATF6, IRE1 y XBP1 (Tabla 14), así como de la expresión proteica de p-IRE, ATF6 y p-PERK (Figura 25). Este aumento se observó tanto a las 4 como a las 6 semanas de la administración del agente químico. El tratamiento con melatonina indujo una disminución significativa de la expresión de CHOP asociada con la intoxicación con CCl₄ (Figura 24). El efecto inhibitorio de ambas dosis del indol sobre CHOP, se produjo de manera similar al de las proteínas BiP y GRP94 (Figura 25). En cuanto a la expresión del resto marcadores involucrados en el estrés del RE, también disminuyó de manera dosis dependiente para algunos de ellos (Figuras 24 y 25, Tabla 14).

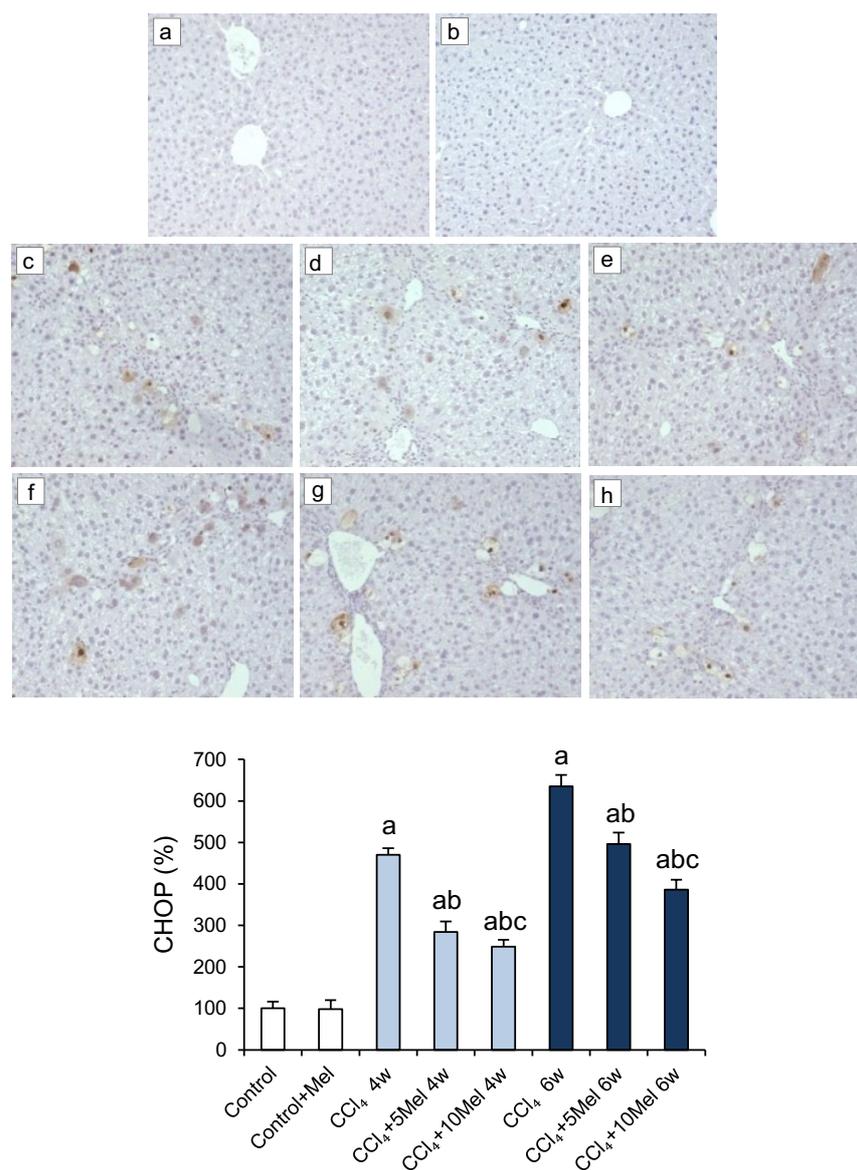


Figura 24. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de CHOP en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra la detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de CHOP en los diferentes grupos de estudio. a: Control, b: Control+Mel, c: CCl₄ 4w, d: CCl₄+5Mel 4w, e: CCl₄+10Mel 4w, f: CCl₄ 6w, g: CCl₄+5Mel 6w, h: CCl₄+10Mel 6w. El panel inferior muestra el análisis de las áreas positivas frente al Control. Valores medios ± EEM (n=7). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo período de estudio. ^cp <0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

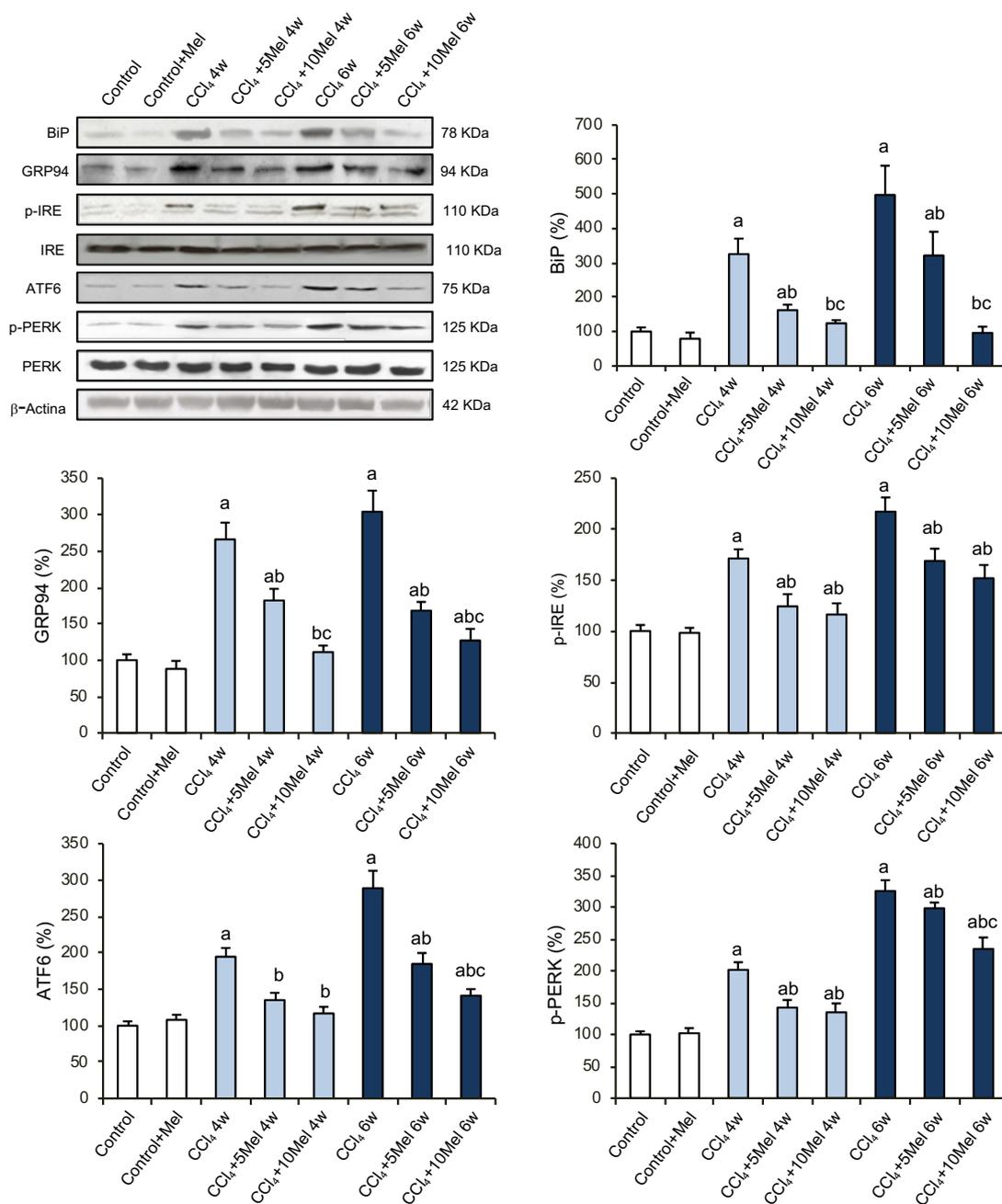


Figura 25. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de BiP, GRP94, p-IRE, ATF6 y p-PERK en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior izquierdo muestra los Western blot representativos de la expresión hepática de BiP, GRP94, p-IRE, ATF6 y p-PERK. La igualdad de carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -Actina. El resto de paneles representan el análisis densitométrico, expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp<0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

Tabla 14. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de PERK, ATF4, ATF6, IRE1 y XBP1s en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w).

	PERK	ATF4	ATF6	IRE1	XBP1s
Control	100 ± 7	100 ± 5	100 ± 3	100 ± 9	100 ± 11
Control+Mel	89 ± 6	105 ± 6	90 ± 9	109 ± 10	97 ± 8
CCl₄ 4w	321 ± 18 ^a	151 ± 3 ^a	180 ± 12 ^a	166 ± 4 ^a	252 ± 22 ^a
CCl₄+5Mel 4w	289 ± 24 ^a	139 ± 7 ^{ab}	114 ± 2 ^{ab}	131 ± 13 ^{ab}	173 ± 14 ^{ab}
CCl₄+10Mel 4w	239 ± 25 ^{ab}	94 ± 3 ^{bc}	88 ± 2 ^{bc}	106 ± 5 ^{bc}	135 ± 13 ^{abc}
CCl₄ 6w	230 ± 31 ^a	137 ± 10 ^a	145 ± 3 ^a	193 ± 4 ^a	250 ± 17 ^a
CCl₄+5Mel 6w	185 ± 16 ^{ab}	100 ± 4 ^b	101 ± 3 ^b	154 ± 8 ^{ab}	196 ± 11 ^{ab}
CCl₄+10Mel 6w	104 ± 8 ^{bc}	95 ± 6 ^b	97 ± 3 ^b	149 ± 3 ^{ab}	151 ± 8 ^{abc}

Expresión analizada mediante ensayos de RT-PCR, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -Actina. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp<0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

5.4 Efecto del tratamiento con melatonina sobre la vía SphK1/S1P en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄ y en HSCs humanas de la línea LX2

5.4.1 Efecto del tratamiento con melatonina sobre la vía SphK1/S1P en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄

La vía de los esfingolípidos juega un papel fundamental en la regulación del proceso fibrogénico. Con el objetivo de comprobar si la administración de CCl₄ estaba asociada con el aumento en las expresiones de las principales proteínas involucradas en dicha vía, se realizó un análisis de los marcadores centrales de la vía SphK1/S1P en el modelo animal de fibrosis hepática. Los resultados mostraron un aumento en los niveles de S1P, proteína central de la vía, en los ratones a los que se les administró CCl₄, tanto a las 4 como a las 6 semanas, cuantificados mediante la técnica ELISA (Figura 26).

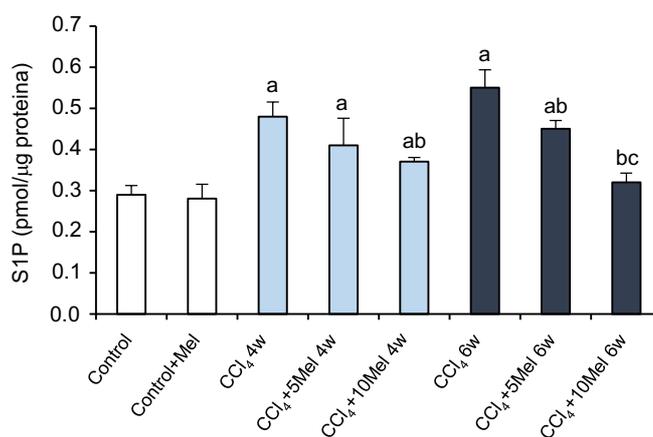


Figura 26. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre los niveles hepáticos de S1P en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). Niveles de S1P en homogeneizados hepáticos analizados mediante ELISA. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo período de estudio. ^cp <0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

En condiciones normales el S1P no se acumula en los tejidos; sin embargo, la exposición frente a agentes dañinos puede provocar su acúmulo mediante el aumento de su síntesis y la disminución de su degradación. Paralelamente, se obtuvo un incremento en la expresión inmunohistoquímica, proteica y de los niveles de ARNm de la principal proteína que induce su síntesis, la SphK1 (Figuras 27 y 28, Tabla 15).

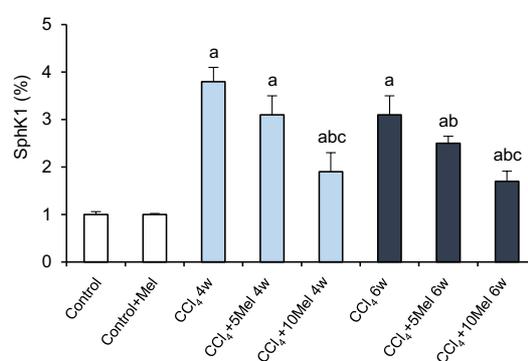
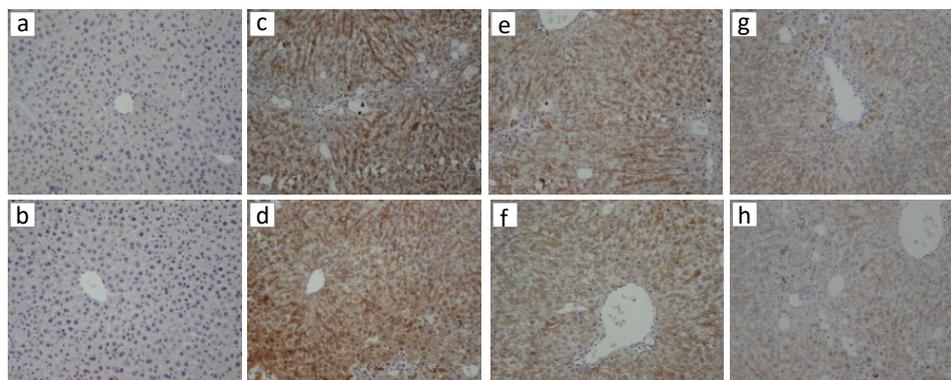


Figura 27. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de SphK1 en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra la detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de SphK1 en los diferentes grupos de estudio. a: Control, b: Control+Mel, c: CCl₄ 4w, d: CCl₄+5Mel 4w, e: CCl₄+10Mel 4w, f: CCl₄ 6w, g: CCl₄+5Mel 6w, h: CCl₄+10Mel 6w. El panel inferior muestra el análisis de las áreas positivas frente al Control. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo período de estudio. ^cp <0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

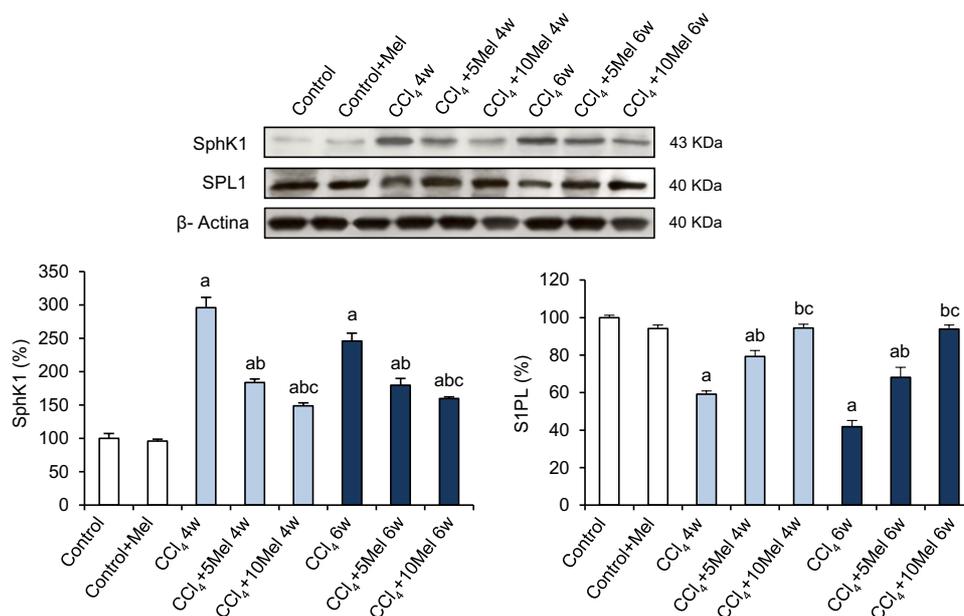


Figura 28. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de SphK1 y S1PL en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra los Western blots representativos de la expresión hepática de SphK1 y S1PL. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -Actina. El resto de paneles muestran el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap < 0,05 con respecto al grupo Control. ^bp < 0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp < 0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

Por el contrario, la expresión proteica y los niveles de ARNm de la S1PL, proteína que induce la degradación de S1P, se vieron reducidos en los ratones con fibrosis hepática. Todos estos efectos fueron regulados significativamente con el tratamiento con melatonina en ambos periodos (Figuras 26-28, Tabla 15). Debido a la estrecha relación existente entre la vía del S1P y la ceramida, se realizó un análisis de los niveles de ARNm de la esfingomielinasa ácida (ASMasa), observando un aumento significativo provocado por la administración de CCl₄ que se redujo con la administración de melatonina a ambas dosis (Tabla 15).

Tabla 15. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de SphK1, S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PL y ASMasa en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w).

	SphK1	S1PR1	S1PR2	S1PR3	S1PL	ASMasa
Control	100 ± 6	100 ± 12	100 ± 9	100 ± 11	100 ± 6	100 ± 6
Control + Mel	131 ± 11	114 ± 9	82 ± 10	118 ± 7	92 ± 13	123 ± 3
CCl₄ 4w	2728 ± 556 ^a	386 ± 38 ^a	13 ± 5 ^a	352 ± 22 ^a	30 ± 2 ^a	225 ± 14 ^a
CCl₄ + 5Mel 4w	1499 ± 54 ^{ab}	164 ± 40 ^b	44 ± 1 ^{ab}	155 ± 4 ^{ab}	63 ± 3 ^{ab}	122 ± 12 ^b
CCl₄ + 10Mel 4w	1051 ± 24 ^{abc}	96 ± 14 ^{bc}	92 ± 6 ^{abc}	145 ± 7 ^{ab}	83 ± 5 ^{bc}	77 ± 15 ^{bc}
CCl₄ 6w	2000 ± 192 ^a	283 ± 15 ^a	6 ± 2 ^a	219 ± 31 ^a	23 ± 3 ^a	133 ± 23
CCl₄ + 5Mel 6w	1526 ± 24 ^{ab}	206 ± 58 ^{ab}	51 ± 3 ^{ab}	115 ± 2 ^b	48 ± 3 ^{ab}	112 ± 8
CCl₄ + 10Mel 6w	1147 ± 31 ^{abc}	125 ± 20 ^{bc}	66 ± 8 ^{abc}	139 ± 7 ^{ab}	63 ± 3 ^{ab}	80 ± 4

Expresión analizada mediante ensayos de RT-PCR, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -Actina. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp<0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

El efecto que ejerce el S1P se desencadena con su unión a receptores específicos induciendo así la respuesta celular. En el desarrollo del proceso fibrogénico los principales receptores involucrados son el S1PR1, S1PR2 y S1PR3. Para estudiar los efectos que provocaba la melatonina sobre la unión del S1P a dichos receptores se realizó un análisis inmunohistoquímico de la expresión de los receptores 1 y 3, junto con un análisis mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de los tres receptores del S1P. Los resultados mostraron un aumento de los niveles de S1PR1 y S1PR3 mientras que S1PR2 presentaba unos valores inferiores a los grupos Control, en los ratones expuestos al tóxico. Estos cambios fueron regulados con la administración de melatonina tanto a las 4 como a las 6 semanas (Tabla 15). La expresión inmunohistoquímica de S1PR1 y S1PR3 confirmó la reducción significativa de la expresión a través de la administración del indol a ambas dosis (Figuras 29 y 30).

