



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nous mecanismes moleculars i noves estratègies terapèutiques per a la conservació de la funció hepàtica en la malaltia crònica del fetge i la lesió hepàtica aguda

Bernat Córdoba Jover

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

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

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



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



**NOUS MECANISMES MOLECULARS I NOVES ESTRATÈGIES
TERAPÈUTIQUES PER A LA CONSERVACIÓ DE LA FUNCIÓ HEPÀTICA EN LA
MALALTIA CRÒNICA DEL FETGE I LA LESIÓ HEPÀTICA AGUDA**

Memòria de tesi doctoral presentada per

Bernat Córdoba Jover

Per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Dirigida per

Dr. Manuel Morales Ruiz

Universitat de Barcelona

Hospital Clínic de Barcelona

Fundació de Recerca Clínic Barcelona-IDIBAPS (FRCB-IDIBAPS)

Grup de Recerca translacional en noves estratègies terapèutiques
i diagnòstiques en malalties hepàtiques

Programa de Doctorat en Medicina i Recerca Translacional
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona

Gener 2024

AGRAÏMENTS

Agraïr al Dr. Manuel Morales l'oportunitat de participar en els seus projectes de recerca i la seva direcció i tutela en aquesta tesi. També al Jordi i la Irene, el postdoc i la predoc (en el temps que vaig estar al lab) de l'equip amb els quals hem treballat plegats per tirar endavant tots els projectes del grup i que sense la seva ajuda aquesta tesi no hagués estat possible. Sempre recordaré els moments al laboratori compartits amb vosaltres, moltes gràcies de veritat!!

També agrair a la Meritxell, la Sílvia, la Laura, el Santi, el Guillermo, el Gregori, el Pedro i el Dr. Wladimiro Jimenez el seu suport i acompanyament durant aquests anys de recerca que hem compartit.

Per altra banda, tampoc hagués pogut acabar aquesta tesi sense el suport incondicional de la meua parella, família i amics que m'han acompanyat al llarg de tota aquesta etapa que ara s'acaba.

Contingut

AGRAÏMENTS.....	5
ABREVIATURES I ACRÒNIMS	8
Llista d'abreviatures i acrònims	9
ARTICLES QUE COMPONEN LA TESI	12
Enumeració d'articles que componen la Tesi	13
INTRODUCCIÓ	14
1. El Fetge	15
1.1. Aspectes generals	15
1.1.1. Tipus cel·lulars del fetge	15
1.1.2. Estructura del fetge	17
1.1.3. La matriu extracel·lular.....	18
1.1.4. El lobulet hepàtic.....	21
1.1.5. Funcions	22
2. Lesió hepàtica induïda per fàrmacs	23
2.1. Patrons clinicopatològics del dany hepàtic induït per fàrmacs.....	24
2.2. Efecte de l'acetaminofè	25
3. Malalties cròniques del fetge	27
3.1. Procés de cronificació en la malaltia hepàtica: La Fibrosi Hepàtica.....	27
3.1.1. Aspectes generals de la fibrosi hepàtica	27
3.1.2. Participació dels diferents tipus cel·lulars implicats en la fibrosi hepàtica.....	28
3.1.2.1. Mort cel·lular i apoptosi dels hepatòcits.....	28
3.1.2.2. Activació de les cèl·lules hepàtiques estrellades.....	29
3.1.2.2.1. El factor de transcripció nuclear 20.....	31
3.1.2.2.1.1. Relació entre Tcf20 i les malalties neuronals	31
3.1.2.3. Activació dels macròfags al fetge	32
3.1.2.4. Participació d'altres tipus cel·lulars.....	33
3.2. Regressió de la fibrosi hepàtica	34
3.3. Indicadors de la fibrosi hepàtica	34
3.3.1. NAFLD-FS	35
3.3.2. APRI	36
3.3.3. FIB-4	36
3.3.4. ELF	37