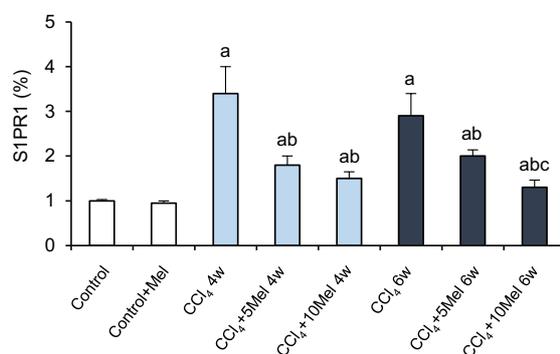
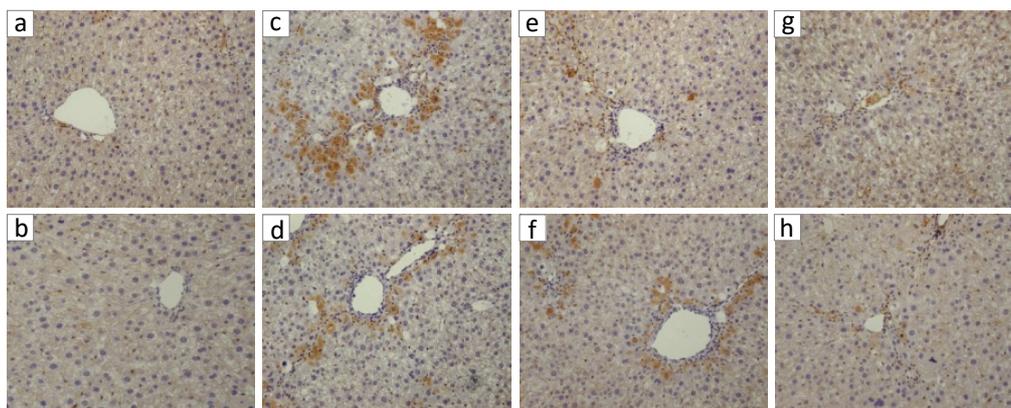


Figura 29. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de S1PR1 en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra las detecciones inmunohistoquímicas de la expresión hepática de SP1R1 en los diferentes grupos de estudio. a: Control, b: Control+Mel, c: CCl₄ 4w, d: CCl₄+5Mel 4w, e: CCl₄+10Mel 4w, f: CCl₄ 6w, g: CCl₄+5Mel 6w, h: CCl₄+10Mel 6w. El panel inferior muestra el análisis de las áreas positivas frente al Control. Valores medios ± EEM (n=7). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo período de estudio. ^cp <0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

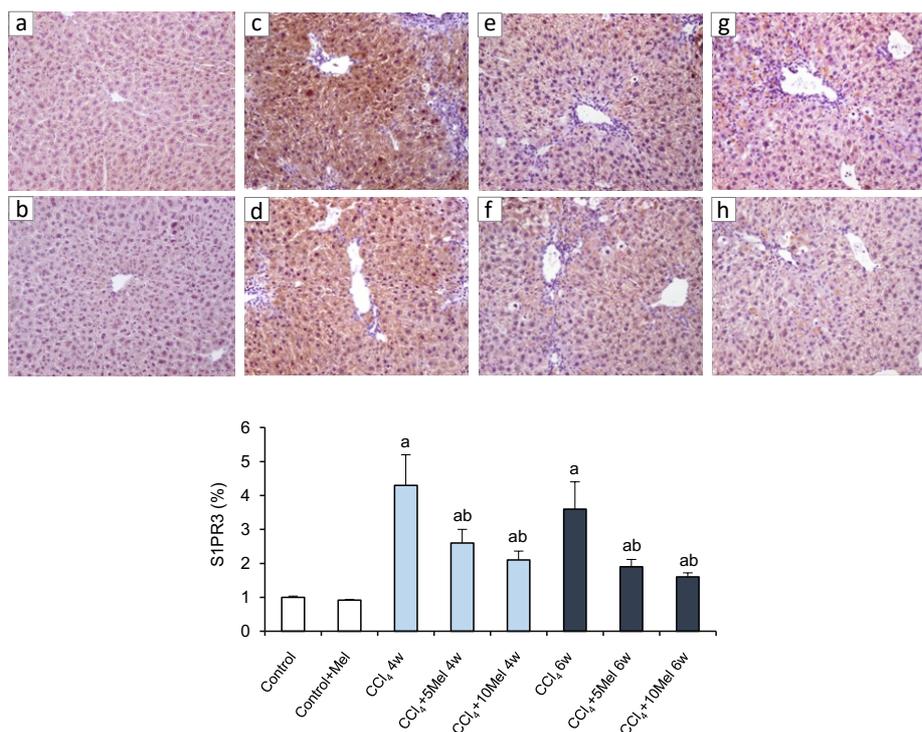


Figura 30. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de S1PR3 en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra las detecciones inmunohistoquímicas de la expresión hepática de SP1R3 en los diferentes grupos de estudio. a: Control, b: Control+Mel, c: CCl₄ 4w, d: CCl₄+5Mel 4w, e: CCl₄+10Mel 4w, f: CCl₄ 6w, g: CCl₄+5Mel 6w, h: CCl₄+10Mel 6w. El panel inferior muestra el análisis de las áreas positivas frente al Control. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo período de estudio. ^cp <0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

5.4.2 Efecto del tratamiento con melatonina sobre la vía SphK1/S1P en HSCs humanas de la línea LX2

El efecto protector de la melatonina a través de su acción sobre la vía SphK1/S1P mostrado en los resultados del modelo animal, fue además confirmado en HSCs humanas activadas. Para ello se realizó un análisis de los niveles de ARNm de la SphK1, los receptores del S1P, la S1PL y la ASMas. Los datos obtenidos fueron similares al modelo animal, encontrándose un aumento significativo de SphK1, S1PR1, S1PR3 y ASMas en las LX2 activadas con TFG- β , junto con una disminución en los niveles de S1PR2 y S1PL. La administración de melatonina a ambas dosis (100 y 500 μ M) indujo una

disminución en la expresión de SphK1, S1PR1, S1PR3 y ASMas, y un aumento de los niveles de S1PR2 y S1PL, reforzando su papel antifibrótico (Tabla 16).

Tabla 16. Efecto del tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de SphK1, S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PL y ASMas en las células LX2.

	SphK1	S1PR1	S1PR2	S1PR3	S1PL	ASMas
Control	100 ± 7	100 ± 6	100 ± 4	100 ± 6	100 ± 8	100 ± 6
Control + Mel	126 ± 8	84 ± 10	90 ± 6	91 ± 6	84 ± 7	89 ± 5
TGF-β	505 ± 35 ^a	224 ± 3 ^a	25 ± 7 ^a	257 ± 7 ^a	30 ± 10 ^a	210 ± 13 ^a
TGF-β + 100Mel	400 ± 24 ^{ab}	152 ± 6 ^{ab}	46 ± 5 ^{ab}	183 ± 9 ^{ab}	53 ± 6 ^{ab}	162 ± 14 ^{ab}
TGF-β + 500Mel	305 ± 22 ^{abc}	130 ± 4 ^{abc}	86 ± 5 ^{abc}	143 ± 3 ^{abc}	78 ± 9 ^{bc}	83 ± 2 ^{abc}

Expresión analizada mediante ensayos de RT-PCR, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β-Actina. Valores medios ± EEM (n=6). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo TGF-β. ^cp <0,05 con respecto al grupo 100Mel.

Debido al efecto inhibitorio que induce la melatonina sobre esta vía, se trató de evaluar el efecto que tendría un inhibidor específico de una de las proteínas centrales, la SphK1, en el desarrollo de la fibrosis. Para ello se utilizó el compuesto PF543, en las células LX2, en combinación con el tratamiento con melatonina. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con PF543 disminuía un 77% la expresión de SphK1 junto con una disminución significativa de los valores de expresión de los marcadores de fibrosis, α-SMA y Col I (Figura 31). La administración combinada del inhibidor junto con la melatonina, no mostró ningún efecto adicional con ninguna de las dosis estudiadas.

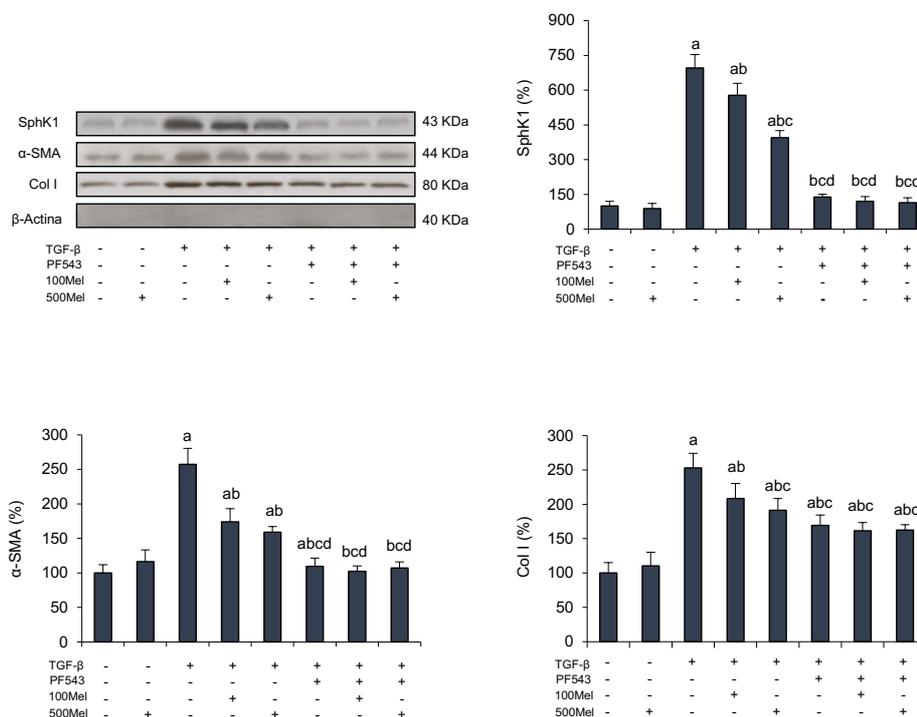


Figura 31. Efecto del tratamiento con PF543 y melatonina sobre la concentración de proteína de SphK1, α -SMA y Col I en las células LX2. El panel superior izquierdo muestra los Western blot representativos de la expresión de SphK1, α -SMA y Col I. La igualdad de carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -Actina. El resto de paneles representan el análisis densitométrico, expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto al grupo TGF- β . ^cp<0,05 con respecto al grupo 100Mel. ^dp<0,05 con respecto al grupo 500Mel.

5.5 Efecto del tratamiento con melatonina sobre la vía de los genes *Clock* en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄ y en HSCs humanas de la línea LX2

5.5.1 Efecto del tratamiento con melatonina sobre la vía de los genes *Clock* en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄

Debido al importante papel que juegan los ritmos circadianos en la regulación de numerosos procesos patológicos, se determinó el estado de la vía de señalización de los genes *Clock* en el modelo animal de fibrosis hepática mediante el análisis de la expresión

y los niveles de ARNm de los principales componentes de la misma en los diferentes grupos animales. Dos de las proteínas centrales de la vía son BMAL1 y CLOCK, las cuales se unen formando un heterodímero activando así la transcripción de los genes PERs y CRYs (Rutter *et al.*, 2002). La administración del agente tóxico provocó una disminución en la expresión de BMAL1 y CLOCK, al igual que de PER1, PER2, PER3, CRY1 y CRY2, tanto a las 4 como a las 6 semanas de la administración. Sin embargo, el tratamiento con melatonina logró restablecer estos valores aumentando la expresión de las proteínas involucradas en la ruta hasta niveles similares a los controles en algunos genes estudiados (Figura 32). Además, se evaluó la expresión proteica de CLOCK mediante inmunohistoquímica, mostrando una baja expresión en los animales con fibrosis hepática inducida que, sin embargo, aumentó con el tratamiento con melatonina de manera dosis dependiente (Figura 33).

De igual modo, se examinó el eje de retroalimentación negativa formado por las proteínas REV-ERB α y ROR α . REV-ERB α inhibe la transcripción de BMAL1, mientras que ROR α la activa, manteniendo así sus niveles constantes (Preitner *et al.*, 2002). También se comprobó mediante Western blot e inmunohistoquímica, que la expresión proteica de REV-ERB α aumentó en los animales a los que se les administró CCl₄ y que el tratamiento con melatonina redujo los niveles tanto a las 4 como a las 6 semanas de la inducción del daño (Figuras 34 y Figura 35). Por el contrario, la expresión proteica de ROR α aumentó de manera significativa tras la administración del agente químico, disminuyendo con el tratamiento con el indol (Figura 34), al igual que la de BMAL1, CLOCK, PERs y CRYs. Los resultados evaluados mediante RT-PCR fueron similares a los obtenidos mediante las dos técnicas anteriormente mencionadas, tal y como se muestra en la Tabla 17.

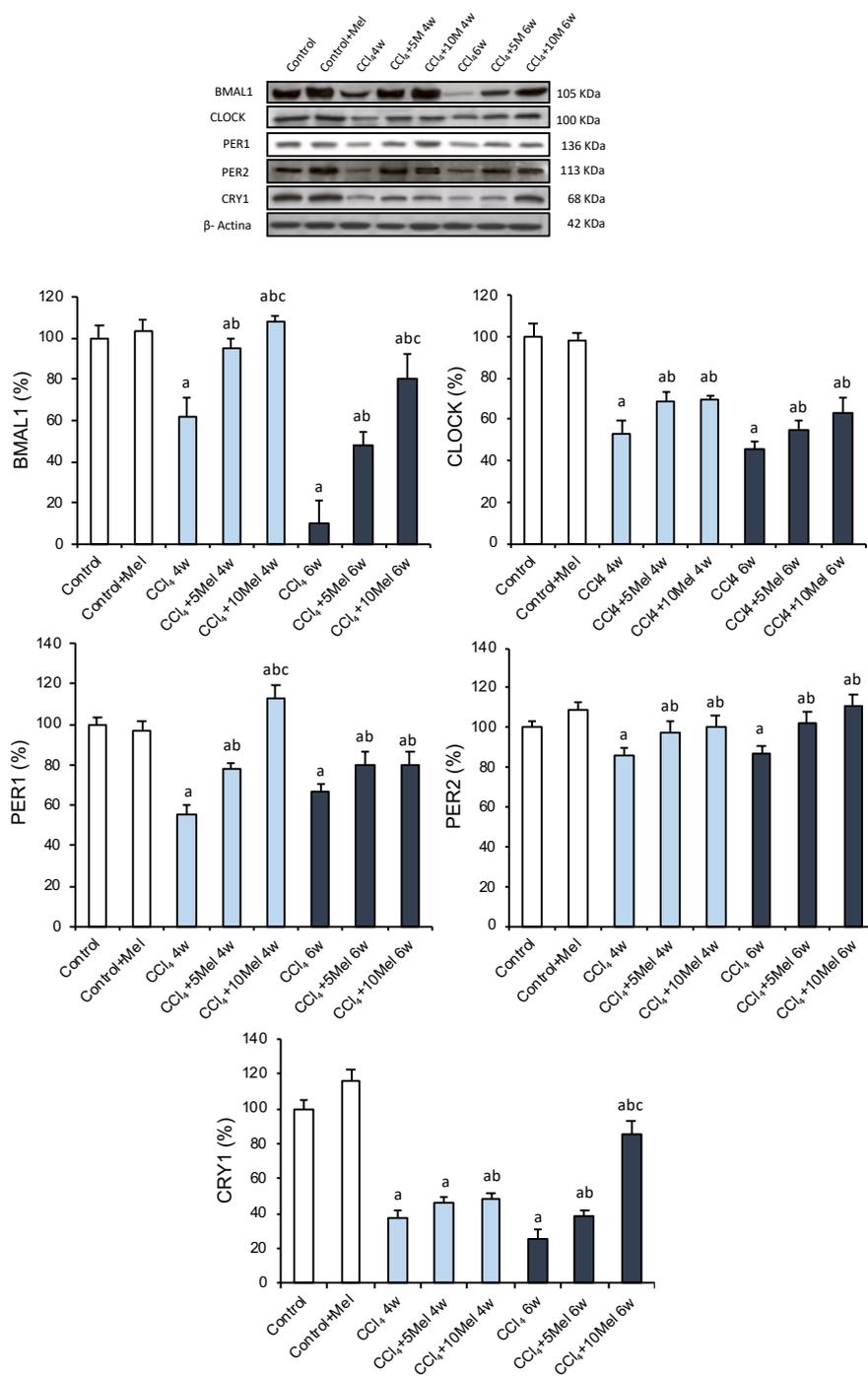


Figura 32. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de BMAL1, CLOCK, PER1, PER2 y CRY1 en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra los Western blots representativos de la expresión hepática de BMAL1, CLOCK, PER1, PER2 y CRY1. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -Actina. El resto de paneles muestran el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap < 0,05 con respecto al grupo Control. ^bp < 0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo periodo de estudio. ^cp < 0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

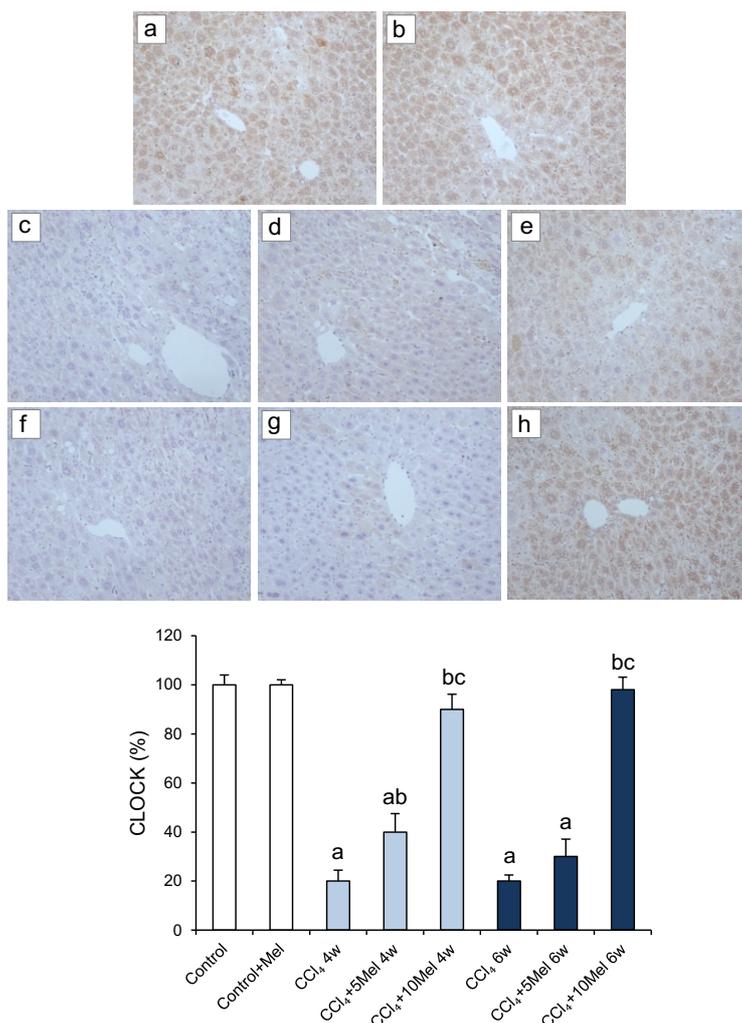


Figura 33. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de CLOCK en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra la detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de CLOCK en los diferentes grupos de estudio. a: Control, b: Control+Mel, c: CCl₄ 4w, d: CCl₄+5Mel 4w, e: CCl₄+10Mel 4w, f: CCl₄ 6w, g: CCl₄+5Mel 6w, h: CCl₄+10Mel 6w. El panel inferior muestra el análisis de las áreas positivas frente al Control. Valores medios ± EEM (n=7). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo período de estudio. ^cp <0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

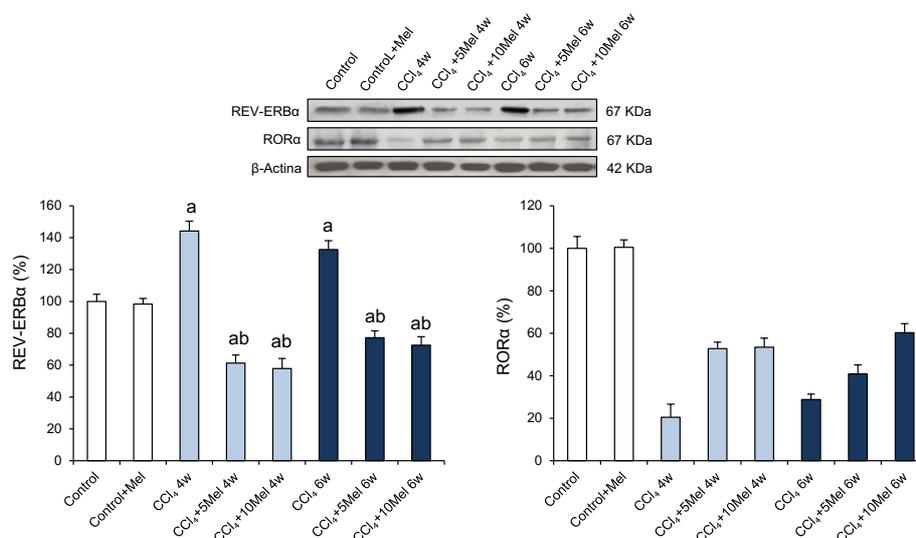


Figura 34. Efecto del CCl_4 y el tratamiento con melatonina sobre la concentración de proteína de REV-ERB α y ROR α en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra los Western blots representativos de la expresión hepática de REV-ERB α y ROR α . La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β -Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo CCl_4 , en el mismo periodo de estudio. ^cp <0,05 con respecto al grupo CCl_4 +5Mel, en el mismo periodo de estudio.

Tabla 17. Efecto del CCl_4 y el tratamiento con melatonina sobre los niveles de ARNm de BMAL1, CLOCK, PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2, REV-ERB α y ROR α en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w).

	BMAL1	CLOCK	PER1	PER2	PER3	CRY1	CRY2	REV-ERB α	ROR α
Control	100 \pm 15	100 \pm 16	100 \pm 4	100 \pm 12	100 \pm 8	100 \pm 13	100 \pm 4	100 \pm 13	100 \pm 14
Control + Mel	115 \pm 13	95 \pm 14	112 \pm 10	94 \pm 11	108 \pm 11	104 \pm 5	107 \pm 5	90 \pm 6	109 \pm 16
CCl_4 4w	61 \pm 12 ^a	37 \pm 5 ^a	82 \pm 15 ^a	41 \pm 5 ^a	71 \pm 7 ^a	61 \pm 4 ^a	87 \pm 9 ^a	122 \pm 7 ^a	68 \pm 8 ^a
CCl_4 + 5Mel 4w	83 \pm 8 ^{ab}	44 \pm 11 ^{ab}	90 \pm 6 ^a	65 \pm 7 ^{ab}	78 \pm 6 ^{ab}	64 \pm 6 ^{ab}	103 \pm 7 ^b	111 \pm 9 ^{ab}	77 \pm 7 ^a
CCl_4 + 10Mel 4w	97 \pm 22 ^{abc}	57 \pm 9 ^{ab}	99 \pm 8 ^{bc}	69 \pm 5 ^{ab}	82 \pm 11 ^{ab}	71 \pm 9 ^{ab}	109 \pm 8 ^b	92 \pm 10 ^{bc}	84 \pm 5 ^{abc}
CCl_4 6w	58 \pm 6 ^a	28 \pm 10 ^a	76 \pm 7 ^a	50 \pm 6 ^a	59 \pm 12 ^a	48 \pm 6 ^a	72 \pm 11 ^a	129 \pm 12 ^a	61 \pm 9 ^a
CCl_4 + 5Mel 6w	63 \pm 5 ^{ab}	34 \pm 9 ^{ab}	84 \pm 5 ^{ab}	68 \pm 7 ^{ab}	74 \pm 6 ^{ab}	60 \pm 4 ^{ab}	84 \pm 12 ^{ab}	62 \pm 13 ^{ab}	70 \pm 9 ^{ab}
CCl_4 + 10Mel 6w	101 \pm 17 ^{bc}	53 \pm 12 ^{ab}	89 \pm 6 ^{ab}	81 \pm 9 ^{bc}	79 \pm 8 ^{ab}	82 \pm 9 ^{abc}	90 \pm 6 ^{ab}	64 \pm 5 ^{ab}	82 \pm 11 ^{abc}

Expresión analizada mediante ensayos de RT-PCR, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -Actina. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo CCl_4 , en el mismo periodo de estudio. ^cp <0,05 con respecto al grupo CCl_4 +5Mel, en el mismo periodo de estudio.

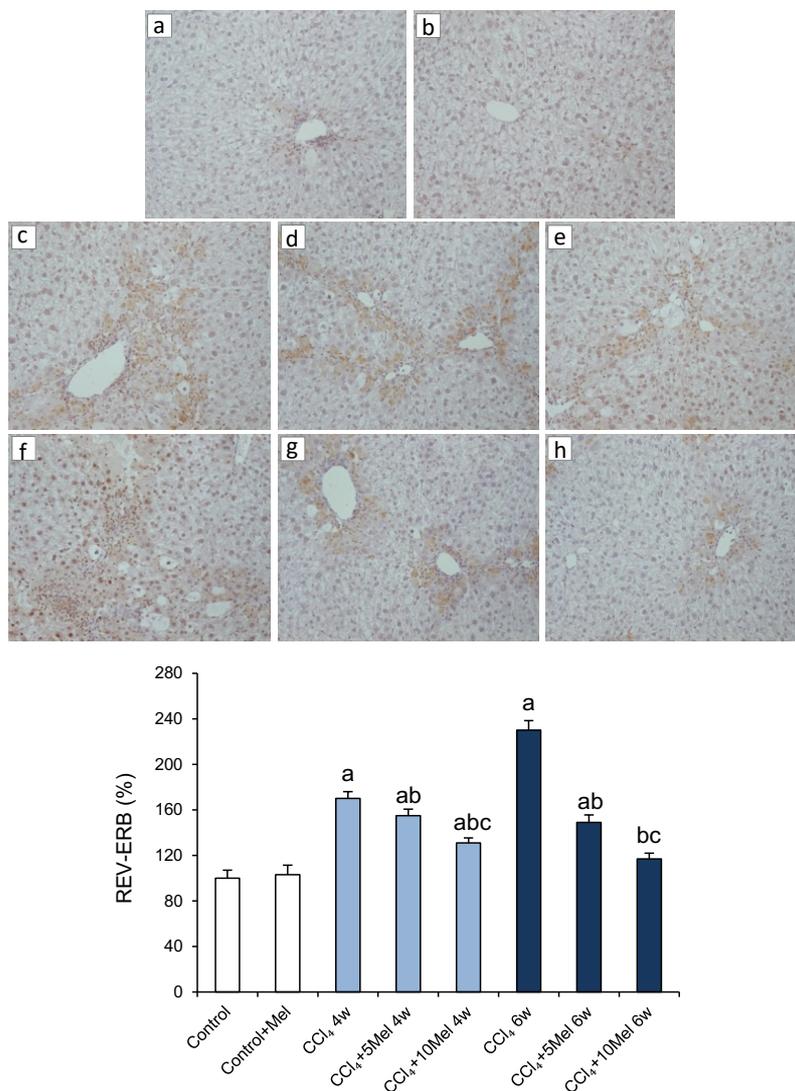


Figura 35. Efecto del CCl₄ y el tratamiento con melatonina sobre la inmunohistoquímica hepática de REV-ERB α en los diferentes grupos de estudio, tanto a las 4 como a las 6 semanas (w). El panel superior muestra la detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de REV-ERB α en los diferentes grupos de estudio. a: Control, b: Control+Mel, c: CCl₄ 4w, d: CCl₄+5Mel 4w, e: CCl₄+10Mel 4w, f: CCl₄ 6w, g: CCl₄+5Mel 6w, h: CCl₄+10Mel 6w. El panel inferior muestra el análisis de las áreas positivas frente al Control. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap <0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo CCl₄, en el mismo período de estudio. ^cp <0,05 con respecto al grupo CCl₄+5Mel, en el mismo periodo de estudio.

5.5.2 Efecto del tratamiento con melatonina sobre la vía de los genes *Clock* en HSCs humanas de la línea LX2

Con objeto de valorar si los efectos protectores de la melatonina sobre las alteraciones causadas por el CCl₄ en el modelo animal, se producían de manera similar en las células estrelladas humanas de la línea LX2, se analizó, en primer lugar, la expresión de las principales proteínas involucradas en la vía de los genes *Clock*. Los resultados mostraron un incremento en la expresión de BMAL1, CLOCK, PER2, CRY1 y ROR α , junto con una disminución de REV-ERB α , tras el tratamiento con melatonina a ambas dosis (100 y 500 μ M) (Figura 36).

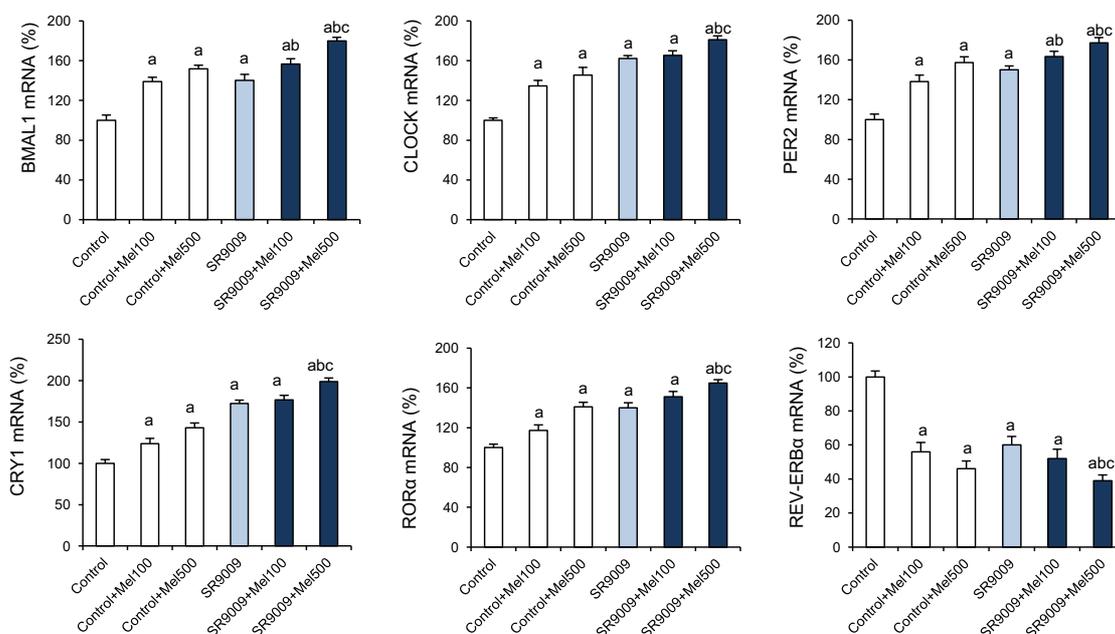


Figura 36. Efecto del tratamiento con SR9009 y melatonina sobre los niveles de ARNm de BMAL1, CLOCK, PER2, CRY1, ROR α y REV-ERB α en células LX2. Expresión analizada mediante ensayos de RT-PCR, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -Actina. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp <0,05 con respecto al grupo TGF- β . ^cp <0,05 con respecto al grupo 100Mel. ^dp <0,05 con respecto al grupo 500Mel.

Estudios previos han demostrado que la activación de REV-ERB induce un efecto antifibrogénico tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Li *et al.*, 2014; Thomes *et al.*, 2016), y que, por lo tanto, REV-ERB podría ser una proteína diana importante en la prevención y progresión de la fibrogénesis (Solt *et al.*, 2012). Por ello se utilizó un ligando específico que induce la expresión de REV-ERB, SR9009, administrado de manera individual y conjuntamente con la melatonina, con el objetivo de evaluar su efecto en la vía de los genes *Clock*. Como se observa en la Figura 36, SR9009, induce un incremento de la expresión de BMAL1, CLOCK, PER2, CRY1 y ROR α , junto con una disminución en la de REV-ERB α , similar a lo indicado en el caso de la administración de melatonina. El tratamiento combinado de SR9009 con la melatonina indujo un mayor efecto a ambas dosis. Estos resultados se confirmaron con el análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de BMAL1 en células LX2, mostrando un incremento en los niveles de la proteína con la administración del indol que se potenció con el tratamiento con el ligando SR9009 (Figura 37).

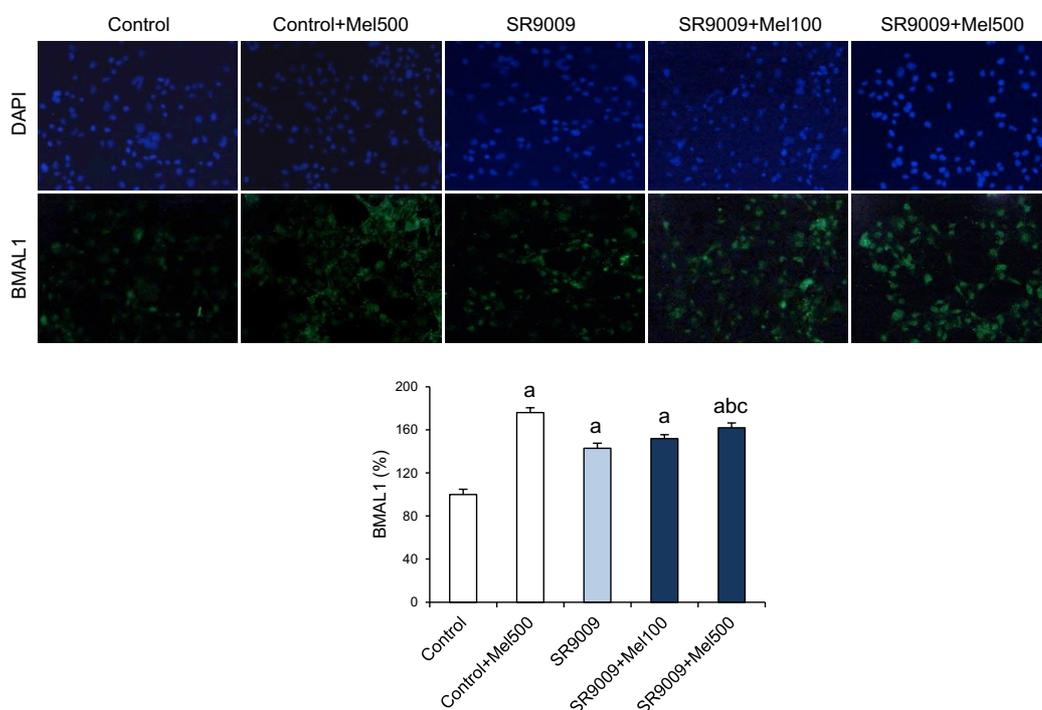


Figura 37. Efecto del tratamiento con SR9009 y melatonina sobre la expresión mediante inmunofluorescencia de BMAL1 en células LX2. El marcaje de los núcleos se realizó con DAPI (azul). Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto al grupo TGF- β . ^cp<0,05 con respecto al grupo 100Mel. ^dp<0,05 con respecto al grupo 500Mel.

Con el objetivo de determinar si el restablecimiento de los niveles de los genes *Clock* estaba asociado con la progresión de la fibrosis, se evaluaron los principales marcadores de fibrosis en el modelo *in vivo*. Con ello se pudo comprobar que, el tratamiento combinado de SR9009 junto con la melatonina, provocaba una reducción de los niveles de ARNm de α -SMA y Col I (Figura 38), junto con una menor expresión de α -SMA como se puede observar en el análisis realizado mediante inmunofluorescencia (Figura 39). Al igual que se constató en el modelo animal, los niveles de PPAR α aumentaron de forma significativa en las células tratadas con el ligando y el indol, incrementando así su efecto antifibrótico (Figura 38). Por lo tanto, la combinación de SR9009, ligando específico de REV-ERB, con melatonina, mejora su efecto antifibrótico en las células estrelladas humanas LX2.

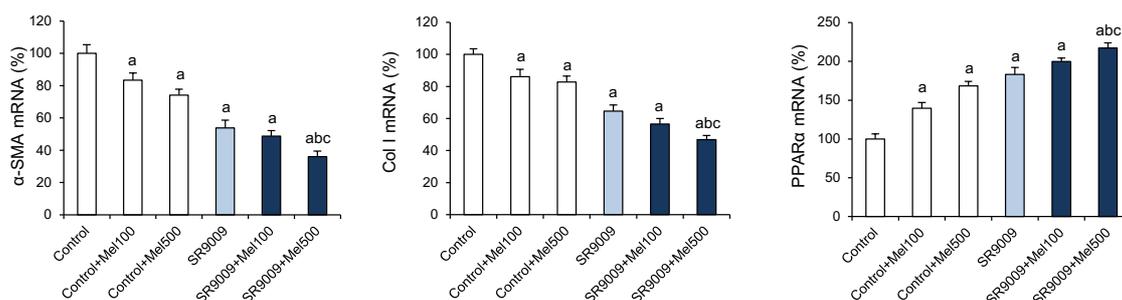


Figura 38. Efecto del tratamiento con SR9009 y melatonina sobre los niveles de ARNm de α -SMA, Col I y PPAR α en células LX2. Expresión analizada mediante ensayos de RT-PCR, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos se normalizaron con β -Actina. Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto al grupo TGF- β . ^cp<0,05 con respecto al grupo 100Mel. ^dp<0,05 con respecto al grupo 500Mel.

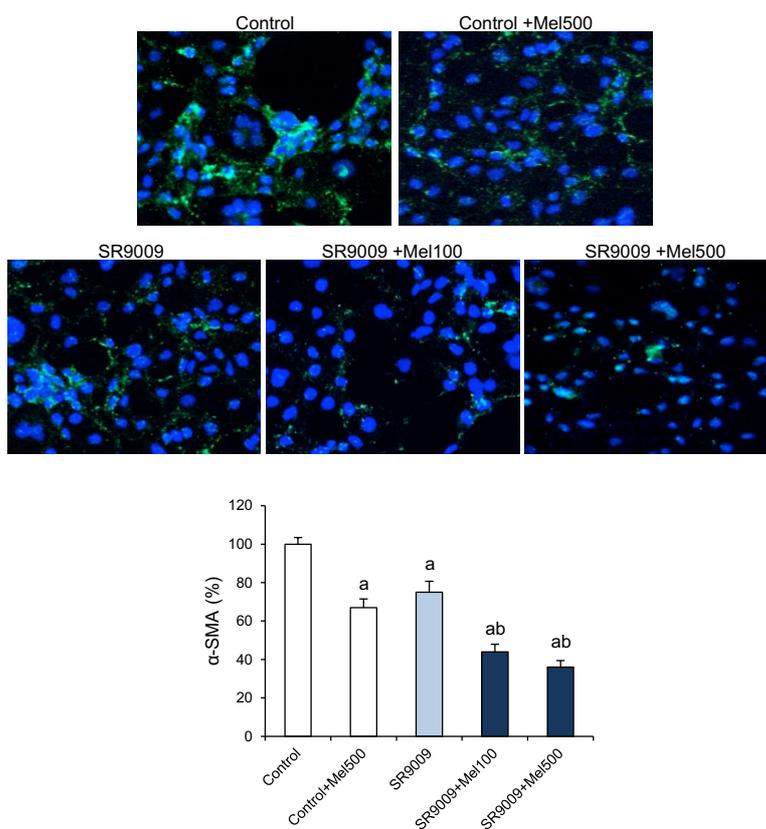


Figura 39. Efecto del tratamiento con SR9009 y melatonina sobre la expresión mediante inmunofluorescencia de α -SMA en LX2. El marcaje de los núcleos ha sido realizado con DAPI (azul). Valores medios \pm EEM (n=7). ^ap<0,05 con respecto al grupo Control. ^bp<0,05 con respecto al grupo TGF- β . ^cp<0,05 con respecto al grupo 100Mel. ^dp<0,05 con respecto al grupo 500Mel.

DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

La fibrosis hepática es una de las lesiones más características de la hepatopatía crónica y presenta una alta morbilidad y mortalidad. En los últimos años se ha generado un gran interés por la posibilidad de obtener regresión de esta patología, teniendo en cuenta los resultados logrados con tratamientos como el de la hepatitis producida por el VHC (Bernuth *et al.*, 2016; Jung y Yim, 2017).

Sin embargo, en la mayoría de los casos, las terapias para las enfermedades crónicas son ineficaces (Ebrahimi *et al.*, 2018), y debido a su gravedad, el trasplante de hígado se ha considerado como la única terapia efectiva para muchos pacientes cuando están en etapas avanzadas de la enfermedad. Numerosos estudios han demostrado que sustancias antioxidantes como la quercetina, la N-acetilcisteína o la melatonina, entre otras, juegan un papel hepatoprotector tanto en modelos animales como en modelos celulares.

Así, estudios realizados en los últimos años por nuestro grupo demuestran que la melatonina juega un papel protector contra el estrés oxidativo (Crespo *et al.*, 2010), inhibe el estrés del RE (Tuñón *et al.*, 2013) y modula la respuesta autofágica y la apoptosis (San-Miguel *et al.*, 2010; 2014), tanto en enfermedades hepáticas agudas como crónicas. Sin embargo, la información existente sobre los posibles efectos beneficiosos de la melatonina en el tratamiento de la fibrosis es muy limitada.

6.1 Efecto de la melatonina sobre el daño hepático en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄

Aunque los efectos beneficiosos de la melatonina en el hígado con fibrosis inducida por CCl₄ y otras toxinas han sido descritos por otros autores (Noyan *et al.*, 2006; Ogeturk *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009; Ebaid *et al.*, 2013), en este estudio se ha demostrado que en ratones con fibrosis hepática inducida por inyección de CCl₄, la melatonina inhibe significativamente la activación de las HSCs y reduce la expresión las principales proteínas involucradas en el desarrollo de la fibrogénesis, así como una

regulación a la baja de la vía de señalización del TGF- β , uno de los principales mediadores profibrogénicos.

En este modelo animal, tras la administración de CCl₄, los ratones desarrollaron un daño hepático demostrado a través de pruebas histológicas donde se observaba un aumento en el número y tamaño de los septos fibróticos junto con unos niveles séricos elevados de ALT y AST. Este incremento en la formación de los septos de colágeno y en los niveles de enzimas hepáticas fueron aminorados en los animales tratados con melatonina (5 y 10 mg/Kg de peso corporal), lo que coincide con resultados previos sobre el efecto del indol en el modelo animal de fibrosis hepática inducida por CCl₄ (Ohta *et al.*, 2004; Kus *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005a; Noyan *et al.*, 2006; Ogeturk *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009; Ebaid *et al.*, 2013). La activación de las HSCs es un proceso determinante en la instauración y desarrollo de la fibrogénesis, lo que resulta en la síntesis de α -SMA y el depósito excesivo de colágeno (Yoshida y Marsuzaki, 2012; Das *et al.*, 2017). El aumento de la expresión de α -SMA en los hígados de los ratones tratados con CCl₄ se redujo significativamente con la administración de melatonina, tal y como indican los resultados obtenidos en los estudios inmunohistoquímicos. Además, los resultados histológicos y el análisis de la RT-PCR revelaron una expresión disminuida de Col I en los grupos tratados con el indol. Resultados similares se obtuvieron con el pretratamiento con melatonina en un modelo animal de fibrosis hepática inducida por CCl₄ y en células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (Mortezaee *et al.*, 2016). Los datos obtenidos indican que la melatonina induce acciones antifibrogénicas relacionadas, en parte, con una menor activación de las HSCs durante el desarrollo del proceso fibrogénico (Nalobin *et al.*, 2016). Una acción antifibrogénica similar, con disminuciones en la formación de colágeno en el hígado y en la expresión de α -SMA, se ha descrito previamente en ratas con lesión hepática inducida por CCl₄ que recibieron epigallocatequina-3-galato (Tipoe *et al.*, 2010), después de la administración de proantocianidinas a ratas con daño hepático inducido por DMN (Shin *et al.*, 2010), tras el tratamiento con melatonina a ratas con lesión hepática inducida por TAA (Lebda *et al.*, 2018) y en un modelo murino de esteatosis inducida por CCl₄ al que se le administraba melatonina y quercetina de manera conjunta (Esrefoglu *et al.*, 2017).