3.3.5. HFS.....	37
3.3.6. Precisió dels diferents indicadors de fibrosi.....	38
4. Tractament de la lesió hepàtica i la malaltia crònica del fetge.....	39
5. La regeneració hepàtica.....	41
5.1. Hepatectomia Parcial.....	42
5.2. Mecànica i fases de la regeneració hepàtica	43
5.2.1. Inici de la regeneració hepàtica: proliferació d'hepatòcits i colangiòcits..	43
5.2.2. Proliferació dels altres tipus cel·lulars del fetge.....	45
5.2.2.1. Cèl·lules endotelials.....	45
5.2.2.2. Cèl·lules estrellades hepàtiques	45
5.2.2.3. Cèl·lules de Kupffer	45
5.2.3. Finalització de la regeneració hepàtica	46
5.2.4. Resum de les principals vies de senyalització que participen en la regeneració hepàtica.....	47
5.3. L'estrès oxidatiu i les espècies reactives d'oxigen en la regeneració hepàtica	48
6. Nanopartícules com a tractament	49
6.1. Ús de nanopartícules en biomedicina.....	49
6.2. L'òxid de ceri	50
HIPÒTESIS.....	53
Hipòtesi 1.....	54
Hipòtesi 2.....	54
OBJECTIUS	55
1. Objectiu 1: Anàlisi de l'efecte de les CeO ₂ NPs en la regeneració hepàtica	56
1.1. Subobjectius	56
2. Objectiu 2: Anàlisi de la deficiència de <i>Tcf20</i> en ratolins i humans.....	56
2.1. Subobjectius	56
MATERIALS, MÈTODES, RESULTATS	57
RESUM ESTRUCTURAT PRIMER ARTICLE	58
RESUM ESTRUCTURAT SEGON ARTICLE	79
DISCUSSIÓ	121
1. Discussió	122
CONCLUSIONS	133
BIBLIOGRAFIA.....	136

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

Llista d'abreviatures i acrònims

- **α -SMA:** Actina del múscul llis.
- **ADAMs:** Família de les metal·loproteïnases A-desintegrina.
- **ADAMTSs:** Família de les metal·loproteïnases A-desintegrina amb motiu trombospondina.
- **ADN:** Àcid desoxiribonucleic.
- **ALT:** Alanina aminotransferasa.
- **APAP:** Acetaminofè, N-acetil-para-aminofenol.
- **APRI:** Sigles en anglès de l'indicador de fibrosi hepàtica de l'índex de la ratio d'AST entre el recompte de plaquetes.
- **ARN:** Àcid ribonucleic.
- **AST:** Aspartat aminotransferasa.
- **ATP:** Trifosfat d'adenosina.
- **BIL:** Bilirubina.
- **CCl₄:** Tetraclorur de carboni.
- **CeO₂:** Òxid de Ceri.
- **CeO₂NPs:** Nanopartícules d'òxid de ceri. Objecte d'estudi d'aquesta tesi doctoral.
- **CH:** Cirrosi, cirròtic.
- **COL1A1:** pèptid precursor de col·lagen alfa 1.
- **COL1A2:** pèptid precursor de col·lagen alfa 2.
- **CT:** Control.
- **CYP450:** Citocrom P450.
- **DAMPs:** Patrons moleculars associats al perill (en les seves sigles en anglès).
- **DI:** Discapacitat intel·lectual.
- **DILI:** Dany hepàtic induït per fàrmacs (en les seves sigles en anglès).
- **ECM:** Matriu extracel·lular (en les seves sigles en anglès).
- **ELF:** Sigles en anglès de l'indicador de fibrosi hepàtica anomenat *Enhanced Liver Fibrosis*.
- **EGF:** Factor de creixement epidèrmic.
- **EGFR:** Receptor del factor de creixement epidèrmic.

- **Ets:** Factor de transcripció E26-1.
- **FA:** Fosfatasa alcalina.
- **FIB-4:** Indicador de fibrosis anomenat Índex Fibrosis 4.
- **GRX:** Cèl·lules hepàtiques estrellades de ratolí.
- **HFS:** Indicador de fibrosis Hepamet.
- **HGF:** Factor de creixement d'hepatòcits.
- **HSC:** Cèl·lules hepàtiques estrellades.
- **IκB:** Inhibidor de NFκB.
- **IKK:** IκB-quinasa, inhibidor de IκB.
- **KCs:** Cèl·lules de Kupffer (en les seves sigles en anglès).
- **LSECs:** Cèl·lules endotelials sinusoidals (en les seves sigles en anglès).
- **MMPs:** Família de Metal·loproteïnases de la Matriu extracel·lular.
- **NAC:** N-acetil-cisteïna.
- **NAPQI:** N-acetil-p-benzoquinona imina.
- **NAFLD:** Sigles en anglès de malaltia del fetge gras no alcohòlica.
- **NAFLD-FS:** sigles en anglès de l'indicador de fibrosis de la malaltia del fetge gras no alcohòlica.
- **NFκB:** via de senyalització del factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades.
- **NPs:** Nanopartícules.
- **Nrf2:** Factor nuclear E2 relacionat amb el factor 2.
- **PDGF:** Factor de creixement derivat de plaquetes.
- **PDGFR:** Receptor del factor de creixement derivat de plaquetes.
- **PHx:** Hepatectomia parcial.
- **RDN:** Retard en el desenvolupament neurològic.
- **ROS:** Espècies reactives d'oxigen.
- **SOD:** enzim superòxid dismutasa.
- **SPBP:** Stromelysin-1 platelet-derived growth factor-responsive element-binding protein. És el primer nom en anglès que se li va donar a TCF20.
- **Sp1:** Factor de transcripció proteïna d'especificitat 1.
- **TCF20:** Factor de transcripció nuclear 20. Objecte d'estudi d'aquesta tesi doctoral.

- **Tcf20**: Gen del factor de transcripció nuclear 20. Objecte d'estudi d'aquesta tesi doctoral.
- **Tcf20^{+/+}**: Indica genotip homozigot de TCF20, sense cap deficiència d'aquesta proteïna.
- **Tcf20^{+/-}**: Indica genotip heterozigot per la deficiència parcial de TCF20.
- **Tcf20^{-/-}**: Indica genotip homozigot per la deficiència total de TCF20.
- **TEA**: Trastorn de l'espectre autista.
- **TEM**: Microscopia de transmissió electrònica (en les seves sigles en anglès).
- **TGFβ**: Factor de creixement transformador β.
- **TIMPs**: Família d'inhibidors de metal·loproteïnases.
- **TNFα**: Factor de necrosis tumoral α.
- **VEGF**: Factor de creixement de l'endoteli vascular.
- **VEGFR**: Receptor del factor de creixement de l'endoteli vascular.

ARTICLES QUE COMPONEN LA TESI

Enumeració d'articles que componen la Tesi

Tesi en format de compendi de publicacions.

Aquesta tesi consta de **2 objectius i 2 articles**.

Objectiu 1: Anàlisi de l'efecte de les CeO₂NPs en la regeneració hepàtica.

Article 1:

Córdoba-Jover B, Arce-Cerezo A, Ribera J, Pauta M, Oró D, Casals G, Fernández-Varo G, Casals E, Puentes V, Jiménez W, Morales-Ruiz M. Cerium oxide nanoparticles improve liver regeneration after acetaminophen-induced liver injury and partial hepatectomy in rats. *J Nanobiotechnology*. 2019 Oct 31;17(1):112. doi: 10.1186/s12951-019-0544-5. PMID: 31672158; PMCID: PMC6822381. Factor d'impacte (JCR 2019): 5,345; Quartil: Q1.

Objectiu 2: Anàlisi de la deficiència de TCF20 en ratolins i humans.

Article 2:

Córdoba-Jover B, Ribera J, Portolés I, Lecue E, Rodriguez-Vita J, Pérez-Sisqués L, Mannara F, Solsona-Vilarrasa E, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Casals G, Rodríguez-Reventa L, Álvarez-Mora MI, Arteché-López A, Díaz de Bustamante A, Calvo R, Pujol A, Azkargorta M, Elortza F, Malagelada C, Pinyol R, Huguet-Pradell J, Melgar-Lesmes P, Jiménez W, Morales-Ruiz M. Tcf20 deficiency is associated with increased liver fibrogenesis and alterations in mitochondrial metabolism in mice and humans. *Liver Int*. 2023 Aug;43(8):1822-1836. doi: 10.1111/liv.15640. Epub 2023 Jun 14. PMID: 37312667. Factor d'impacte (JCR 2022): 8.754; Quartil: Q1.