El papel de las citoquinas profibrogénicas es también fundamental para el desarrollo de la fibrosis que, de hecho, presenta una progresión muy dependiente de la producción de TGF- β , que es la citoquina principal en la fibrogénesis hepática y una de las principales dianas en el desarrollo de agentes antifibróticos (Friedman, 2010). Se ha indicado que la expresión de TGF- β disminuye en modelos animales de fibrosis tratados con curcumina (Yao *et al.*, 2012), epigallocatequina-3-galato, (Tipoe *et al.*, 2010) o polifenoles (Yu *et al.*, 2012). En nuestro estudio, la melatonina también disminuye la expresión de TGF- β en ratones con fibrosis inducida por CCl₄, un hecho que sin duda contribuye al efecto protector que ejerce el indol sobre la activación de las HSCs. Además, la melatonina evitó la regulación negativa de PPAR α inducida por el CCl₄. Los PPARs hepáticos desempeñan un papel relevante en la fibrosis hepática, y la disminución de su expresión induce en gran medida la producción de colágeno en las HSCs (Zardi *et al.*, 2013). Además, se ha indicado en estudios previos que la expresión de PPAR α disminuye en modelos de NASH con fibrosis avanzada, y que su aumento está asociado con su recuperación (Francque *et al.*, 2015; Ratziu *et al.*, 2016).

6.2 Efecto de la melatonina sobre la vía de la autofagia en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄

En estudios previos de nuestro grupo se ha comprobado que el tratamiento con el indol, comenzando 2 semanas después de la inyección del tóxico, reduce significativamente los marcadores profibrogénicos de la vía de señalización de TGF- β y reduce la acumulación de MEC (Crespo *et al.*, 2015). Los datos obtenidos en la presente investigación confirman, mediante la inmunohistoquímica de α -SMA, que la melatonina induce una disminución significativa en la activación de las HSCs en el hígado a las 4 y 6 semanas de la administración de CCl₄, como se ha comentado anteriormente.

El paso crítico en la generación de fibrosis hepática es la activación de las HSCs que da como resultado la deposición de MEC y, de hecho, los conocimientos sobre los mecanismos que regulan la activación de las HSCs se consideran objetivos clave para el tratamiento de la fibrosis hepática (Mallat *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014b). Para que se

produzca la activación de las HSCs se requiere de una adecuada actividad autofágica; de hecho, investigaciones recientes sugieren que el flujo autofágico aumenta durante la activación e indican que el tratamiento con inhibidores de la autofagia inhibe parcialmente la activación de las HSCs (Thoen *et al.*, 2011; Hernández-Gea *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018). La autofagia aparentemente proporciona la energía que es esencial para inducir la activación de las HSCs a través de la movilización de proteínas LDL, la liberación de ácidos grasos libres y la β -oxidación mitocondrial (Hernández-Gea *et al.*, 2012). Los resultados de MET obtenidos en el presente estudio mostraron que el número y el contenido de vesículas de autofagia aumentaban en los ratones tratados con CCl_4 . Además, se analizó el efecto de la administración de CCl_4 sobre las principales proteínas que regulan diferentes vías moleculares que conducen a la formación de vesículas de autofagia, incluida su iniciación (Beclina-1), y la maduración mediante los sistemas de conjugación Atg12 y LC3. Los datos obtenidos demuestran una expresión aumentada de los componentes del complejo Atg16, junto con un aumento de la expresión inmunohistoquímica de LC3 y la conversión de LC3-I citosólica soluble en su forma lipidada asociada a autofagosomas, LC3-II. La RT-PCR confirmó que el gen clave del proceso de la autofagia, la Beclina-1, también se mostraba aumentado. Los cambios en la expresión de p62 y LAMP-2 apoyan la activación de la ruta autofágica-lisosómica y el aumento en el flujo autofágico. Se ha indicado que existe una activación paralela de las HSCs, con una mayor expresión de α -SMA, y una inducción de la vía de la autofagia, en un modelo animal de ratas con fibrosis inducida por CCl_4 (He *et al.*, 2014). Además, el bloqueo del flujo autofágico mediante la interacción de TLR2 y la proteína HMGB1, reduce la expresión de marcadores fibróticos en fibroblastos cardiacos (Wu *et al.*, 2018). En nuestro modelo, cuando los ratones tratados con CCl_4 recibieron melatonina, también se inhibió la autofagia, como se constata por la disminución en el número de vacuolas autofágicas, la restauración de la expresión de p62 y los cambios en la expresión de las proteínas Beclina-1, LC3-II y Atg16. Estudios previos han comprobado que la inhibición de la autofagia puede contribuir a mejorar el daño hepatocelular en modelos animales de isquemia/reperfusión hepática (Kang *et al.*, 2014) o daño hepático agudo (San-Miguel *et al.*, 2014). De hecho, los efectos protectores mediante la inhibición

de la autofagia, se han demostrado en el tratamiento con 3-metiladenina en HSCs humanas, en cultivos primarios de fibroblastos de pulmón humano y en ratones con deficiencia de Atg7 después de la inducción con CCl₄ (Hernández-Gea *et al.*, 2012). Además, otros tratamientos como el retinol han logrado revertir la activación de las HSCs humanas, LX2, a través de la inhibición de la autofagia (Hong *et al.*, 2018). Por lo tanto, los resultados obtenidos indican un nuevo potencial terapéutico de la melatonina como antifibrótico a través de la modulación de la autofagia, similar a lo concluido en otros modelos de hepatotoxicidad (Li *et al.*, 2018).

La proteína mTOR es una importante molécula de señalización que actúa como un regulador negativo de la autofagia (Dunlop y Tee, 2014). Cuando se evaluó la expresión de fosfo-mTOR mediante Western blot, se observó una expresión incrementada en ratones tratados con CCl₄, demostrando que el tóxico estimula la ruta de señalización de mTOR paralelamente al desarrollo del proceso autofágico. Nuestros datos sugieren que mTOR no es un regulador negativo de la autofagia, como ya se indicó en estudios anteriores de daño hepático inducido por el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV), lo que podría deberse a que la inducción de la autofagia se produzca antes de la señalización de mTOR o a que ambos procesos actúen al mismo tiempo. Varios estudios han comprobado que la señalización de mTOR es crucial en la activación de las HSCs y juega un papel clave en la deposición de la MEC (Patsenker *et al.*, 2001). Los inhibidores de mTOR, tales como sirolimus y everolimus, pueden disminuir significativamente la fibrosis, induciendo una regulación a la baja de genes pro-fibrogénicos y un fuerte aumento en la actividad de degradación de la MEC (Biecker *et al.*, 2005; Pigué *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la paeoniflorina, un glicósido monoterpénico, reduce la expresión del ARNm de α -SMA y Col III en ratas fibróticas inducidas por CCl₄, mediante la reducción en la fosforilación de mTOR (Zhao *et al.*, 2014), de forma similar a lo que ocurre con la curcumina, compuesto polifenólico que deteriora la expresión de mTOR en HSCs activadas (Zhang *et al.*, 2014). Por lo tanto, la inhibición de la vía de mTOR, aunque no esté relacionada con los cambios en la autofagia, podría contribuir a los efectos antifibróticos de la melatonina.

6.3 Efecto de la melatonina sobre el estrés del retículo endoplasmático en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄

Otra de las vías que juega un papel crucial en el desarrollo de la fibrogénesis es el estrés del RE, y además tiene una estrecha relación con el flujo autofágico. Esto se debe a que la autofagia también se puede inducir en respuesta al estrés del RE a través de la inducción de la UPR (Ding *et al.*, 2007). En las células de mamíferos, se sabe que las proteínas involucradas en la UPR controlan las vías de transducción de señales que conducen a la transcripción de genes autofágicos (Huang *et al.*, 2011), y que la eliminación del regulador de la UPR, BiP, inhibe la formación del autofagosoma, lo que sugiere que la inducción del estrés del RE es un factor crucial para la autofagia (Li *et al.*, 2008). En estudios previos, en un modelo animal de insuficiencia hepática fulminante inducida por la infección con el RHDV, se ha demostrado que los niveles de ARNm de las chaperonas CHOP, BiP y GRP94 alcanzan un pico elevado en paralelo al aumento de la expresión de Beclina-1 y los componentes de los dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina Atg12-Atg5-Atg16, y LC3 (Vallejo *et al.*, 2014). La UPR tiene tres efectores principales: PERK, ATF6 e IRE1. La autofosforilación de PERK fosforila el factor eIF2 α y permite la traducción de genes específicos de respuesta al estrés del RE, como es el caso del ATF4. En segundo lugar, ATF6 se activa mediante escisión proteolítica después de la translocación al aparato de Golgi. Finalmente, la autofosforilación de IRE1 promueve el corte y empalme del ARNm de XBP1 a su forma corta XBP1s. Los resultados obtenidos en esta investigación indican que la intoxicación por CCl₄ provocó aumentos significativos en la expresión de PERK, ATF6, ATF4, IRE1 y XBP1s, lo que concuerda con investigaciones previas en las que se encontró una activación de las diferentes ramas de la UPR durante la fibrogénesis (Zhao *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2014). Los estudios en HSCs sugieren que el estrés oxidativo perturba la homeostasis del RE y activa la UPR, desencadenando la autofagia e induciendo la respuesta fibrogénica (Hernández-Gea *et al.*, 2013). Cuando los ratones con fibrosis se trataron con melatonina, se inhibió la expresión de las chaperonas de estrés del RE, CHOP, BiP y GRP94, y se redujeron significativamente los efectos sobre las diferentes ramas de señalización de la UPR. Nuestros resultados son similares a los obtenidos previamente en ratones con fibrosis

inducida por bleomicina, en los que la melatonina inhibe el estrés del RE y reduce la expresión de α -SMA (Zhao *et al.*, 2012). Los resultados del estudio sugieren que el bloqueo de la autofagia, descrito anteriormente, podría ser provocado, al menos en parte, a través del estrés del RE. Esta hipótesis está respaldada por la regulación a la baja de Beclina-1 que provoca la melatonina, y cuya expresión es necesaria para el desarrollo de la autofagia inducida por estrés del RE (Li *et al.*, 2008). Además, recientemente se ha demostrado esta estrecha relación entre el estrés del RE y la autofagia en fibroblastos cardiacos, donde el estrés del RE regula la expresión de fibronectina a través de la activación del flujo autofágico (Rongjie *et al.*, 2018). En células de mamífero, el descenso en la actividad del regulador BiP inhibe la formación de autofagosomas inducida por el estrés del RE y la escasez de nutrientes, pero no afecta a la conversión de LC3-I a su forma LC3-II, sugiriendo que BiP es un factor esencial para la autofagia que interviene en la expansión del fagóforo. Al ser un proceso artificial basado, principalmente, en la disminución de la actividad de BiP, que espontáneamente activa la UPR e induce la conversión de LC3, es difícil diferenciar entre la verdadera implicación de BiP y de la UPR en la inducción de la autofagia (Li *et al.*, 2008; He y Klionsky, 2009). Otro indicio de que la autofagia está relacionada con el estrés del RE es que para que se produzca la conversión de LC3 y la degradación de proteínas mutantes en el RE, se requiere la fosforilación de eIF2 α por parte de PERK (Kouroku *et al.*, 2007). Las vías de PERK e IRE-1 son capaces de inducir la expresión de los diferentes genes autofágicos y de promover la supervivencia celular (Talloczy *et al.*, 2002; Ogata *et al.*, 2006; Kouroku *et al.*, 2007; B'chir *et al.*, 2013). Una liberación de calcio desde el RE también activa la autofagia mediante la estimulación de diferentes vías, como la de la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK), o mediante la inhibición de mTOR (Zalckvar *et al.*, 2009; Madaro *et al.*, 2013; Shiloh *et al.*, 2014).

En resumen, los resultados del presente estudio amplían nuestra comprensión de los efectos antifibrogénicos de la melatonina e indican que la indolamina induce una disminución de la autofagia asociada con la intoxicación por CCl₄ en ratones y también suprime el estrés del RE durante la lesión hepática inducida por CCl₄. Comprender los mecanismos que hay detrás de la interacción de la autofagia con el estrés del RE y la

fibrogénesis ayudará a un mejor conocimiento de la patogénesis de la fibrosis e identificará las vías moleculares que explican el efecto protector de la melatonina. Aunque es necesario tener precaución, teniendo en cuenta que la autofagia puede ser protectora en células hepáticas diferentes de las HSCs (Song *et al.*, 2014b), nuestros hallazgos pueden proporcionar una justificación para la evaluación de la melatonina en terapias de fibrosis hepática.

6.4 Efecto de la melatonina sobre la vía SphK1/S1P en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄

Recientemente, se ha descrito la S1P como un regulador fundamental de enfermedades relacionadas con la fibrosis y la relevancia que tiene la vía de señalización SphK1/S1P en diferentes modelos animales de fibrosis hepática, muestras fibróticas humanas y HSCs (Huang *et al.*, 2014; Takuwa *et al.*, 2014). Estudios previos también han demostrado que la melatonina puede desempeñar un papel regulador en la patogénesis fibrótica y tener efectos protectores contra la fibrosis en diversos órganos y tejidos, incluido el hígado (Hu *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos, en el modelo murino de fibrogénesis hepática inducida por CCl₄ y en la línea celular humana LX2, sugieren que la inhibición del eje SphK1/S1P puede estar implicado en el efecto antifibrótico de la melatonina.

Como se mencionó anteriormente, cuando el tratamiento con melatonina a ratones se inicia después de 2 semanas de la administración de CCl₄, con el objetivo de permitir la activación inicial de las HSCs, se consigue inhibir la expresión de los principales genes profibrogénicos, al igual que habían indicado estudios previos (Hu *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado el efecto antifibrótico de la melatonina en células humanas de la línea LX2 activadas por TGF- β . Aunque existen estudios que sugirieren que estas células están completamente transdiferenciadas a miofibroblastos con baja sensibilidad hacia TGF- β (Dooley *et al.*, 2001), en nuestro estudio encontramos una respuesta significativa para TGF- β al igual que señalan otras investigaciones más recientes en los primeros pasos de activación de las células (Pathil *et al.*, 2014). El

tratamiento con melatonina logró disminuir la fibrogénesis de las células LX2 activadas, lo que fue confirmado por una reducción en la expresión de α -SMA, TGF- β y Col I, de forma similar a los resultados de otros autores cuando las células LX2 se tratan con ursodesoxicolil lisofosfatidiletanolamida (Pathil *et al.*, 2014) o el bloqueador de energía 3-bromopiruvato (Karthikeyan *et al.*, 2016). Los efectos antifibróticos de la melatonina están asociados tanto *in vivo* como *in vitro* a la inhibición dependiente de la dosis del eje SphK1/S1P, con niveles de S1P reducidos y una regulación a la baja de la expresión de SphK1. Nuestros resultados coinciden con estudios anteriores que muestran que, después de la administración de inhibidores de SphK1, la intensidad de la inmunotinción de α -SMA y la expresión de citoquinas profibrogénicas disminuyen significativamente en ratones con fibrosis hepática inducida por BDL y por CCl₄ (Yang *et al.*, 2013).

El desarrollo de inhibidores de la vía de señalización de S1P y los enfoques dirigidos a las enzimas involucradas en la vía de los esfingolípidos, es un área novedosa en la búsqueda de fármacos antifibróticos eficientes (Dyckman, 2017; Park e Im, 2017). Uno de los más destacables es el PF543, un potente y específico inhibidor de la SphK1. Esta molécula es muy útil para identificar las funciones específicas de la señalización de S1P a través de la SphK1 (Schnute *et al.*, 2012).

Para apoyar la hipótesis de que la regulación negativa del sistema SphK1/S1P no está simplemente asociada con la acción antifibrogénica del fármaco, sino que existe una relación causa efecto real entre los dos procesos, se probaron los efectos del inhibidor de SphK1, PF543 (Santos y Lynch, 2015), en células LX2 en presencia y ausencia de tratamiento con melatonina. Los datos obtenidos apoyan la importancia que tiene el SphK1 como molécula diana para el desarrollo de terapias contra la fibrosis hepática. S1P ejerce sus funciones uniéndose a una familia de cinco receptores acoplados a proteínas G (S1PR1-5). S1PR1, S1PR2 y S1PR3 son expresados en una amplia variedad de tejidos, mientras que la expresión de S1PR4 se limita al tejido linfoide y hematopoyético y la expresión de S1PR5 al sistema nervioso central (Sánchez y Hla, 2004). Al unirse a sus receptores, S1P modula muchos procesos fisiológicos o patológicos, y existe una clara evidencia que apoya el papel crítico de los receptores de S1P en la mediación de su acción profibrótica en diversos tipos celulares (Schwalm *et al.*, 2013). Aunque S1P es

crucial en la fibrosis hepática, diferentes estudios sugieren que su modo de acción puede variar en diversas especies en función del papel que juegan los S1PRs. En muestras fibróticas humanas se han observado unos niveles elevados de S1PR1 y S1PR3, mientras que, la expresión de S1PR2 se encuentra reducida en gran medida (Liu *et al.*, 2011). Sin embargo, en el hígado fibrótico de ratones, tras 6 semanas de administración de CCl₄, el tratamiento logró aumentar la expresión de S1PR3, pero no de S1PR1 y S1PR2 (Li *et al.*, 2009). También existe un estudio que demuestra que los ratones *knockout* para S1PR2, a los que se les induce fibrosis hepática mediante CCl₄ y DMN, muestran una reducción en la expresión de los marcadores fibróticos en comparación con los animales control (Ikeda *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestra investigación indica que, tanto en el hígado de ratones fibróticos como en las células LX2 activadas con TGF- β , la expresión de S1PR1 y S1PR3 aumenta, mientras que la expresión de S1PR2 se reduce. Además, estos cambios en la expresión de los receptores de S1P fueron contrarrestados por el tratamiento con melatonina. Estos datos respaldan los hallazgos previos de que el bloqueo de S1PR1/3 con la administración de VCPC23019 atenúa la progresión de la fibrosis hepática y la angiogénesis en modelos murinos de fibrosis hepática (Yang *et al.*, 2013). Además, se sabe que, contrariamente a los efectos estimulantes de S1PR1 y S1PR3, S1PR2 inhibe la migración celular en la mayoría de los tipos celulares (Kong *et al.*, 2014). De hecho, se ha demostrado que la actividad fibrogénica se induce por el aumento en los niveles de S1P en células LX2, como ocurre con la administración de moléculas como el SEW2871, un agonista del S1PR1. De manera similar ejerce su acción el pretratamiento con el inhibidor del S1PR2, JTE-013, o el silenciamiento de S1PR2, lo que indica un papel negativo del receptor, aumentando los valores fibrogénicos (Liu *et al.*, 2011). Sin embargo, el silenciamiento de S1PR3 por ARNi, y la acción del antagonista del S1PR1, W146, provocan el efecto contrario disminuyendo la actividad fibrogénica (Liu *et al.*, 2011). En cualquier caso, aunque es posible que las diferentes líneas celulares respondan de manera diferente a S1P, y la contribución exacta de los receptores de S1P en la fibrosis hepática no está completamente demostrada, nuestra evidencia actual sugiere que en los ratones tratados con CCl₄, S1PR1 y S1PR3 son necesarios para el

progreso de la actividad profibrogénica inducida por S1P, mientras que, S1PR2 actúa de manera inversa.

La expresión de la S1PL también parece desempeñar un papel clave en el desarrollo de la fibrogénesis y se sabe que, en los fibroblastos de pulmón, TGF- β aumenta la expresión de S1PL y que este efecto se elimina mediante el tratamiento de las células con el anticuerpo anti-TGF- β (Huang *et al.*, 2014). Recientemente se ha demostrado que, si bien la deficiencia de SphK1 protege a los ratones frente a la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, la deficiencia de S1PL agrava la fibrogénesis, lo que sugiere que S1PL es un nuevo supresor endógeno de la fibrosis pulmonar (Huang *et al.*, 2015; Huang y Natarajan, 2015). Sin embargo, se ha observado un aumento de los niveles de S1P en las biopsias hepáticas humanas y el suero de los pacientes con fibrosis, que se produce como resultado del aumento de la actividad SphK ya que la expresión del ARNm de S1PL se mantuvo sin cambios (Liu *et al.*, 2011). Nuestros datos indican que, tanto en ratones tratados con CCl₄ como en células LX2, la expresión de S1PL se redujo significativamente, y que este efecto fue restablecido por la melatonina de manera dosis dependiente. Los hallazgos apoyan la importancia de la regulación de los niveles de S1P a través del equilibrio entre SphK1 y S1PL, lo que podría convertirse en una vía clave que promueva o detenga el desarrollo de la fibrogénesis.