INTRODUCCIÓ

1. El Fetge

1.1. Aspectes generals

El fetge és un dels òrgans interns més grans i, degut a les seves funcions essencials, també és un dels més importants del cos humà. Amb una massa d'entre 1.300 i 1.700 grams, aproximadament el 2% del pes d'un adult, el fetge està ubicat al costat dret de la part superior de l'abdomen, sota el diafragma, i presenta una irrigació sanguínia peculiar (1,2). Concretament, rep subministrament sanguini de dues fonts principals:

- El 75% de la irrigació ve de la **Vena Porta**, amb sang provinent de l'estómac, els intestins, el pàncrees i la melsa. Aquesta es caracteritza per ser rica en nutrients però a la vegada tenir una baixa concentració d'oxigen. També transporta altres agents tòxics provinents del procés de digestió que seran filtrats pel fetge.
- El 25% restant ve de l'**Artèria Hepàtica**, amb sang provinent de l'artèria aorta que conté una composició sistèmica de nutrients i oxigen.

La sang provinent d'ambdues fonts s'acaba barrejant al sinusoides hepàtic abans de tornar a la circulació mitjançant la **Vena Hepàtica** (3).

1.1.1. Tipus cel·lulars del fetge

El fetge consta de diferents tipus de cèl·lules, algunes d'elles úniques d'aquest òrgan com els hepatòcits i els colangiòcits, mentre que d'altres es troben també en altres òrgans i teixits tot i que en el fetge, degut a les seves funcions, arquitectura i particularitats, poden presentar un grau d'especialització que les fa lleugerament diferents a les seves homòlogues d'altres òrgans (1).

Els principals tipus cel·lulars del fetge són:

- **Hepatòcits:** són les principals cèl·lules del fetge, tenen forma polièdrica i només es troben en aquest òrgan. Representen al voltant del 80% del volum del fetge i estan polaritzats (1,4); la part sinusoidal de la seva membrana presenta microvellositats per afavorir l'intercanvi entre la sang i la cèl·lula.
- **Cèl·lules endotelials sinusoidals (LSECs):** Es troben per sobre dels hepatòcits formant la superfície del sinusoides i presenten una fenestració característica que les diferencia de la resta de l'endoteli vascular (5). Aquesta fenestració permet el flux de components entre la sang i els hepatòcits (6). L'espai entre aquestes cèl·lules i els hepatòcits s'anomena Espai de Disse.
- **Cèl·lules hepàtiques estrellades (HSCs):** es troben ubicades al sinusoides hepàtic, concretament a l'Espai de Disse. Tenen diverses funcions entre les quals destaquen el metabolisme de la vitamina A i la síntesi, secreció i degradació de diferents components de la matriu extracel·lular del sinusoides. S'anomenen "estrellades" degut les projeccions citoplasmàtiques que presenten i que li donen aquesta forma. Representen entre un 5% i un 8% del total de cèl·lules del fetge (7,8).
- **Cèl·lules de Kupffer (KCs):** Són els macròfags residents del fetge i es troben ubicats al sinusoides, en més proporció a les zones periportals. S'encarreguen d'eliminar substàncies no desitjades (cèl·lules mortes, bacteris, etc.) de la sang mitjançant la fagocitosi (9,10).
- **Cèl·lules endotelials limfàtiques:** formen part de l'estructura dels vasos limfàtics que arriben al sinusoides hepàtic i participen en la mobilització de les cèl·lules immunes al fetge i en el metabolisme de greixos (11).

- **Colangiòcits:** Són l'altre tipus cel·lular únic del fetge i corresponen entre el 3% i el 5% del total de cèl·lules hepàtiques. Formen l'epiteli del sistema biliar per on circula la bilis. Aquestes cèl·lules mitjançant les seves secrecions tenen la capacitat de modificar-ne la composició (12).