Diferentes estudios muestran que la SphK1 es un mediador de la señalización de TGF- β . Por lo tanto, se sabe que la disminución de la expresión de SphK1 por ARNi bloquea la regulación positiva mediada por TGF- β de TIMP-1, una proteína que desempeña un papel importante en el modelado y la degradación de la MEC (Yamanaka *et al.*, 2004). En estudios anteriores se ha demostrado que en los ratones tratados con melatonina hay una menor expresión de TIMP-1 (Crespo *et al.*, 2015), lo que podría ser consecuencia de la inhibición en el eje SphK1/S1P y explicar, al menos en parte, la inhibición de los efectos mitogénicos provocado por el TGF- β . Sin embargo, también es posible que S1P actúe a través de mecanismos indirectos como las vías inflamatorias y oxidativas. En ratas alimentadas con alto contenido de fructosa y en células de hígado de rata BRL3A estimuladas con fructosa, parece que el eje SphK1/S1P desempeña un papel hepatoprotector a través de su activación por NF- κ B y citoquinas inflamatorias

(Wang *et al.*, 2013b). Sin embargo, aunque la curcumina, agente antioxidante, mejora la fibrosis asociada a nefropatía al inhibir la vía SphK1/S1P, en células mesangiales glomerulares transfectadas con SphK^{WT}, este antioxidante previene la sobreexpresión de SphK1 de una manera dependiente de la concentración, lo que sugiere un efecto independiente de su capacidad antioxidante (Huang *et al.*, 2013).

La ceramida también se ha propuesto como un potencial regulador de la fibrosis hepática y podría decirse que la S1P actúa a través de mecanismos indirectos con un efecto antifibrótico al desregular el reostato ceramida/S1P (Schwalm *et al.*, 2013). Las ceramidas se pueden generar a través de la hidrólisis de la ASMasa (Ordoñez *et al.*, 2015), y se ha demostrado que la inhibición de la actividad ASMasa reduce los niveles de ceramida hepática y atenúa la fibrosis hepática en un modelo de rata de la enfermedad de Wilson (Lang *et al.*, 2007). Además, también se ha comprobado que los ratones haploinsuficientes para ASMasa están protegidos contra el desarrollo de fibrosis hepática en modelos de esta enfermedad inducidos por colestasis y CCl₄ (Moles *et al.*, 2010). Los datos obtenidos en este estudio indican que, en ratones con administración crónica de CCl₄ y en células LX2, la expresión de ASMasa se reduce significativamente por la acción de la melatonina, lo que proporciona una visión adicional del posible papel de los cambios en las rutas de esfingolípidos en el efecto antifibrótico del indol.

6.5 Efecto de la melatonina sobre la vía de los genes *Clock* en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl₄

El reloj circadiano regula una variedad de procesos fisiológicos y patológicos en el hígado y existen numerosos estudios que indican su importancia para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades hepáticas (Zhou *et al.*, 2016). En este estudio se trató de investigar si el restablecimiento de la desregulación de los relojes circadianos podría contribuir a los efectos beneficiosos de la melatonina sobre la fibrogénesis hepática *in vivo* e *in vitro*.

Para ello se estudiaron marcadores antifibrogénicos como PPAR α , que es uno de los genes que puede verse afectado por el sistema circadiano (Chen y Yang, 2014; Zhang

et al., 2018). Se ha demostrado que la melatonina regula su actividad transcripcional mediante la modulación de la ruta del reloj circadiano en varias líneas celulares de cáncer humano (Hill *et al.*, 2011). Como se mencionó anteriormente, la inducción de la fibrosis por CCl₄ provocó una regulación a la baja de la expresión de PPAR α , que logró ser restablecida por el tratamiento con melatonina. Por lo tanto, nuestros datos no solo confirman el efecto antifibrótico de la melatonina, sino que también sugieren que restablece las alteraciones que se producen en los genes que están bajo el control de los ritmos circadianos.

Para investigar si la regulación de la vía de los genes *Clock*, a través del tratamiento con melatonina, contribuye a la mejora de la progresión de la fibrosis, se analizó la expresión de los principales genes involucrados en la vía. A nivel molecular, BMAL1, CLOCK, PERs y CRYs se consideran las proteínas centrales del reloj circadiano que interactúan entre sí para regular la transcripción de los genes diana circadianos (Dibner *et al.*, 2010). Nuestros resultados indican que las expresiones de CLOCK, BMAL1, PER1, PER2, PER3, CRY1 y CRY2 fueron significativamente menores en los ratones que recibieron CCl₄. Investigaciones anteriores habían señalado que BMAL1, CLOCK y CRY2, junto con dos importantes genes regulados por el reloj circadiano como son PPAR α y Cyp450, presentaban unos niveles de ARNm disminuidos significativamente en los ratones fibróticos (Chen *et al.*, 2010b). También se sabe que PER2 juega un papel protector contra la lesión inducida por CCl₄ (Chen *et al.*, 2009), y que la deficiencia de PER2 predispone a la fibrosis hepática a través de la activación de las HSCs y de la inhibición de la apoptosis de las HSCs (Chen *et al.*, 2010a). Nuestros resultados confirman que el efecto antifibrótico de la melatonina se produce a través del incremento en la expresión de CLOCK, BMAL1, PERs y CRYs, restableciendo así los valores a niveles similares a los controles.

REV-ERB α , funciona como un represor negativo clave del reloj circadiano, y se encuentra sobreexpresado en HSCs activadas e hígados fibróticos independientemente de la etiología (Zhou *et al.*, 2016). Se ha demostrando una correlación positiva entre la activación fibrogénica y la expresión de REV-ERB α en HSCs (Li *et al.*, 2014). El incremento en los niveles de ARNm, la concentración proteica y la inmunotinción hepática de REV-

ERB aumentaron significativamente en ratones tratados con CCl₄. Por el contrario, la melatonina logró reducir estos niveles. La competencia directa entre REV-ERB y ROR α , un inductor transcripcional de BMAL1, proporciona un mecanismo universal para el autocontrol del reloj molecular en todos los tejidos (Zhang *et al.*, 2015). Se ha confirmado que compuestos como el selenio y la melatonina muestran papeles protectores a través de la modulación de la actividad transcripcional de BMAL1 (Hill *et al.*, 2011). En nuestro estudio, los niveles de ARNm y la expresión proteica de ROR α mostraron una fuerte disminución en los hígados dañados, y la administración de melatonina evitó este efecto, coincidiendo con la regulación positiva de los genes BMAL1, CLOCK, PERs y CRYs. De manera global, nuestros hallazgos sugieren que la administración crónica de CCl₄ altera el perfil de las expresiones de los genes *Clock* y que la melatonina logra atenuar la desregulación de la maquinaria circadiana.

Además, se investigó si la restauración del reloj circadiano inducida por la melatonina en el modelo de fibrosis inducida por CCl₄ también se producía en las HSCs humanas. Los resultados obtenidos indican que la melatonina indujo un aumento dependiente de la dosis en la expresión de BMAL1, CLOCK, PER2, CRY1 y ROR α y una disminución de REV-ERB α en las células LX2. Como se ha demostrado previamente, la expresión de los marcadores fibróticos es elevada en HSCs humanas activadas, mientras que en las células incubadas con melatonina se observa una expresión significativamente reducida (Shajari *et al.*, 2015). En la presente investigación, la restauración de los niveles del reloj circadiano se asoció con una reducción de los niveles de ARNm de α -SMA y Col I y una reducción en la expresión por inmunofluorescencia de α -SMA. Además, el tratamiento con melatonina indujo un aumento en la expresión de PPAR α , que apoya la interrelación entre este factor de transcripción y los relojes circadianos en la fibrosis.

Los relojes circadianos representan objetivos relevantes para la optimización de esquemas terapéuticos que tengan como objetivo la inhibición de algunos de los genes clave que se sobreexpresan en el daño hepático (Thomes *et al.*, 2016). Uno de estos genes es REV-ERB, cuya expresión citoplasmática representa una respuesta

profibrogénica intrínseca caracterizada por el aumento de los principales marcadores fibrogénicos en HSC activadas (Li *et al.*, 2014).

Estudios previos han confirmado que el ligando sintético de REV-ERB, SR9009, disminuye el fenotipo fibrogénico de las HSCs y la severidad de la fibrosis hepática inducida por CCl₄ *in vivo* (Li *et al.*, 2014), y que este fármaco induce una actividad antifibrótica al bloquear la proliferación de las HSCs *in vitro* (Thomes *et al.*, 2016). Además, se ha comprobado que el tratamiento con SR9009 previene la fosforilación de P70S6K inducida por CCl₄, pero no influye en los cambios inducidos en AMPK, las proteínas Atf o p62. SR9009 atenúa la activación de las HSCs a través de la inhibición de P70S6K, que forma parte de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR/P70S6K, que promueve la fibrogénesis (Gabele *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2013). Por lo tanto, los estudios que profundizan en el papel de REV-ERB como proteína diana pueden ser de importancia clínica para prevenir la progresión de la fibrosis (Solt *et al.*, 2012). Por ello, se evaluó la capacidad de SR9009, solo o coadministrado con melatonina, para modular la maquinaria del reloj circadiano en las células LX2. Los resultados obtenidos indican que SR9009 indujo cambios en la expresión de los genes *Clock* similares a los inducidos por melatonina y que el tratamiento con ambas moléculas produjo un mayor efecto. Además, la combinación del ligando de REV-ERB con melatonina mejoró el efecto antifibrótico de SR9009, como lo demuestran los cambios detectados en los niveles de α -SMA y Col I.

Sería necesario realizar más investigaciones para identificar con mayor detalle los mecanismos responsables de la regulación de los genes del reloj por la melatonina en la fibrosis hepática. De hecho, las investigaciones sobre la relación entre la melatonina y los genes reloj en situaciones patológicas son muy escasas, pudiendo destacar los datos obtenidos en cáncer de mama, que demuestran que la melatonina reprime la actividad transcripcional de ROR α para suprimir la actividad del promotor BMAL1, mediante la activación de MT1 (Xiang *et al.*, 2012). La regulación de los cambios a través de los genes *Clock*, mediante fosforilación de proteínas centrales como CLOCK, que podría modificar la actividad de transactivación del heterodímero CLOCK-BMAL1 (Luciano *et al.*, 2018), también podría ser otra posibilidad interesante para ser explorada

en el futuro con el objetivo de desarrollar nuevas terapias efectivas para el tratamiento de la fibrosis hepática.

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

Primera conclusión

La administración crónica de tetracloruro de carbono en ratones induce daño hepático y fibrosis hepática, como se pone de manifiesto por las alteraciones que se producen en la expresión de los principales mediadores y vías de señalización implicadas en el desarrollo de la fibrogénesis. Por ello, junto con los estudios de mecanismos realizados en células estrelladas hepáticas humanas de la línea LX2, se consideran modelos experimentales muy adecuados para dilucidar y establecer los potenciales efectos antifibróticos de la melatonina.

Segunda conclusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la administración de melatonina reduce el daño hepático y las alteraciones en la expresión de los diferentes marcadores fibróticos en el modelo animal de fibrosis hepática inducido por tetracloruro de carbono y reduce la activación de las células hepáticas estrelladas humanas de la línea LX2.

Tercera conclusión

Los efectos beneficiosos de la melatonina en el modelo animal se relacionan con su capacidad de modular diferentes vías de señalización implicadas en el daño y progresión de la fibrosis hepática tales como la respuesta autofágica, el estrés de retículo endoplasmático y la vía de los esfingolípidos. De hecho, en células hepáticas estrelladas humanas de la línea LX2 constatamos que la inhibición de la vía de los esfingolípidos reduce la expresión de los principales marcadores de fibrosis.

Cuarta conclusión

La melatonina regula la alteración de los genes reloj implicados en el control de los ritmos circadianos de manera dependiente del tiempo y de la dosis, tanto en el modelo animal de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono, como en las células hepáticas estrelladas humanas, lo que podría contribuir a la reducción de la progresión y desarrollo de la fibrosis inducido por el indol.

Conclusión final

Los efectos de la melatonina sobre los genes reloj y sobre las diferentes vías de señalización implicadas en la fibrogénesis, tanto en el modelo *in vivo* de fibrosis hepática inducido por el tetracloruro de carbono, como en el modelo *in vitro* de células hepáticas estrelladas humanas de la línea LX2, demuestran el potencial interés de esta molécula en la terapia de la fibrosis hepática. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar la utilidad de esta molécula en la prevención y el tratamiento de pacientes con fibrosis hepática.

BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. Autophagy in mammalian cells. *World J Biol Chem* 2012; 3:1-6.

Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, et al. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* 2007; 27:53-66.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71:2997-3025.

Adada MM, Canals D, Jeong N, Kelkar AD, Hernandez-Corbacho M, Pulkoski-Gross MJ, et al. Intracellular sphingosine kinase 2- derived sphingosine-1-phosphate mediates epidermal growth factor-induced ezrin-radixin-moesin phosphorylation and cancer cell invasion. *FASEB J* 2015; 29:4654-4669.

Adams E, Spencer H, Rowe V, McCollister D, Irlandeses D. Toxicity of carbon tetrachloride vapor determined by experiments in laboratory animals. *Arch Indust Hyg Occup Med* 1952; 6:50-66.

Aghemo A, Colombo M. Cirrhosis regression in chronic hepatitis C: an old tale with a new ending. *Gastroenterology* 2009; 136:1447-1449.

Aimoto T, Rohde BH, Chiou GC, Lauber JK. N-acetyltransferase activity and melatonin level in the eyes of glaucomatous chickens. *J Ocul Pharmacol* 1985; 1:149-160.

Aizawa S, Contu VR, Fujiwara Y, Hase K, Kikuchi H, Kabuta C, et al. Lysosomal membrane protein SIDT2 mediates the direct uptake of DNA by lysosomes. *Autophagy* 2017; 13:218-222.

Al-Harbi NO, Imam F, Nadeem A, Al-Harbi MM, Iqbal M, Ahmad SF. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat is reversed by treatment with riboflavin. *Int Immunopharmacol* 2014; 21:383-388.

Al-Shabanah OA, Alam K, Nagi MN, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM. Protective effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Life Sci* 2000; 66:265-270.

Alam S, Kabir J, Mustafa G, Gupta U, Hasan SK, Alam AK. Effect of telmisartan on histological activity and fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis: A 1-year randomized control trial. *Saudi J Gastroenterol* 2016; 22:69-76.

Allen D, Seo J. ER stress activates the TOR pathway through Atf6. *J Mol Signal* 2018; 23:12-21.

Alvarez D, Golombek D, Lopez P, de las Heras M, Viola L, Sanchez S, et al. Diurnal fluctuations of portal and systemic hemodynamic parameters in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1994; 20:1198-1203.

Ananthasubramaniam B, Diernfellner A, Brunner M, Herzel H. Ultradian rhythms in the transcriptome of *Neurospora crassa*. *iScience* 2018; 9:475-486.

Antle MC, Silver R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci* 2005; 28:145-151.

Aoki M, Aoki H, Ramanathan R, Hait NC, Takabe K. Sphingosine-1-phosphate signaling in immune cells and inflammation: roles and therapeutic potential. *Mediators Inflamm* 2016; 2016:8606878.

Arish M, Alaidarous M, Ali R, Akhter Y, Rub A. Implication of sphingosine-1-phosphate signaling in diseases: molecular mechanism and therapeutic strategies. *J Recept Signal Transduct Res* 2017; 37:437-446.

Ariznavarreta C, Cardinali DP, Villanua MA, Granados B, Martín M, Chiesa JJ, et al. Circadian rhythms in airline pilots submitted to longhaul transmeridian flights. *Aviat Space Environ Med* 2002; 73:445-455.

Arndtz K, Hirschfield GM. The pathogenesis of autoimmune liver disease. *Dig Dis* 2016; 34:327-333.

Baba Y, Saeki K, Onodera T, Doi K. Serological and immunohistochemical studies on porcine-serum-induced hepatic fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol* 2005; 79:229-235.

Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* 2010; 221:117-124.

Bernuth S, Yagmur E, Schuppan D, Sprinzl MF, Zimmermann A, Schad A, et al. Early changes in dynamic biomarkers of liver fibrosis in hepatitis C virus-infected patients treated with sofosbuvir. *Dig Liver Dis* 2016; 48:291-297.

Berres ML, Koenen RR, Rueland A, Zaldivar MM, Heinrichs D, Sahin H, et al. Antagonism of the chemokine Ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2010; 120:4129-4140.

Biecker E, De Gottardi A, Neef M, Unternährer M, Scheneider V, Ledermann M, et al. Long-term treatment of bile duct-ligated rats with rapamycin (sirolimus) significantly attenuates liver fibrosis: analysis of the underlying mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313:952-961.

Bieler J, Cannavo R, Gustafson K, Gobet C, Gatfield D, Naef F. Robust synchronization of coupled circadian and cell cycle oscillators in single mammalian cells. *Mol Syst Biol* 2014; 10:739.

Bissig KD, Wieland SF, Tran P, Isogawa M, Le TT, Chisari FV, et al. Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest* 2010; 120:924-930.

Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 2005; 171:603-614.

Boonstra A, van der Laan LJ, Vanwolleghem T, Janssen HL. Experimental models for hepatitis C viral infection. *Hepatology* 2009; 50:1646-1655.

Booth LA, Tavallai S, Hamed HA, Cruickshanks N, Dent P. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cell Signal* 2014; 26:549-555.

Borengasser SJ, Kang P, Faske J, Gomez-Acevedo H, Blackburn ML, Badger TM, et al. High fat diet and in utero exposure to maternal obesity disrupts circadian rhythm and leads to metabolic programming of liver in rat offspring. *PLoS One* 2014; 9:e84209.

Borkham-Kamphorts E, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF in liver fibrosis. *J Hepatol* 2007; 46:1064-1107.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

Brunati AM, Tibaldi E, Carraro A, Gringeri E, D'Amico F Jr, Toninello A, et al. Cross-talk between PDGF and S1P signalling elucidates the inhibitory effect and potential antifibrotic action of the immunomodulator FTY720 in activated HSC-cultures. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783:347-359.

Bu Y, Yoshida A, Chitnis N, Altman BJ, Tameire F, Oran A, et al. A PERK-miR-211 axis suppresses circadian regulators and protein synthesis to promote cancer cell survival. *Nat Cell Biol* 2018; 20:104-115.

Bubenik GA. Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy. *Horm Res* 1980; 12:313-323.

B'chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, et al. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:7683-7699.

Campos G, Schmidt-Heck W, Ghallab A, Rochlitz K, Pütter L, Medinas DB, et al. The transcription factor CHOP, a central component of the transcriptional regulatory network induced upon CCl₄ intoxication in mouse liver, is not a critical mediator of hepatotoxicity. *Arch Toxicol* 2014; 88:1267-1280.

Cao Y, Luo Y, Zou J, Ouyang J, Cai Z, Zeng X, et al. Autophagy and its role in gastric cancer. *Clin Chim Acta* 2019; 489:10-20.

Carter HE, Glick FJ, Norris WP, Phillips GE. Biochemistry of sphingolipids. III. Structure of sphingosine. *J Biol Chem* 1947; 170:285-294.

Cassone VM, Chesworth MJ, Armstrong SM. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol Behav* 1986; 36:1111-1121.

Cencetti F, Bernacchioni C, Nincheri P, Donati C, Bruni P. Transforming growth factor-beta1 induces transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts via up-regulation of sphingosine kinase-1/S1P3 axis. *Mol Biol Cell* 2010; 21:1111-1124.

Chen L, Yang G. PPARs integrate the mammalian clock and energy metabolism. *PPAR Res* 2014; 653017.

Chen P, Han Z, Yang P, Zhu L, Hua Z, Zhang J. Loss of clock gene mPer2 promotes liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatol Res* 2010a; 40:1117-1127.

Chen P, Kakan X, Wang S, Dong W, Jia A, Cai C, et al. Deletion of clock gene Per2 exacerbates cholestatic liver injury and fibrosis in mice. *Exp Toxicol Pathol* 2013; 65:427-432.

Chen P, Kakan X, Zhang J. Altered circadian rhythm of the clock genes in fibrotic livers induced by carbon tetrachloride. *FEBS Lett* 2010b; 584:1597-1601.

Chen P, Li C, Pang W, Zhao Y, Dong W, Wang S, et al. The protective role of Per2 against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Am J Pathol* 2009; 174:63-70.

Chiou YY, Yang Y, Rashid N, Ye R, Selby CP, Sancar A. Mammalian Period represses and de-represses transcription by displacing CLOCK-BMAL1 from promoters in a Cryptochrome-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci* 2016; 113:e6072-e6079.

Cho H, Zhao X, Hatori M, Yu RT, Barish GD, Lam MT, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature* 2012; 485:123-127.

Cho YA, Noh K, Jue SS, Lee SY, Kim EC. Melatonin promotes hepatic differentiation of human dental pulp stem cells: Clinical implications for the prevention of liver fibrosis. *J Pineal Res* 2015; 58:127-135.

Choi A, Ryter SW, Levine B. Mechanisms of disease: Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 2013; 368:651-662.

Choi HS, Kang JW, Lee SM. Melatonin attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via inhibition of necroptosis. *Transl Res* 2015; 166:292-303.

Clairambault J. Circadian rhythm and cell population growth. *Math Comput Model* 2010; 53:1558-1567.