1.1.2. Estructura del fetge

Encara que en moltes espècies el fetge és un òrgan multilobular (més de dos lòbuls), en el cas dels humans consta de dos lòbuls principals, el lòbul dret i el lòbul esquerre, que es troben separats pel lligament falciforme, un plec que uneix el fetge amb la paret abdominal anterior i el diafragma (2). El lòbul dret se subdivideix a la vegada en dos més: el lòbul caudat, ubicat a la zona anterior intermèdia entre els dos lòbuls principals; i el lòbul quadrat, ubicat a la zona inferior del lòbul dret (2) (Fig. 1A).

A més, en humans també està definida una divisió funcional dels lòbuls del fetge en segments. Aquesta segmentació es basa en la distribució anatòmica de la irrigació en el fetge que permet dividir-lo en 8 segments, cadascun d'ells amb irrigació vascular i biliar independent (13) (Fig. 1B).

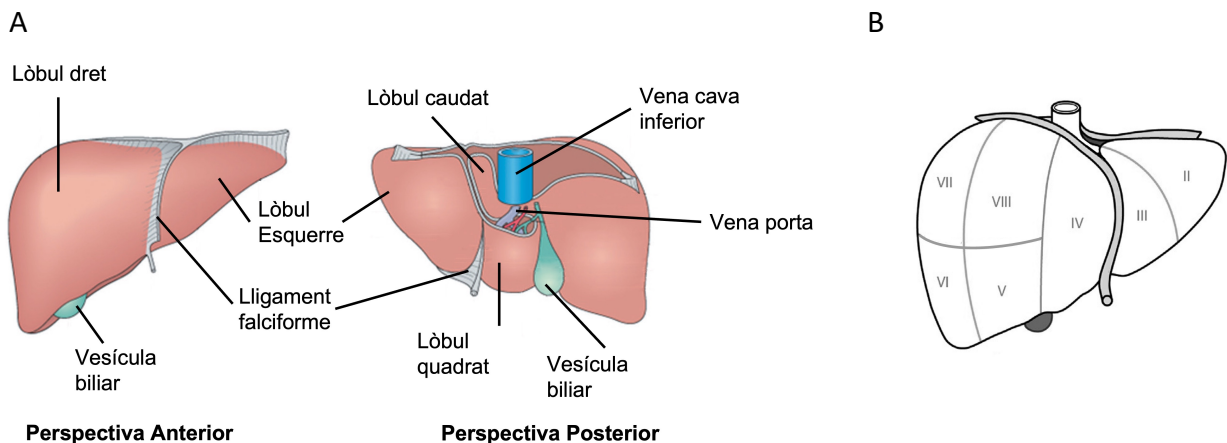


Figura 1. Estructura del fetge. A) Lòbuls i altres elements que integren el fetge. A la figura s'indica l'ubicació dels diferents lòbuls del fetge així com altres parts de la seva estructura des d'ambdues perspectives de l'òrgan, anterior i posterior. Imatge adaptada de Qin et al., 2018 (14). **B) Divisió funcional del fetge en segments.** El segment # I no es veu a la imatge ja que correspon al lòbul caudat que es troba a la part posterior. Imatge adaptada de Kruepunga et al., 2019 (13).

1.1.3. La matriu extracel·lular

La matriu extracel·lular (ECM) és l'encarregada de proporcionar el suport estructural a cèl·lules, teixits i òrgans. Es tracta d'una xarxa tridimensional formada per diferents proteïnes com ara col·làgens, proteoglicans, elastines i laminines, entre altres. Té unes funcions molt significatives en la senyalització i comunicació entre cèl·lules, així com en la seva estructura i morfologia condicionant així també la dels teixits i òrgans (15). Els proteoglicans consisteixen en nuclis proteics associats a glicosaminoglicans com per exemple l'heparina, el sulfat d'heparà o la condroitina. Aquests conformen una xarxa estructural amb les proteïnes fibroses de la ECM (16). Els col·làgens són les proteïnes fibroses més abundants de la ECM i se n'han identificats fins a 28 tipus. Tots ells comparteixen una mateixa estructura bàsica conformada per una triple hèlix α amb més o menys repeticions del domini Glicina-X-Y on "X" acostuma a ser una Prolina i "Y" una Hidroxiprolina. El que permet diferenciar-los són els altres dominis que conformen la seva estructura i les diferents funcions que tenen. Això permet classificar els 28 tipus en 6 grups (17):