Coant N, Hannun YA. Neutral ceramidase: Advances in mechanisms, cell regulation, and roles in cancer. *Adv Biol Regul* 2018; S2212-4926:30151-30159.

Colares JR, Schemitt EG, Hartmann RM, Licks F, do Couto Soares M, Dal Bosco A, et al. Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental

model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. *World J Gastroenterol* 2016; 22:8918.

Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 2005; 117:237-250.

Córdoba J, Cabrera J, Lataif L, Penev P, Zee P, Blei AT. High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology* 1998; 27:339-345.

Crespo I, San Miguel B, Laliena A, Álvarez M, Culebras JM, González-Galelgo J, et al. Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin. *J Pineal Res* 2010; 49:193-200.

Crespo I, San-Miguel B, Fernández A, Ortiz de Urbina J, González-Gallego J, Tuñón MJ. Melatonin limits the expression of profibrogenic genes and ameliorates the progression of hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Translat Res* 2015; 166:346-357.

Crespo I, San-Miguel B, Mauriz JL, Ortiz de Urbina JJ, Almar M, Tuñón MJ, et al. Protective effect of protocatechuic acid on TNBS-induced colitis in mice is associated with modulation of the SphK/S1P signaling pathway. *Nutrients* 2017; 9:e288.

Cruz A, Padillo FJ, Torres E, Navarrete CM, Muñoz-Castañeda JR, Caballero FJ, et al. Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *J Pineal Res* 2005; 39:143-150.

Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O'Neill LA. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* 2014; 40:178-186.

Cuvillier O. Downregulating sphingosine kinase-1 for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12:1009-1020.

Czechowska G, Celinski K, Korolczuk A, Tohamy HG, El-Sayed YS. Protective effects of melatonin against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2015; 66:567-579.

Damhoff TC, Huecker MR. Sleeplessness and Circadian Disorder. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): *StatPearls Publishing* 2018.

Das N, Mandala A, Naaz S, Giri S, Jain M, Bandyopadhyay D, et al. Melatonin protects against lipid-induced mitochondrial dysfunction in hepatocytes and inhibits stellate cell activation during hepatic fibrosis in mice. *J Pineal Res* 2017; 62:4.

De David C, Rodrigues G, Bona S, Meurer L, González-Gallego J, Tuñón MJ, et al. Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicol Pathol* 2011; 39:949-957.

Deacon S, Arendt J. Melatonin-induced temperature suppression and its acute phase-shifting effects correlate in a dose-dependent manner in humans. *Brain Res* 1995; 88:77-85.

Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chem Biol Interact* 2006; 163:94-112.

Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 2009; 5:527-549.

Devereaux K, Dall'Armi C, Alcazar-Roman A, Ogasawara Y, Zhou X, Wang F, et al. Regulation of mammalian autophagy by class II and III PI 3-kinases through PI3P synthesis. *PLoS One* 2013; 8:e76405.

Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* 2010; 72:517-549.

Dickson RC. Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J Lipid Res* 2008; 49:909-921.

Ding BS, Liu CH, Sun Y, Chen Y, Swendeman SL, Jung B, et al. HDL activation of endothelial sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1P1) promotes regeneration and suppresses fibrosis in the liver. *JCI Insight* 2016;1:e87058.

Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, et al. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* 2007; 45:513-524.

Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, Baldassare M, Lucchetti G, Quarta C, et al. A novel model of CCl₄-induced cirrhosis with ascites in the mouse. *J Hepatol* 2009; 51:991-999.

Donati C, Cencetti F, Bruni P. Sphingosine 1-phosphate axis: a new leader actor in skeletal muscle biology. *Front Physiol* 2013; 4:338.

Dong RQ, Wang ZF, Zhao C, Gu HR, Hu ZW, Xie J, et al. Toll-like receptor 4 knockout protects against isoproterenol-induced cardiac fibrosis: the role of autophagy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2015; 20:84-92.

Dooley S, Streckert M, Delvoux B, Gressner AM. Expression of Smads during in vitro transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283:554-562.

Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; 27:101-110.

Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MR. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol* 2015; 33:747-85.

Duffield GE, Best JD, Meurers BH, Bittner A, Loros JJ, Dunlap JC. Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr Biol* 2002; 12:551-557.

Dunlop EA, Tee AR. mTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 36:121-129.

Duval F, Moreno-Cuevas JE, González-Garza MT, Maldonado-Bernal C, Cruz-Vega De. Liver fibrosis and mechanisms of the protective action of medicinal plants targeting inflammation and the immune response. *Int J Inflamm* 2015; 2015:943497.

Dyckman AJ. Modulators of sphingosine-1-phosphate pathway biology: recent advances of sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) agonists and future perspectives. *J Med Chem* 2017; 60:5267-5289.

Ebaid H, Bashandi SAE, Alhazza IM, Rady A, El-Shehry S. Folic acid and melatonin ameliorate carbon tetrachloride-induced hepatic injury, oxidative stress and inflammation in rats. *Nutr Metab* 2013; 10:20.

Ebrahimi H, Naderian M, Sohrabpour AA. New concepts on pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis; a review article. *Middle East J Dig Dis* 2016; 8:166-178.

Ebrahimi H, Naderian M, Sohrabpour AA. New concepts on reversibility and targeting of liver fibrosis; a review article. *Middle East J Dig Dis* 2018; 10:133-148.

Egan DF, Chun MG, Vamos M, Zou H, Rong J, Miller CJ, et al. Small molecule inhibition of the autophagy kinase ULK1 and identification of ULK1 substrates. *Mol Cell* 2015; 59:285-297.

Egawa N, Yamamoto K, Inoue H, Hikawa R, Nishi K, Mori K, et al. The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6 α , protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *J Biol Chem* 2011; 286:7947-7957.

Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 97-108.

El-Athman R, Genov NN, Mazuch J, Zhang K, Yu Y, Fuhr L, et al. The Ink4a/Arf locus operates as a regulator of the circadian clock modulating RAS activity. *PLoS Biol* 2017; 15:e2002940.

Elbe H, Esrefoglu M, Vardi N, Taslidere E, Ozerol E, Tanbek K. Melatonin, quercetin and resveratrol attenuates oxidative hepatocellular injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum Exp Toxicol* 2015; 34:859-868.

Esrefoglu M, Cetin A, Taslidere E, Elbe H, Ates B, Tok OE, et al. Therapeutic effects of melatonin and quercetin in improvement of hepatic steatosis in rats through suppression of oxidative damage. *Bratisl Med J* 2017; 118:347-354.

Evangelisti C, Evangelisti C, Buontempo F, Lonetti A, Orsini E, Chiarini F, et al. Therapeutic potential of targeting sphingosine kinases and sphingosine 1-phosphate in hematological malignancies. *Leukemia* 2016; 30:2142-2151.

Fayyaz SL, Kleuser B. Divergent role of sphingosine 1-phosphate on insulin resistance. *Cell Physiol Biochem* 2014; 34:134-147.

Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Weiglein AH, Lammert F, et al. Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology* 2002; 123:1238-1251.

Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, et al. AMBRA1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 2007; 447:1121-1125.

Firsov D, Bonny O. Circadian rhythms and the kidney. *Nat Rev Nephrol* 2018; 14:626-635.

Forsyth CB, Voigt RM, Burgess HJ, Swanson GR, Keshavarzian A. Circadian rhythms, alcohol and gut interactions. *Alcohol* 2015; 49:389-398.

Francque S, Verrijken A, Caron S, Prawitt J, Paumelle R, Derudas B, et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2015; 63:164-173.

Freitas I, Boncompagni E, Tarantola E, Gruppi C, Bertone V, Ferrigno A, et al. In Situ evaluation of oxidative stress in rat fatty liver induced by a methionine- and choline-deficient diet. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016:9307064.

Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis –fact or fantasy. *Hepatology* 2006; 43:82-88.

Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7:425-436.

Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean multifunctional and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008a; 88:125-172.

Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008b; 134:1655-1669.

Fu L, Lee CC. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3:350-361.

Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell* 2008; 19:2092-2100.

Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, et al. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* 2013a; 9:403-409.

Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, et al. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy* 2013b; 9:1167-1171.

Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, et al. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest* 2012; 122:1416-1426.

Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO rep* 2004; 5:777-782.

Gabele E, Reif S, Tsukada S, Bataller R, Yara Y, Morris T, et al. The role of p70S6K in hepatic stellate cell collagen gene expression and cell proliferation. *J Biol Chem* 2005; 280:13374-13382.

Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are IRE1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 2011; 333:1891-1894.

Garg M, Kaur S, Banik A, Kumar V, Rastogi A, Sarin SK, et al. Bone marrow endothelial progenitor cells activate hepatic stellate cells and aggravate carbon tetrachloride induced liver fibrosis in mice via paracrine factors. *Cell Prolif* 2017; 50(4).

Gaut JR, Hendershot LM. The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:589-595.

Gellings LN, Swaney JS, Moreno KM, Sabbadini RA. Sphingosine-1-phosphate and sphingosine kinase are critical for transforming growth factor-beta-stimulated collagen production by cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2009; 82:303-312.

Gillissen A. Anti-inflammatory efficacy of N-acetylcysteine and therapeutic usefulness. *Pneumologie* 2011; 65:549-557.

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 2010; 221:3-12.

Gorman AM, Healy SJ, Jäger R, Samali A. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther* 2012; 134:306-316.

Grace MS, Cahill GM, Besharse JC. Melatonin deacetylation: Retinal vertebrate class distribution and xenopus laevis tissue distribution. *Brain Res* 1991; 559:56-63.

Grammatikos G, Schoell N, Ferreirós N, Bon D, Herrmann E, Farnik H, et al. Serum sphingolipidomic analyses reveal an upregulation of C16-ceramide and sphingosine-1-phosphate in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7:18095-18105.

Greenhalgh SN, Conroy KP, Henderson NC. Healing scars: Targeting pericytes to treat fibrosis. *QJM* 2015; 108:3-7.

Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol* 2007; 6:7.

Gu J, Zhuang L, Huang GC. Melatonin prevents H₂O₂-induced activation of rat hepatic stellate cells. *J Pineal Res* 2006; 41:275-278.

Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002; 2:167-179.

Guerrero-Vargas NN, Navarro-Espíndola R, Guzmán-Ruíz MA, Basualdo MDC, Espitia-Bautista E, López-Bago A, et al. Circadian disruption promotes tumor growth by anabolic host metabolism; experimental evidence in a rat model. *BMC Cancer* 2017; 17:625

Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK, et al. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 2009; 325:1254-1257.

Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 2013; 495:389-393.

Hams E, Bermingham R, Fallon PG. Macrophage and innate lymphoid cell interplay in the genesis of fibrosis. *Front Immunol* 2015; 6:597.

Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17:347-357.

Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: Occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:2001-2018.

Hardin PE. Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *J Biol Rhythms* 2004; 19:348-360.

Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4:649-661.

Hatoum D, Haddadi N, Lin Y, Nassif NT, McGowan EM. Mammalian sphingosine kinase (SphK) isoenzymes and isoform expression: challenges for SphK as an oncotarget. *Oncotarget* 2017; 8:36898-36929.

He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; 43:67-93.

He W, Wang B, Yang J, Zhuang Y, Wang L, Huang X, et al. Chloroquine improved carbon tetrachloride-induced liver fibrosis through its inhibition of the activation of hepatic stellate cells: role of autophagy. *Biol Pharm Bull* 2014; 37:1505-1509.

Heo J. Melatonin improves insulin resistance and hepatic steatosis through attenuation of ER stress. *The FASEB Journal* 2017; 31:221-221.

Hernández-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 2012; 142:938-946.

Hernández-Gea V, Hilscher M, Rozenfeld R, Lim MP, Nieto N, Werner S, et al. Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. *J Hepatol* 2013; 59:98-104.

Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α . *Physiol Rev* 2011; 91:1219-1243.

Hill SM, Blask DE, Xiang S, Yuan L, Mao L, Dauchy RT, et al. Melatonin and associated signaling pathways that control normal breast epithelium and breast cancer. *J Mammary Gland Biol* 2011; 16:235-245.

Hirao J, Niino N, Arakawa S, Shibata S, Mori K, Ando Y, et al. Circadian modulation of hepatic transcriptome in transgenic rats expressing human growth hormone. *J Toxicol Sci* 2010; 35:673-685.

Hisano Y, Kobayashi N, Kawahara A, Yamaguchi A, Nishi T. The sphingosine 1-phosphate transporter, SPNS2, functions as a transporter of the phosphorylated form of the immunomodulating agent FTY720. *J Biol Chem* 2011; 286:1758-1766.

Hold V, Ozaras R, Canbakan B, Uzun H, Aydin S, Yildirim B, et al. Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *J Pineal Res* 2004; 37:78-84.

Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12:861-882.

Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 2009; 15:1452-1458.

Hong Y, Li S, Wang J, Li Y. In vitro inhibition of hepatic stellate cell activation by the autophagy-related lipid droplet protein ATG2A. *Sci Rep* 2018; 8:9232.

Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 2009; 20:1981-1991.

Hu W, Ma Z, Jiang S, Fan C, Deng C, Yan X, et al. Melatonin: the dawning of a treatment for fibrosis. *J Pineal Res* 2016; 60:121-131.

Hu Y, Spengler ML, Kuropatwinski KK, Comas M, Jackson M, Chernov MV, et al. Selenium is a modulator of circadian clock that protects mice from the toxicity of a chemotherapeutic drug via upregulation of the core clock protein, BMAL1. *Oncotarget* 2011; 2:1279-1290.

Huang G, Zhang F, Ye Q, Wang H. The circadian clock regulates autophagy directly through the nuclear hormone receptor Nr1d1/Rev-erba and indirectly via Cebpb/(C/ebpβ) in zebrafish. *Autophagy* 2016; 12:1292-1309.

Huang H, Huang K, Lan T, Xie X, Shen X, Liu P, et al. Curcumin ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting the activation of the SphK1/S1P signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 365:231-240.

Huang J, Lam GY, Brumell JH. Autophagy signaling through reactive oxygen species. *Antiox Redox Signal* 2011; 14:2215-2231.

Huang L, Ma W, Zhou T, He D, Feghall-Bostwich C, Reddy S, et al. Sphingosine 1 phosphate lyase functions as an endogenous suppressor of pulmonary fibrosis in humans and in a mouse model. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189:A1251.

Huang LS, Berdyshev EV, Tra JT, Xie L, Chen J, Ebenezer DL, et al. Sphingosine-1-phosphate lyase is an endogenous suppressor of pulmonary fibrosis: role of S1P signaling and autophagy. *Thorax* 2015; 70:1138-1148.

Huang LS, Natarajan V. Sphingolipids in pulmonary fibrosis. *Adv Biol Regul* 2015; 57:55-63.

Huang Y, Deng X, Liang J. Modulation of hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis. *Exp Cell Res* 2017; 352:420-426.

Huber AL, Lebeau J, Guillaumot P, Petrilli V, Malek M, Chilloux J, et al. p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. *Mol Cell* 2013; 49:1049-1059.

Huebener P, Pradere JP, Hernandez C, Gwak GY, Caviglia JM, Mu X, et al. The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis. *J Clin Invest* 2015; 125:539-550.

Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: Evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 1992; 51:945-953.

Hung MY, Fu TY, Shih PH, Lee CP, Yen GC. Du-Zhong (Eucommia ulmoides Oliv.) leaves inhibits CCl₄-induced hepatic damage in rats. *Chem Toxicol* 2006; 44:1424-1431.

Ideura T, Yoshimura A, Shirai M, Taira T, Koshikawa S. The endotoxin-induced acute tubular necrosis in rats with cirrhosis. *Scand J Urol Nephrol* 1993; 27:433-439.

Ikeda H, Watanabe N, Ishii I, Shimosawa T, Kume Y, Tomiya T, et al. Sphingosine 1-phosphate regulates regeneration and fibrosis after liver injury via sphingosine 1-phosphate receptor 2. *J Lipid Res* 2009; 50:556-564.

Ikeda H, Yatomi Y, Yanase M, Satoh H, Maekawa H, Ogata I, et al. Biological activities of novel lipid mediator sphingosine 1-phosphate in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279:304-310.

Innominato PF, Lévi FA, Bjarnason GA. Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62:979-1001.

Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007; 117:539-548.

Itakura E, Mizushima N. Atg14 and UVRAG: mutually exclusive subunits of mammalian Beclin 1-PI3K complexes. *Autophagy* 2009; 5:534-536.

Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, Amemiya A, Sumi Y. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 136:7-13.

Jaeschke H. Mechanisms of liver injury. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol* 2006; 290:1083-1088.

Janssens S, Pulendran B, Lambrecht BN. Emerging functions of the unfolded protein response in immunity. *Nat Immunol* 2014; 15:910-919.

Jenkins SA, Grandison A, Baxter JN, Day DW, Taylor I, Shields R. A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. *J Hepatol* 1985; 1:489-499.

Jiang T, Chang Q, Cai J, Fan J, Zhang X, Xu G. Protective effects of melatonin on retinal inflammation and oxidative stress in experimental diabetic retinopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016:3528274.

Jimenez W, Claria J, Arroyo V, Rodés J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1992; 7:90-97.

Jiménez-Jorge S, Jiménez-Caliani AJ, Guerrero JM, Naranjo MC, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, et al. Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland. *J Pineal Res* 2005; 39:77-83.

Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, et al. Targeted disruption of the mouse mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 2003; 23:1054-1060.

Jouffe C, Cretenet G, Symul L, Martin E, Atger F, Naef F, et al. The circadian clock coordinates ribosome biogenesis. *PLoS Biol* 2013; 11:e1001455.

Jung YK, Yim HJ. Reversal of liver cirrhosis: current evidence and expectations. *Korean J Intern Med* 2017; 32:213-228.

Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, Kanemoto S, Asada R, Matusuhisa K, et al. ER stress and disease: toward prevention and treatment. *Biol Pharm Bull* 2017; 40:1337-1343.

Kang JW, Cho HI, Lee SM. Melatonin inhibits mTOR-dependent autophagy during liver ischemia/reperfusion. *Cell Physiol Biochem* 2014; 33:23-36.

Kang JW, Hong JM, Lee SM. Melatonin enhances mitophagy and mitochondrial biogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *J Pineal Res* 2016; 60:383-393.

Kang TH, Sancar A. Circadian regulation of DNA excision repair: implications for chrono-chemotherapy. *Cell Cycle* 2009; 8:1665-1667.

Karin D, Koyama Y, Brenner D, Kisseleva T. The characteristics of activated portal fibroblasts/myofibroblasts in liver fibrosis. *Differentiation* 2016; 92:84-92.

Karthikeyan S, Potter JJ, Geschwind JF, Sur S, Hamilton JP, Vogelstein B, et al. Deregulation of energy metabolism promotes antifibrotic effects in human hepatic stellate cells and prevents liver fibrosis in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 449:463-469.

Ke PY, Chen SS. Hepatitis C virus and cellular stress response: implications to molecular pathogenesis of liver diseases. *Viruses* 2012; 4:2251-2290.

Kee TH, Vit P, Melendez AJ. Sphingosine kinase signalling in immune cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32:153-161.

Kettner NM, Voicu H, Finegold MJ, Coarfa C, Sreekumar A, Putluri N, et al. Circadian homeostasis of liver metabolism suppresses hepatocarcinogenesis. *Cancer Cell* 2016; 33:909-924.

Kikuchi A, Pradhan-Sundt T, Singh S, Nagarajan S, Loizos N, Monga SP. Platelet-derived growth factor receptor α contributes to human hepatic stellate cell proliferation and migration. *Am J Pathol* 2017; 187:2273-2287.

Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, et al. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52:307-357.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016; 12:1-222.

Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:931-937.

Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 2006; 15:271-277.

Kobayashi H, Kromminga A, Dunlop TW, Tychsen B, Conrad F, Suzuki N, et al. A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors. *FASEB J* 2005; 19:1710-1712.

Kobayashi M, Morinibu A, Koyasu S, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. A circadian clock gene, PER2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 α to promoter regions of its downstream genes. *FEBS J* 2017; 284:3804-3816.

Kochan DZ, Kovalchuk O. Circadian disruption and breast cancer: an epigenetic link? *Oncotarget* 2015; 6:16866-16882.

Kolar J, Machackova I. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. *J Pineal Res* 2005; 39:333-341.

Komatsu, M. Liver autophagy: physiology and pathology. *J Biochem* 2012; 152:5-15.

Kong Y, Wang H, Wang S, Tang N. FTY720, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, improves liver fibrosis in a mouse model by impairing the motility of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Inflammation* 2014; 37:1326-1336.

Kono Y, Nishiuma T, Nishimura Y, Kotani Y, Okada T, Nakamura S, et al. Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF-beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37:395-404.

Koster-van Hoffen GC, Mirmiran M, Bos NP, Witting W, Delagrange P, Guardiola-Lemaitre B. Effects of a novel melatonin analog on circadian rhythms of body temperature and activity in young, middle-aged, and old rats. *Neurobiol Aging* 1993; 14:565-569.

Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, et al. ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* 2007; 14:230-239.

Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2017; 17:306-321.

Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010; 40:280-293.

Kudo T, Tamagawa T, Shibata S. Effect of chronic ethanol exposure on the liver of Clock-mutant mice. *J Circadian Rhythms* 2009; 7:4.

Kumar A, Zamora-Pineda J, Degagne E, Saba JD. S1P lyase regulation of thymic egress and oncogenic inflammatory signaling. *Mediators Inflamm* 2017; 2017:7685142.

Kunkel GT, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12:688-702.

Kurus M, Esrefoglu M, Sogutlu G, Atasever A. Melatonin prevents cyclosporine-induced hepatotoxicity in rats. *Med Princ Pract* 2009; 18:407-410.

Kurz J, Parnham MJ, Geisslinger G, Schiffman S. Ceramides as novel disease biomarkers. *Trends Mol Med* 2018; S1471-4914:30205-30213.

Kus I, Ogeturk M, Oner H, Sahin S, Yekeler H, Sarsilmaz M. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. *Cell Biochem Funct* 2005; 23:169-174.

Kwon EY, Shin SK, Choi MS. Ursolic acid attenuates hepatic steatosis, fibrosis, and insulin resistance by modulating the circadian rhythm pathway in diet-induced obese mice. *Nutrients* 2018; 10:e1719.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

Laliena A, San-Miguel B, Crespo I, Álvarez M, González-Gallego J, Tuñón MJ. Melatonin attenuates inflammation and promotes regeneration in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res* 2012; 53:270-278.

Lang PA, Schenck M, Nicolay JP, Becker JU, Kempe DS, Lupescu A, et al. Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med* 2007; 13:164-170.

Lebda MA, Sadek KM, Aboued TK, Tohamy HG. Melatonin mitigates thioacetamide-induced hepatic fibrosis via antioxidant activity and modulation of proinflammatory cytokines and fibrogenic genes. *Life Sci* 2018; 192:136-143.

Leclercq IA, Lebrun VA, Starkel P, Horsmans YJ. Intrahepatic insulin resistance in a murine model of steatohepatitis: effect of PPARgamma agonist pioglitazone. *Lab Invest* 2007; 87:56-65.

Lee AH, Heidtman K, Hotamisligil GS, Glimcher LH. Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1 α and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108:8885-8890.

Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodelling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology* 2007; 45:817-825.

Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* 2015; 64:830-841.

Lemmer B, Oster H. The role of circadian rhythms in the hypertension of diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2018; 20:43.

Lerner LJ, Holthaus FJ, Thompson CR. A non-steroidal estrogen antiagonist 1-(p-2-diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenyl ethanol. *Endocrinology* 1958; 63:295-318.

Lesicka M, Jabłońska E, Wieczorek E, Seroczyńska B, Siekierzycka A, Skokowski J, et al. Altered circadian genes expression in breast cancer tissue according to the clinical characteristics *PLoS One* 2018; 13:e0199622.

Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2017; 17:528-542.

Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA, Markey SP. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* 1980; 210:1267-1269.

Li C, Jiang X, Yang L, Liu X, Yue S, Li L. Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P3 signaling in cholestasis-induced liver fibrosis. *Am J Pathol* 2009; 175:1464-1472.

Li C, Zheng S, You H, Liu X, Lin M, Yang L, et al. Sphingosine-1-phosphate (S1P)/S1P receptors are involved in human liver fibrosis by action on hepatic myofibroblasts motility. *J Hepatol* 2011; 54:1205-1213.

Li H, Lu YF, Chen H, Liu J. Dysregulation of metallothionein and circadian genes in human hepatocellular carcinoma. *Chronobiol Int* 2017a; 34:192-202.

Li J, Ni M, Lee B, Barron E, Hinton DR, Lee AS. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ* 2008; 15:1460-1471.

Li J, Zeng C, Zheng B, Liu C, Tang M, Jiang Y, et al. HMGB1-induced autophagy facilitates hepatic stellate cells activation: a new pathway in liver fibrosis. *Clinical Sci (Lond)* 2018.

Li T, Eheim AL, Klein S, Uschnerm FE, Smith AC, Brandon-Warner E, et al. Novel role of nuclear receptor Rev-erba in hepatic stellate cell activation: potential therapeutic target for liver injury. *Hepatology* 2014; 59:2383-2396.

Li ZY, Zhang C, Zhang Y, Chen L, Chen BD, Li QZ, et al. A novel HDAC& inhibitor Tubastatin A: Controls HDAC6-p97/VCP mediated ubiquitination-autophagy turnover and reverses Temozolomide-induced ER stress-tolerance in GBM cells. *Cancer Lett* 2017b; 10:89-99.

Liberal R, Grant CR. Cirrhosis and autoimmune liver disease: current understanding. *World J Hepatol* 2016; 8:1157-1168.

Lieber CS, Jones DP, DeCarli LM. Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diets. *J Clin Invest* 1965; 44:1009-1021.

Liedke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrog Tissue Repair* 2013; 6:19.

Lin R, Su Z, Tan X, Su Y, Chen Y, Shu X, et al. Effect of endoplasmic reticulum stress and autophagy in the regulation of post-infarct cardiac repair. *Ach Med Res* 2018; 188:30362.

Lin S, Hoffmann K, Gao C, Petrulionis M, Herr I, Schemmer P. Melatonin promotes sorafenib-induced apoptosis through synergistic activation of JNK/c-jun pathway in human hepatocellular carcinoma. *J Pineal Res* 2017; 62(3).

Liu W, Liu B, Liu S, Zhang J, Lin S. Sphingosine-1-phosphate receptor 2 mediates endothelial cells dysfunction by PI3K-Akt pathway under high glucose condition. *Eur J Pharmacol* 2016; 776:19-25.

Liu X, Yue S, Li C, Yang L, You H, Li L. Essential roles of sphingosine 1-phosphate receptor types 1 and 3 in human hepatic stellate cells motility and activation. *J Cell Physiol* 2011; 226:2370-2377.

Loureiro R, Magalhães-Novais S, Mesquita KA, Baldeiras I, Sousa IS, Tavares LC, et al. Melatonin antiproliferative effects require active mitochondrial function in embryonal carcinoma cells. *Oncotarget* 2015; 6:17081.

Lu DH, Guo XY, Qin SY, Luo W, Huang XL, Chen M, et al. Interleukin-22 ameliorates liver fibrogenesis by attenuating hepatic stellate cell activation and downregulating the levels of inflammatory cytokines. *World J Gastroenterol* 2015; 21:1531-1545.

Luciano AK, Zhou W, Santana JM, Kyriakides C, Velazquez H, Sessa WC. CLOCK phosphorylation by AKT regulates its nuclear accumulation and circadian gene expression in peripheral tissues. *J Biol Chem* 2018; 293:9126-9136.

Ma D, Li S, Molusky MM, Lin JD. Circadian autophagy rhythm: a link between clock and metabolism? *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23:319-325.

Madaro L, Marrocco V, Carnio S, Sandri M, Bouché M. Intracellular signaling in ER stress-induced autophagy in skeletal muscle cells. *FASEB J* 2013; 27:1990-2000.

Maillo C, Martin J, Sebastian D, Hernández-Alvarez M, García-Rocha M, Reina O, et al. Circadian-and UPR-dependent control of CPEB4 mediates a translational response to counteract hepatic steatosis under ER stress. *Nat Cell Biol* 2017; 19:94-105.

Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* 2011; 54:795-809.

Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18:716-731.

Mallat A, Lodder J, Teixeira-Clerc F, Moreau R, Codogno P, Lotersztajn S. Autophagy: A multifaceted partner in liver fibrosis. *Biomed Res Int* 2014; 2014:869390.

Mann NS, Hillis A, Mann SK, Buerk CA, Prasad VM. In cirrhotic patients variceal bleeding is more frequent in the evening and correlates with severity of liver disease. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:391-394.

Marcellin P, Kutala BK. Liver diseases: a major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver Int* 2018; 38:2-6.

Marcolin E, San-Miguel B, Vallejo D, Tieppo J, Marroni N, González-Gallego J, et al. Quercetin treatment ameliorates inflammation and fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr* 2012; 142:1821-1828.

Marcos R, Rocha E, Henrique RMF, Monteiro RAF. A new approach to an unbiased estimate of the hepatic stellate cell index in the rat liver: an example in healthy conditions. *J Histochem Cytochem* 2003; 51:1101-1104.

Martinek S, Ionog AS, Manoukian Y, Young MW. A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the drosophila circadian clock. *Cell* 2001; 105:769-779.

Masui A, Hamada M, Kameyama H, Wakabayashi K, Takasu A, Imai T, et al. Autophagy as a survival mechanism for squamous cell carcinoma cells in endonuclease G-mediated apoptosis. *PLoS One* 2016; 11:e0162786.

Matsu-Ura T, Dovzhenok A, Aihara E, Rood J, Le H, Ren Y, et al. Intercellular coupling of the cell cycle and circadian clock in adult stem cell culture. *Mol Cell* 2016; 64:900-912.

Matsumoto T, Takami T, Sakaida I. Cell transplantation as a non-invasive strategy for treating liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 10:639-648.

Mazzocchi G, De Cosmo S, Mazza T. The biological clock: a pivotal hub in non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Front Physiol* 2018; 9:193.

McAlpine F, Williamson LE, Tooze SA, Chan EY. Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy* 2013; 9:361-373.

McCuskey RS. The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants. *Anat Rec* 2008; 291:661-671.

McGlynn KA, Petrick JL, London WT. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis* 2015; 19: 223-238.

Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res* 2010; 20:748-762.

Mehta P, Henault J, Kolbeck R, Sanjuan MA. Noncanonical autophagy: one small step for LC3, one giant leap for immunity. *Curr Opin Immunol* 2014; 26:69-75.

Meuleman P, Libbrecht L, Wieland S, De RV, Habib N, Kramvis A, et al. Immune suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the hepatitis B virus. *J Virol* 2006; 80:2797-2807.

Mezaki Y, Yamaguchi N, Yoshikawa K, Miura M, Imai K, Itoh H, et al. Insoluble, speckled cytosolic distribution of retinoic acid receptor α protein as a marker of hepatic stellate cell activation in vitro. *J Histochem Cytochem* 2009; 57:687-699.

Mhatre MC, van Jaarsveld AS, Reiter RJ. Melatonin in the lacrimal gland: First demonstration and experimental manipulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153:1186-1192.

Mitra A, Satelli A, Yan J. IL-30 (IL27p28) attenuates liver fibrosis through inducing nkg2d-rae1 interaction between nkt and activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* 2014; 60:2027-2039.

Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103:16394-16399.

Miyaki E, Imamura M, Hiraga N, Murakami E, Kawaoka T, Tsuge M, et al. Daclatasvir and asunaprevir treatment improves liver function parameters and reduces liver fibrosis markers in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2016; 46:758-764.

Mizushima N, Klionsky, DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* 2007; 27:19-40.

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27:107-132.

Mohamadnejad M, Vosough M, Moossavi S, Nikfam S, Mardpour S, Akhlaghpour S, et al. Intraportal infusion of bone marrow mononuclear or CD133+ cells in patients with decompensated cirrhosis: a double-blind randomized controlled trial. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5:87-94.

Moles A, Tarrats N, Morales A, Domínguez M, Bataller R, Caballería J, et al. Acidic sphingomyelinase controls hepatic stellate cell activation and *in vivo* liver fibrogenesis. *Am J Pathol* 2010; 177:1214-1224.

Møller S, Wiinberg N, Henriksen JH. Noninvasive 24-hour ambulatory arterial blood pressure monitoring in cirrhosis. *Hepatology* 1995; 22:88-95.

Moore PC, Oakes SA. CPEB4 links the clock and the UPR to protect the liver. *Nat Cell Biol* 2017; 19:79-81.

Mormont M, Levi F. Cancer chronotherapy: principles, applications, and perspectives. *Cancer* 2003; 97:155-169.

Mortezaee K, Khanlarkhani N, Sabbaghziarani F, Nekoonam S, Majidpour J, Hosseini A, et al. Preconditioning with melatonin improves therapeutic outcomes of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in targeting liver fibrosis induced by CCl₄. *Cell Tissue Res* 2017a; 2017:1-10.

Mortezaee K, Khanlarkhani N. Melatonin application in targeting oxidative-induced liver injuries: A review. *J Cell Physiol* 2018; 233:4015-4032.

Mortezaee K, Majidpour J, Daneshi E, Abouzaripour M, Abdi M. Post-treatment of melatonin with CCl₄ better reduces fibrogenic and oxidative changes in liver than melatonin co-treatment. *J Cell Biochem* 2017b; 119:1716-1725.

Mortezaee K, Pasbakhsh P, Kashani IR, Sabbaghziarani F, Omid A, Zendedel A, et al. Melatonin pretreatment enhances the homing of bone marrow-derived mesenchymal stem cells following transplantation in a rat model of liver fibrosis. *Iran Biomed J* 2016; 20:207.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-350.

Muñoz-Luque J, Ros J, Fernandez-Varo G, Tugues S, Morales-Ruiz M, Álvarez CE, et al. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324:475-483.

Nagahashi M, Abe M, Sakimura K, Takabe K, Wakai T. The role of sphingosine-1-phosphate in inflammation and cancer progression. *Cancer Sci* 2018a; 109:3671-3678.

Nagahashi M, Yamada A, Katsuta E, Aoyagi T, Huang WC, Terracina KP, et al. Targeting the Sphk1/S1P/S1PR1 axis that links obesity, chronic inflammation and breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2018b; 78:1-6.

Nalobin DS, Suprunenko EA, Golichenkov VA. Effects of melatonin on differentiation potential of Ito cells in mice with induced fibrosis of the liver. *Bull Exp Biol Med* 2016; 161:845-849.

Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015; 385:956-965.

Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008; 48:858-879.

Ng ML, Wadham C, Sukocheva OA. The role of sphingolipid signalling in diabetes-associated pathologies. *Int J Mol Med* 2017; 39:243-252.

Nguyen TT, Mattick JS, Yang Q, Orman MA, Ierapetritou MG, Berthiaume F, et al. Bioinformatics analysis of transcriptional regulation of circadian genes in rat liver. *BMC Bioinformatics* 2014; 15:83.

Nielsen OH, Li Y, Johansson-Lindbom B, Coskun M. Sphingosine-1-phosphate signaling in inflammatory bowel disease. *Trends Mol Med* 2017; 23:362-374.

Nishida K, Otsu K. Autophagy during cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 95:11-18.

Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2014; 548:20-37.

Noyan, T, Komuroglu, U, Bayram, I, Sekeroglu, MR. Comparison of the effects of melatonin and pentoxifylline on carbon tetrachloride-induced liver toxicity in mice. *Cell Biol Toxicol* 2006; 22:381-391.

Nualart FJ, Rivas CI, Montecinos VP, Godoy AS, Guaiquil VH, Golde DW, et al. Recycling of vitamin C by a bystander effect. *J Biol Chem* 2003; 278:10128-10133.

Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 2006; 26:9220-9231.

Ogeturk M, Kus I, Pekmez H, Yekeler H, Sahin S, Sarsilmaz M. Inhibition of carbon tetrachloride-mediated apoptosis and oxidative stress by melatonin in experimental liver fibrosis. *Toxicol Ind Health* 2008; 24:201-208.

Ogretmen B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer* 2018; 18:33-50.

Ohta Y, Kongo-Nishimuras M, Matsura T, Yamada K, Kitagawa A, Kishikawa T. Melatonin prevents disruption of hepatic reactive oxygen species metabolism in rats treated with carbon tetrachloride. *J Pineal Res* 2004; 36:10-17.

Ordoñez R, Fernández A, Prieto-Domínguez N, Martínez L, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, et al. Ceramide metabolism regulates autophagy and apoptotic cell death induced by melatonin in liver cancer cells. *J Pineal Res* 2015; 59:178-189.

Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, et al. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of non alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2007; 132:282-293.

Page A, Paoli P, Moran Salvador E, White S, French J, Mann J. Hepatic stellate cell transdifferentiation involves genome-wide remodeling of the DNA methylation landscape. *J Hepatol* 2016; 64:661-673.

Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su A, Schook AB, Straume M, et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 2002; 109:307-320.

Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Brown GM, Spence DW, Bharti VK, Kaur C, et al. Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox Res* 2013; 23:267-300.

Park SJ, Im DS. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators and drug discovery. *Biomol Ther* 2017; 25:80-90.

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282:24131-24145.

Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med* 2018; S0098-2997(18)30070-0.

Patel AS, Lin L, Geyer A, Haspel JA, An CH, Cao J, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 2012; 7:e41394.

Pathil A, Muelle J, Ludwig M, Wang J, Warth A, Chamulitrat W, et al. Ursodeoxycholy l lysophosphatidylethanolamide attenuates hepatofibrogenesis. *Br J Pharmacol* 2014; 171:5113-5126.

Patsenker E, Schneider V, Ledermann M, Saegesser H, Dorn C, Hellerbrand C, et al. Potent antifibrotic activity of mTOR inhibitors sirolimus and everolimus but not of cyclosporine A and tacrolimus in experimental liver fibrosis. *J Hepatol* 2001; 55:388-398.

Pekovic-Vaughan V, Gibbs J, Yoshitane H, Yang N, Pathiranaige D, Guo B, et al. The circadian clock regulates rhythmic activation of the NRF2/glutathione-mediated antioxidant defense pathway to modulate pulmonary fibrosis. *Genes Dev* 2014; 28:548-560.

Perez-Tamayo R. Cirrhosis of the liver: a reversible disease? *Pathol Annu* 1979; 14:183-213.

Perricone C, De Carolis C, Perricone R. Glutathione: a key player in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2009; 8:697-701.

Perugorria MJ, Latasa MU, Nicou A, Cartagena-Lirola H, Castillo J, Goñi S, et al. The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis. *Hepatology* 2008; 40:1312-1321.

Pett JP, Kondoff M, Bordyugov G, Kramer A, Herzel H. Co-existing feedback loops generate tissue-specific circadian rhythms. *Life Sci Alliance* 2018; 1:e201800078.

Pietrocola F, Pol J, Vacchelli E, Rao S, Enot DP, Baracco EE, et al. Caloric restriction mimetics enhance anticancer immunosurveillance. *Cancer Cell* 2016; 30:147-160.

Piguet AC, Majumder S, Maheshwari U, Manjunathan R, Saran U, Chatterjee S, et al. Everolimus is a potent inhibitor of activated hepatic stellate cell functions *in vitro* and *in vivo*, while demonstrating anti-angiogenic activities. *Clin Sci* 2014; 126:775-784.

Pinzani M, Macias-Barragan J. Update on the pathophysiology of liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 4:459-472.

Piscaglia F, Siringo S, Hermida RC, Legnani C, Valgimigli M, Donati G, et al. Diurnal changes of fibrinolysis in patients with liver cirrhosis and esophageal varices. *Hepatology* 2000; 31:349-357.

Popper H, Elias H, Petty De. Vascular pattern of the cirrhotic liver. *Am J Clin Pathol* 1952; 22:717-729.

Powers HJ. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:1352-1360.

Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, et al. The orphan nuclear receptor rev-erba controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 2002; 110:251-260.

Pruett SH, Bushnev A, Hagedorn K, Adiga M, Haynes CA, Sullards MC, et al. Biodiversity of sphingoid bases («sphingosines») and related alcohols. *J Lipid Res* 2008; 49:1621-1639.

Pyne S, Adams DR, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinases in health and disease: recent advances. *Prog Lipid Res* 2016; 62:93-106.

Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Lehert P, Serfaty L, et al. Elafibranor, an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor- α and - β , induces resolution of nonalcoholic steatohepatitis without fibrosis worsening. *Gastroenterology* 2016; 150:1147-1159.

Recknagel RO, Glende EA, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 1989; 43:139-154.

Reiter FP, Wimmer R, Wottke L, Artmann R, Nagel JM, Carranza MO, et al. Role of interleukin-1 and its antagonism of hepatic stellate cell proliferation and liver fibrosis in the Abcb4(-/-) mouse model. *World J Hepatol* 2016; 8:401-410.

Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S, Manchester LC. Melatonin in plants. *Nutr Rev* 2001; 59:286-290.

Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: Biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; 50:1129-1146.

Reiter RJ, Tan DX, Tamura H, Cruz MH, Fuentes-Broto L. Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology: a review. *Gynecol Endocrinol* 2014; 30:83-89.

Reiter RJ. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: Antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 1995; 16:383-415.

Reiter RJ. Melatonin and human reproduction. *Ann Med* 1998; 30:103-108.

Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 79:153-158.

Reiter RJ. The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; 49:654-664.

Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418:935-941.

Rippe RA, Brenner DA. From quiescence to activation gene regulation in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004; 27:1260-1262.

Rivera J, Proia RL, Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:753-763.

Rockey DC. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* 2003; 37:4-12.

Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler C, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol* 2010; 47:72-78.

Rosenbloom J, Castro SV, Jimenez SA. Narrative review: fibrotic diseases: Cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med* 2010; 152:159-166.

Rosenbloom J, Mendoza FA, Jimenez SA. Strategies for anti-fibrotic therapies. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832:1088-1103.

Roussel BD, Kruppa AJ, Miranda E, Crowther DC, Lomas DA, Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol* 2013; 12:105-118.

Rowe IA. Lessons from epidemiology: the burden of liver disease. *Dig Dis* 2017; 35:304-309.

Rozov SV, Filatova EV, Orlov AA, Volkova AV, Zhloba AR, Blashko EL, et al. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine is a product of melatonin oxidation in rats. *J Pineal Res* 2003; 35:245-250.

Ruan GX, Gamble KL, Risner ML, Young LA, McMahon DG. Divergent roles of clock genes in retinal and suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *PLoS One* 2012; 7:e38985.