- Els **col·làgens fibril·lars**: aquest grup el componen els col·làgens tipus I, II, III, V, XI, XXIV i XXVII i es caracteritzen per la seva capacitat d'agregació i ser la base de les estructures supramoleculares que formen; les fibril·les i les fibres de col·lagen.
- Els **col·làgens formadors de xarxes**: aquest grup el componen els col·làgens tipus IV, VI, VII, VIII i X. En comptes d'agregar-se en forma de fibril·la ho fan en forma de xarxa.
- Els **col·làgens associats a col·làgens fibril·lars**: aquest grup el componen els col·làgens tipus IX, XII, XIV, XIX, XX, XXI, XXII i sempre es troben complementant les estructures formades pels col·làgens fibril·lars aportant propietats addicionals.
- Els **col·làgens de transmembrana**: aquest grup el componen els col·làgens tipus XIII, XVII, XXIII i XXV i en la seva estructura proteica contenen un domini transmembrana.
- Els **col·làgens multiplexins**: aquest grup el componen els col·làgens tipus XV, XVI i XVIII i una part de la seva estructura pot ser escindida i funcionar com a lligand de receptors cel·lulars.

- La **resta de col·làgens** que no es poden incloure en cap de les 5 classificacions anteriors: són els col·làgens tipus XXVI, XXVIII.

A la ECM del fetge, el grup majoritari és el dels **col·làgens fibril·lars** sent els tipus I, III i V els més abundants, es troben ubicats principalment a l'espai de Disse, al tracte portal i a les parets de la vena central (16). Aquests col·làgens són produïts per fibroblasts i la seva funció principal és donar suport estructural juntament amb el col·lagen tipus IV que és el tipus predominant del grup dels col·làgens formadors de xarxa i que també afavoreix la difusió de molècules entre la sang i el fetge. El col·lagen tipus IV és produït per les cèl·lules endotelials i les hepàtiques estrellades quiescents i es troba ubicat a les parets del sinusoides formant xarxes amb laminines (16,17).

Per altra banda, també hi ha enzims que participen en la remodelació d'aquesta matriu segons la situació fisiològica de l'òrgan donant un caràcter dinàmic a la ECM. Dins d'aquests enzims que regulen l'homeòstasi de la ECM podem trobar tres grans famílies (15,18):

- La de les metal·loproteïnases de la matriu (MMPs).
- La de les metal·loproteïnases A-desintegrina (ADAMs).
- La de les metal·loproteïnases A-desintegrina amb motiu trombospondina (ADAMTSs).

La majoria d'aquests enzims són secretats per les cèl·lules però alguns també poden trobar-se a la membrana de les mateixes (15). D'aquestes 3 famílies, les MMPs són les principals encarregades de la degradació del col·lagen tot i que moltes d'elles no actuen només sobre el col·lagen si no que també tenen capacitat catalítica sobre altres components de la ECM com per exemple l'elastina, la gelatina, la laminina o altres proteïnes diferents al col·lagen (19). Aquestes es poden agrupar segons la seva especificitat per un tipus de substrat i per tant podem trobar (19,20):

- Col·lagenases (MMP-1, -8, -13) : Són les principals encarregades de la degradació dels col·làgens fibril·lars tipus I, II i III.
- Gelatinases (MMP-2, -9): Són les principals encarregades de la degradació de gelatines i del col·lagen tipus IV.
- Estromelisines (MMP-3, -10, -11): Poden degradar col·lagen tipus IV i altres substrats com laminines i elastases.
- Matrilisines (MMP-7, -26): presenten activitat catalítica sobre una gran varietat de substrats.
- Metal·loproteïnes de membrana (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25): a l'estar a la membrana cel·lular aporten activitat proteolítica a nivell pericel·lular.
- Altres Metal·loproteïnes (MMP-12, -19, -20, -21, -22, -23, -27, -28): no encaixen en cap dels grups anteriors

Finalment també hi ha una sèrie de molècules que funcionen com a inhibidors d'aquests enzims. Són els inhibidors de metal·loproteïnases (TIMPs) i els més importants són TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4, sent els dos primers els que més s'expressen al fetge (21). No presenten una especificitat concreta ja que un mateix TIMP pot inhibir metal·loproteïnases diferents (19).

En condicions patològiques, l'equilibri de tota aquesta orquestra d'elements (components de la matriu, enzims i inhibidors d'aquests) de la matriu extracel·lular es veu afectat ja que al activar-se les cèl·lules hepàtiques estrellades i adquirir un fenotip de fibroblast, aquestes incrementen l'expressió de components de la matriu, sobretot de col·làgens fibril·lars per substituir teixit danyat i també incrementen l'expressió de TIMPs la qual cosa inactiva les metal·loproteïnases fent que aquestes no puguin degradar l'excés d'ECM, afectant així la homeòstasi de la matriu extracel·lular (21).

1.1.4. El lobulel hepàtic

El lobulel hepàtic és la unitat estructural i funcional del fetge. Es tracta d'una agrupació d'hepatòcits en forma hexagonal per la zona central de la qual hi passa una vena principal o també anomenada vena central. Normalment aquestes agrupacions hexagonals estan separades entre sí per teixit connectiu. Els hepatòcits hi estan disposats en forma de cordó, i entre aquests cordons hi ha el sinusoides hepàtic, un espai vascular amb un endoteli fenestrat prim (1,2) format per les cèl·lules endotelials sinusoidals. El sinusoides connecta els extrems del lobulel, on hi arriben les tríades portals formades per ramificacions del conducte biliar, la vena porta i l'artèria hepàtica, amb la vena principal o central del lobulel hepàtic, la qual és una ramificació de la vena hepàtica que desemboca a la vena cava (Fig. 2).

La sang rica en oxigen, nutrients i hormones arriba per l'artèria hepàtica i la vena porta, entra per la perifèria del lobulel hepàtic, anomenada zona periportal, i passa pel sinusoides, on es dona l'intercanvi de molècules i altres nutrients amb els hepatòcits, fins arribar a la zona pericentral on hi ha la ramificació de la vena hepàtica.

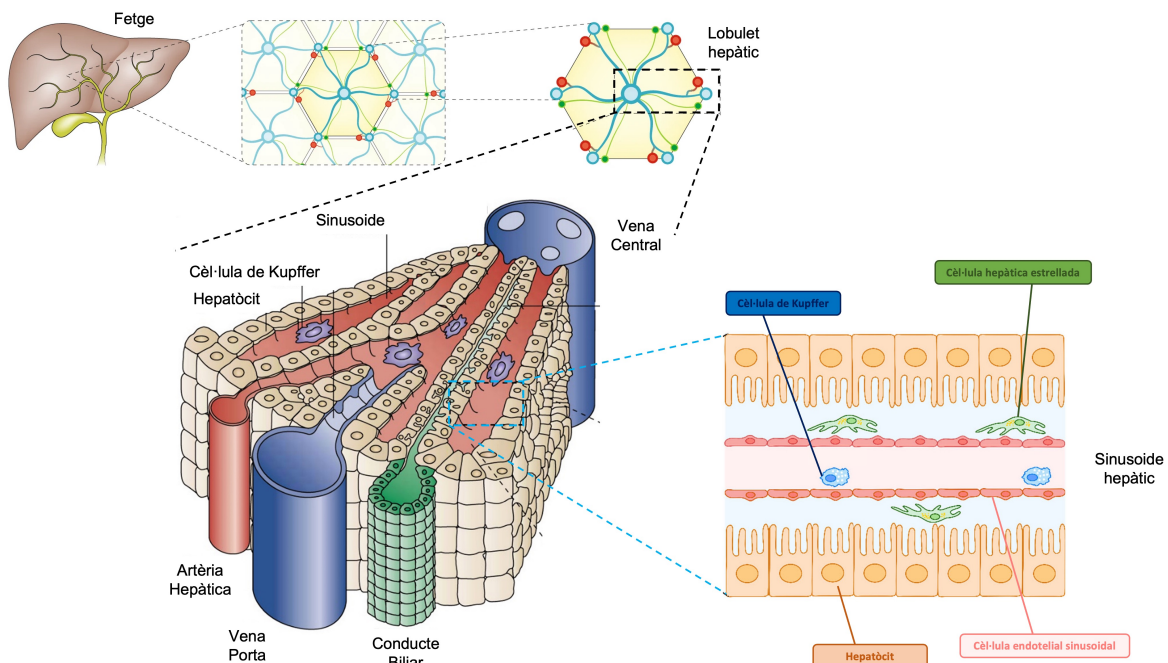


Figura 2. Estructura del fetge: el lobulel hepàtic i el sinusoides hepàtic. Figura obtinguda a partir de la combinació de diferents imatges adaptades de Du et al., 2018 (22), Ben-Moshe et al., 2019 (23) i Gibert-Ramos et al., 2021 (24).