Rubin E, Lieber CS. Fatty liver, alcoholic hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates. *N Engl J Med* 1974; 290:128-135.

Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 2006; 443:780-786.

Ruckhäberle E, Kam T, Hanker L, Gätje R, Metzler D, Holtrich U, et al. Prognostic relevance of glucosylceramide synthase (GCS) expression in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncology* 2009; 135:81-90.

Rutherford A, Chung RT. Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. *Semin Liver Dis* 2008; 28:167-174.

Rutter J, Reick M, McKnight SL. Metabolism and the control of circadian rhythms. *Annu Rev Biochem* 2002; 71:307-331.

Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:6230-6234.

Saito A. Physiological functions of endoplasmic reticulum stress transducer OASIS in central nervous system. *Anat Sci Int* 2014; 89:11-20.

Sakata T, Watanabe N, Hobara N, Nagashima H. Chronic liver injury in rats inhaled carbon tetrachloride. *Bull Environ Contam Toxicol* 1987; 38:959-961.

Salguero PR, Roderfeld M, Hemmann S, Rath T, Atanasova S, Tschuschner A, et al. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Lab Invest* 2008; 88:1192-1203.

San-Miguel B, Crespo I, Kretzmann N, Mauriz JL, Marroni N, Tuñón MJ, et al. Glutamine prevents fibrosis development in rats with colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid. *J Nutr* 2010; 140:1065-1071.

San-Miguel B, Crespo I, Sánchez DI, González-Fernández B, Ortiz de Urbina JJ, Tuñón MJ, et al. Melatonin inhibits autophagy and endoplasmic reticulum stress in mice with carbon tetrachloride-induced fibrosis. *J Pineal Res* 2015; 59:151-162.

San-Miguel B, Crespo I, Vallejo D, Álvarez M, Prieto J, González-Gallego J, et al. Melatonin modulates the autophagic response in acute liver failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *J Pineal Res* 2014; 56:313-321.

Sánchez DI, González-Fernández B, San-Miguel B, Ortiz de Urbina J, Crespo I, González-Gallego J, et al. Melatonin prevents deregulation of sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signaling pathway in a mouse model of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *J Pineal Res* 2017; 62:e12369.

Sánchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem* 2004; 92:913-922.

Sanchez T. Sphingosine-1-phosphate signaling in endothelial disorders. *Curr Atheroscler Rep* 2016; 18:31.

Santos WL, Lynch KR. Drugging sphingosine kinases. *ACS Chem Biol* 2015; 10:225-233.

Sato K, Hall C, Glaser S, Francis H, Meng F, Alpini G. Pathogenesis of Kupffer cells in cholestatic liver injury. *Am J Pathol* 2016a; 186:2238-2247.

Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, Mogi C, Tomura H, Tosaka M, et al. Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. *J Neurochem* 2007; 103:2610-2619.

Sato M, Ikeda H, Uranbileg B, Kurano M, Saigusa D, Aoki J, et al. Sphingosine kinase-1, S1P transporter spinster homolog 2 and S1P2 mRNA expressions are increased in liver with advanced fibrosis in human. *Sci Rep* 2016b; 6:32119.

Savarino V, Mela GS, Zentilin P, Mansi C, Mele MR, Vigneri S, et al. Evaluation of 24-hour gastric acidity in patients with hepatic cirrhosis. *J Hepatol* 1996; 25:152-157.

Schibler U, Sassome-Corsi P. A web of circadian pacemakers. *Cell* 2002; 111:919-922.

Schiffer E, Housset C, Cacheux W, Wendum D, Desbois-Mouthon C, Rey C, et al. Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41:307-314.

Schnute ME, McReynolds MD, Kasten T, Yates M, Jerome G, Rains JW, et al. Modulation of cellular S1P levels with a novel, potent and specific inhibitor of sphingosine kinase-1. *Biochem J* 2012; 444:79-88.

Schoemaker MH, Rots MG, Beljaars L, Ypma AY, Jansen PL, Poelstra K, et al. PDGF-receptor beta-targeted adenovirus redirects gene transfer from hepatocytes to activated stellate cells. *Mol Pharm* 2008; 5:399-406.

Schröder M. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:862-894.

Schwalm S, Pfeilschifter J, Huwiler A. Sphingosine-1-phosphate: a Janus-faced mediator of fibrotic diseases. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831:239-250.

Shah R, Reyes-Gordillo K, Arellanes-Robledo J, Lechuga CG, Hernández-Nazara Z, Cotty A, et al. TGF-beta 1 up-regulates the expression of PDGF-beta receptor mRNA and induces a delayed PI3K, AKT and p70(S6K)-dependent proliferative response in activated hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2013; 37:1838-1838.

Shajari S, Laliena A, Heegsma J, Tuñón MJ, Moshage H, Faber KN. Melatonin suppresses activation of hepatic stellate cells through ROR α -mediated inhibition of 5-lipoxygenase. *J Pineal Res* 2015; 59:391-401.

Shen X, Tang Y, Yang R, Yu L, Fang T, Duan JA. The protective effect of Zizyphus jujube fruit on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in mice by anti-oxidative activities. *J Ethnopharmacol* 2009; 122:555-560.

Shetty A, Hsu JW, Manka PP, Syn WK. Role of the circadian clock in the metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2018; 63:3187-3206.

Shiloh R, Bialik S, Kimchi A. The DAPK family: a structure-function analysis. *Apoptosis* 2014; 19:286-297.

Shimizu S, Nagase C, y Kawai K. Accumulation and toxicity of carbon tetrachloride after repeated inhalation in rats. *Ind Health* 1973; 11:48-54.

Shin MO, Yoon S, Moon JO. The proanthocyanidins inhibit dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *Arch Pharm Res* 2010; 33:167-173.

Shinohara Y, Imajo K, Yoneda M, Tomeno W, Ogawa Y, Kirikoshi H, et al. Unfolded protein response pathways regulate Hepatitis C virus replication via modulation of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432:326-332.

Singh M, Mas P. A functional connection between the circadian clock and hormonal timing in Arabidopsis. *Genes* 2018; 9:e567.

Sir D, Chen WL, Choi J, Wakita T, Yen TS, Ou JH. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* 2008; 48:1054-1061.

Solt LA, Wang Y, Banerjee S, Hughes T, Kojetin DJ, Lundasen T, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature* 2012; 485:62-68.

Son G, Hines LN, Lindquist J, Schrum LW, Rippe RA. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in hepatic stellate cells blocks the progression of hepatic fibrosis. *Hepatology* 2009; 50:1512-1523

Song J, de Libero J, Wolf SE. Hepatic autophagy after severe burn in response to endoplasmic reticulum stress. *J Surg Res* 2014a; 187:128-133.

Song Y, Zhao Y, Wang F, Tao L, Xiao J, Yang C. Autophagy in hepatic fibrosis. *Biomed Res Int* 2014b; 2014:436242.

Soon RK, Feel HF. Stellate cell contraction: role, regulation, and potential therapeutic target. *Clin Liver Dis* 2008; 12:791-803.

Sorbara MT, Ellison LK, Ramjeet M, Travassos LH, Jones NL, Girardin SE, et al. The protein ATG16L1 suppresses inflammatory cytokines induced by the intracellular sensors Nod1 and Nod2 in an autophagy-independent manner. *Immunity* 2013; 39:858-873.

Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett* 2000; 476:55-57.

Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25:319-333.

Steindl PE, Ferenci P, Marktl W. Impaired hepatic catabolism of melatonin in cirrhosis. *Ann Intern Med* 1997; 127:494.

Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970; 18:315-333.

Sulli G, Rommel A, Wang X, Kolar MJ, Puca F, Saghatelian A, et al. Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence. *Nature* 2018; 553:351-355.

Summa KC, Jiang P, Fitzpatrick K, Voigt RM, Bowers SJ, Forsyth CB, et al. Chronic alcohol exposure and the circadian clock mutation exert tissue-specific effects on gene expression in mouse hippocampus, liver, and proximal colon. *Alcohol Clin Exp Res* 2015; 39:1917-1929.

Sun CK, Chen CH, Chang CL, Chiang HJ, Sung PH, Chen KH, et al. Melatonin treatment enhances therapeutic effects of exosomes against acute liver ischemia-reperfusion injury. *Am J Transl Res* 2017; 9:1543-1560.

Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, Ono Y, Ogiri Y, Kojo S. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1535:186-191.

Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Embo Rep* 2006; 7:880-885.

Tahan V, Ozaras R, Canbakan B, Uzun H, Aydin S, Yildirim B, et al. Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *J Pineal Res* 2004; 37:78-84.

Takabe K, Kim RH, Allegood JC, Mitra P, Ramachandran S, Nagahashi M, et al. Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2. *J Biol Chem* 2010; 285:10477-10486.

Takahashi JS, Hong H-K, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* 2008; 9:764-775.

Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2007; 9:1142-1151.

Takayanagi S, Fukuda R, Takweuchi Y, Tsukada S, Yoshida K. Gene regulatory network of unfolded protein response genes in endoplasmic reticulum stress. *Cell Stress Chap* 2013; 18:11-23.

Takuwa Y, Ikeda H, Okamoto Y, Takuwa N, Yoshioka K. Sphingosine-1-phosphate as a mediator involved in development of fibrotic diseases. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831:185-192.

Talloczy Z, Jiang W, Virgin HWT, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, et al. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99:190-195.

Tanaka Y, Sanchez LV, Sugiyama M, Sakamoto T, Kurbanov F, Tatematsu K, et al. Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfecting with genotype H in chimeric mice carrying human hepatocytes. *Virology* 2008; 376:408-415.

Taniguchi M, Kitatani K, Kondo T, Hashimoto-Nishimura M, Asano S, Hayashi A, et al. Regulation of autophagy and its associated cell death by "sphingolipid rheostat": reciprocal role of ceramide and sphingosine 1-phosphate in the mammalian target of rapamycin pathway. *J Biol Chem* 2012; 287:39898-39910.

Tao X, Sun X, Xu L, Yin L, Han X, Qi Y, et al. Total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit ameliorates hepatic ischemia/reperfusion. *Nutrients* 2016; 8:e418.

Taslidere E, Esrefoglu M, Elbe H, Cetin A, Ates B. Protective effects of melatonin and quercetin on experimental lung injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Exp Lung Res* 2014; 40:59-65.

Tatler AL, Jenkins G. Sphingosine-1-phosphate metabolism: can its enigmatic lyase promote the autophagy of fibrosis? *Thorax* 2015; 70:1106-1107.

Teocharis, SE, Margeli, AP, Skaltsas, SD, Spiliopoulou, CA, Koutselinis, AS. Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study. *Toxicology* 2001; 161:129-138.

Thoen LF, Guimaraes EL, Doll EL. A role for autophagy during hepatic stellate cell activation. *J Hepatol* 2011; 55:1355-1360.

Thomas M, Burk O, Klumpp B, Kandel BA, Damm G, Weiss TS, et al. Direct transcriptional regulation of human hepatic cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). *Mol Pharmacol* 2013; 83:709-718.

Thomes PG, Brandon-Warner E, Li T, Donohue TM, Schrum LW. Rev-erb agonist and TGF β similarly affect autophagy but differentially regulate hepatic stellate cell fibrogenic phenotype. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; 81(Pt A):137-147.

Tipoe GL, Leung TM, Liong EC, Lau TY, Fung ML, Nanji AA. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl₄)- induced liver injury in mice. *Eur J Nutr* 2010; 273:45-51.

Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 1998; 12:1812-1824.

Torok NJ. Dysregulation of redox pathways in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016; 311:667-674.

Touw D, Knox A, Smyth A. Population pharmacokinetics of tobramycin administered thrice daily and once daily in children and adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2007; 6:327-333.

Towers CG, Thorburn A. Therapeutic targeting of autophagy. *EBioMedicine* 2016; 14:15-23.

Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol* 2015; 62:15-24.

Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis* 1990; 10:56-65.

Tsukamoto H, Towner SJ, Ciofalo LM, French SW. Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology* 1986; 6:814-822.

Tumbarello DA, Waxse BJ, Arden SD, Bright NA, Kendrick-Jones J, Buss F. Autophagy-receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat Cell Biol* 2012; 14:1024-1035.

Túnez I, Muñoz MC, Medina FJ, Salcedo M, Feijóo M, Montilla P. Comparison of melatonin, vitamin E and L-carnitine in the treatment of neuro- and hepatotoxicity induced by thioacetamide. *Cell Biochem Funct* 2007; 25:119-127.

Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Vallejo D, Álvarez M, et al. Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res* 2013; 55:221-228.

Usui M, Yamaguchi S, Tanji Y, Tominaga R, Ishigaki Y, Fukumoto M, et al. Atf6 α -null mice are glucose intolerant due to pancreatic beta-cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. *Metabolism* 2012; 61:1118-1128.

Vallejo D, Crespo I, San-Miguel B, Álvarez M, Prieto J, Tuñón MJ, et al. Autophagic response in the rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet Res* 2014; 4:15.

van der Ree MH, van der Meer AJ, van Nuenen AC, de Bruijne J, Ottosen S, Janssen HL, et al. Miravirsen dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment Pharmacol Ther* 2016; 43:102-113.

Waldhauser F, Ehrhart B, Forster E. Clinical aspects of the melatonin action: Impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. *Experientia* 1993; 49:671-681.

Wan Y, Tang MH, Chen XC, Chen LJ, Wei YQ, Wang YS. Inhibitory effect of liposomal quercetin on acute hepatitis and hepatic fibrosis induced by concanavalin A. *Braz J Med Biol Res* 2014; 47:655-661.

Wang F, Zhang X, Wang J, Chen M, Fan N, Ma Q, et al. LGR4 acts as a link between the peripheral circadian clock and lipid metabolism in liver. *J Mol Endocrinol* 2014; 52:133-143.

Wang H, Wei W, Wang NP, Gui SY, Wu L, Sun WY, et al. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sci* 2005a; 77:1902-1915.

Wang T, Yang P, Zhan Y, Xia L, Hua Z, Zhang J. Deletion of circadian gene Per1 alleviates acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicology* 2013a; 314:193-201.

Wang X, Zhang DM, Gu TT, Ding XQ, Fan CY, Zhu Q, et al. Morin reduces hepatic inflammation-associated lipid accumulation in high fructose-fed rats via inhibiting sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 2013b; 86:1791-1804.

Wang XJ, Chamberlain M, Vassieva O, Henderson CJ, Wolf CR. Relationship between hepatic phenotype and changes in gene expression in cytochrome P450 reductase (POR) null mice. *Biochem J* 2005b; 388:857-867.

Wang Y, Kojetin D, Burris TP. Anti-proliferative actions of a synthetic REV-ERB α /beta agonist in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2015; 96:315-322.

Wang Y, Lv D, Liu W, Li S, Chen J, Shen Y, et al. Disruption of the circadian clock alters antioxidative defense via the SIRT1-BMAL1 pathway in 6-OHDA-induced models of Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018:4854732.

Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33:105-136.

Wu RN, Yu TY, Zhou JC, Li M, Gao HK, Zhao C, et al. Targeting HMGB1 ameliorates cardiac fibrosis through restoring TLR2-mediated autophagy suppression in myocardial fibroblasts. *Int J Cardiol* 2018; 267:156-162.

Wu Y, Li L, Wen T, Li YQ. Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology* 2007; 232:50-56.

Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214:199-210.

Xia P, Wadham C. Sphingosine 1-phosphate, a key mediator of the cytokine network: juxtacrine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22:45-53.

Xiang S, Mao L, Duplessis T, Yuan L, Dauchy R, Dauchy E, et al. Oscillation of clock and clock controlled genes induced by serum shock in human breast epithelial and breast cancer cells: regulation by melatonin. *Basic Clin Res* 2012; 6:137-150.

Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; 9:1102-1109.

Xiu L, Chang N, Yang L, Liu X, Yang L, Ge J, et al. Intracellular sphingosine 1-phosphate contributes to collagen expression of hepatic myofibroblasts in human liver fibrosis independent of its receptors. *J Biol Chem* 2015; 288:14839-14851.

Yagita K, Tamanini F, van Der Horst GT, Okamura H. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* 2001; 292:278-281.

Yamada A, Nagahashi M, Aoyagi T, Huang WC, Lima S, Hait NC, et al. ABCC1-exported sphingosine-1-phosphate, produced by sphingosine kinase 1, shortens survival of mice and patients with breast cancer. *Mol Cancer Res* 2018; 16:1059-1070.

Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, Bu S, Bielawska A, Bielawski J, et al. Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. *J Biol Chem* 2004; 279:53994-54001.

Yang KL, Chang WT, Hong MY, Hung KC, Chuang CC. Prevention of TGF- β -induced early liver fibrosis by a maleic acid derivative anti-oxidant through suppression of ROS, inflammation and hepatic stellate cells activation. *PLoS One* 2017; 12:e0174008.

Yang L, Yue S, Yang L, Liu X, Han Z, Zhang Y, et al. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis is involved in liver fibrosis-associated angiogenesis. *J Hepatol* 2013; 59:114-123.

Yao QY, Xu BL, Wang JY, Liu HC, Zhang SC, Tu CT. Inhibition by curcumin of multiple sites of the transforming growth factor-beta1 signaling pathway ameliorates the progression of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12:156.

Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J* 2007; 274:630-658.

Yoshida K, Matsuzaki K. Differential regulation of TGF- β /Smad signaling in hepatic stellate cells between acute and chronic liver injuries. *Front Physiol* 2012; 3:53.

Yu J, Wang Y, Qian H, Zhao Y, Liu B, Fu C. Polyprenols from *Tuxus chinensis* var. *mairei* prevent the development of CCl₄- induced liver fibrosis in rats. *J Ethnopharmacol* 2012; 142:151-60.

Yuza K, Nagahashi M, Shimada Y, Nakano M, Tajima Y, Kameyama, et al. Upregulation of phosphorylated-sphingosine kinase 1 expression in colitis-associated cancer. *J Surg Res* 2018; 231:323-330.

Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, Kimchi A. Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and BclXL. *Autophagy* 2009; 5:720-722.

Zardi EM, Navarini L, Sambataro G, Piccinni P, Sambataro FM, Spina C, et al. Hepatic PPARs: their role in liver physiology, fibrosis and treatment. *Curr Med Chem* 2013; 20:3370-3396.

Zeidan YH, Hannun YA. Translational aspects of sphingolipid metabolism. *Trends Mol Med* 2007; 13:327- 336.

Zhang D, Tong X, Nelson BB, Jin E, Sil J, Chamey N, et al. The hepatic BMAL1/AKT/ lipogenesis axis protects against alcoholic liver disease in mice via promoting PPAR α pathway. *Hepatology* 2018; doi:10.1002/hep.29878.

Zhang F, Zhang Z, Chen L, Kong D, Zhang X, Lu C, et al. Curcumin attenuates angiogenesis in liver fibrosis and inhibits angiogenic properties of hepatic stellate cells. *J Cell Mol Med* 2014; 18:1392-1406.

Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res* 2014; 57:131-146.

Zhang L, Urtz N, Gaertner F, Legate KR, Petzold T, Lorenz M, et al. Sphingosine kinase 2 (Sphk2) regulates platelet biogenesis by providing intracellular sphingosine 1-phosphate (S1P). *Blood* 2013; 122:791-802.

Zhang L, Wang A. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. *Front Plant Sci* 2012; 3:293.

Zhang X, Ritter JK, Li N. Sphingosine-1-phosphate pathway in renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2018; 315:752-756.

Zhang Y, Fang B, Emmett MJ, Damle M, Sun Z, Feng D, et al. Discrete functions of nuclear receptor Rev-erb α couple metabolism to the clock. *Science* 2015; 348:1488-1492.

Zhao S, Zhang Z, Yao Z, Shao J, Chen A, Zhang F, et al. Tetramethylpyrazine attenuates sinusoidal angiogenesis via inhibition of hedgehog signaling in liver fibrosis. *IUBMB Life* 2017; 69:115-127.

Zhao Y, Ma X, Wang J, Zhu Y, Li R, Wang J, et al. Paeoniflorin alleviates liver fibrosis by inhibiting HIF-1 α through mTOR-dependent pathway. *Fitoterapia* 2014; 99:318-327.

Zhao Z, Ni D, Ghozalli I, Pirooz SD, Ma B, Liang C. UVRAG: at the crossroad of autophagy and genomic stability. *Autophagy* 2012; 8:1392-1393.

Zheng Z, Zeng YZ, Ren K, Zhu X, Tan Y, Li Y, et al. S1P promotes inflammation-induced tube formation by HLECs via the S1PR1/NF- κ B pathway. *Int Immunopharmacol* 2018; 23:224-225.

Zhou D, Wang Y, Chen L, Jia L, Yuan J, Sun M, et al. Evolving roles of circadian rhythms in liver homeostasis and pathology. *Oncotarget* 2016; 7:8625-8639.

Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20:7312-7324.

Zhu J, Li C, Gong C, Li X. Regulation of Pol II Pausing Is Involved in Daily Gene Transcription in the Mouse Liver. *J Biol Rhythms* 2018; 33:350-362.

Zigmond E, Samia-Grinberg S, Pasmanik-Chor M, Brazowski E, Shibolet O, Halpern Z, et al. Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *J Immunol* 2014; 193:344-353.

Zois CD, Baltayiannis GH, Karayiannis P, Tsianos EV. Systematic review: Hepatic fibrosis - regression with therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28:1175-1187.