1.1.5. Funcions

Explicar de forma exhaustiva les múltiples funcions del fetge no és objecte d'aquesta tesi però sí que és interessant destacar-ne les principals. Com ja s'ha comentat anteriorment, el fetge és un dels òrgans més importants del cos humà degut a les funcions que permeten el manteniment de l'homeòstasi. Algunes de les més importants són les següents (1):

- Síntesis de bilis i altres enzims digestius.
- Metabolisme de proteïnes, lipoproteïnes i síntesi de factors de coagulació.
- Emmagatzematge de múltiples substàncies com glucogen i vitamines.
- Metabolisme de compostos nitrogenats.
- Detoxificació: degradació de substàncies nocives per l'organisme.
- Metabolisme de lípids.
- Metabolisme de carbohidrats.
- Funció eritropoyètica en etapes fetals
- Homeòstasi, control d'infeccions i regulació de la temperatura corporal.

2. Lesió hepàtica induïda per fàrmacs

El fetge és l'òrgan responsable del metabolisme de la majoria de substàncies químiques que ingerim. Aquestes són absorbides al tracte gastrointestinal i transportades per la sang fins al fetge on els hepatòcits, mitjançant la seva absorció, detoxificació i posterior secreció, s'encarreguen del seu metabolisme. El principal complex enzimàtic que s'encarrega del metabolisme dels fàrmacs al fetge és el Citocrom P450 (CYP450) que consisteix majoritàriament d'hidrolases, oxidases i reductases. Aquests enzims es troben ubicats al reticle endoplasmàtic i als mitocondris dels hepatòcits. Una de les seves principals funcions és transformar el fàrmac en la seva forma soluble per facilitar-ne l'eliminació (25). Normalment, els elements de baix pes molecular i més solubles són filtrats i secretats directament pels ronyons a través de l'orina, però els elements de major pes molecular són metabolitzats pel fetge abans de ser secretats, ja sigui a través de la bilis i la femta o l'orina (2). Tenint en compte aquest procés, una lesió hepàtica induïda per fàrmacs (DILI, en les seves sigles en anglès) és aquella en la que el dany hepàtic és causat per l'exposició a una substància que danya el fetge.

Es coneixen diferents substàncies o fàrmacs que poden provocar una lesió hepàtica greu, com per exemple l'acetaminofè (paracetamol) (26) o l' α -amanitina (produïda per un fong) (27) que per les seves característiques farmacològiques i en funció de la dosi ingerida són tòxiques pel fetge i provoquen una lesió hepàtica més o menys significativa, ja que en molts casos hi ha una relació dosi-depenent.

Per altra banda però, existeixen moltes altres substàncies que també poden acabar provocant una lesió hepàtica tot i que en un principi la seva farmacologia i els estudis de toxicitat realitzats fins al moment no indiquessin aquesta possibilitat. En aquests casos es parla de dany hepàtic idiosincràtic ja que la toxicitat d'aquests fàrmacs no es podia predir amb antelació. El DILI idiosincràtic és la conseqüència d'una interacció de diferents factors de l'individu afectat, com per exemple la presència d'altres patologies o la seva genètica, amb característiques del fàrmac o del tractament emprat com podrien ser el seu metabolisme, la duració de la teràpia o la dosi utilitzada (28).

El DILI també és la causa que molts fàrmacs no acabin arribant al mercat ja que són descartats per les pròpies empreses que investiguen el seu desenvolupament o per les autoritats reguladores com la EMA o la FDA degut als indicis d'hepatotoxicitat que presenten. Gràcies a la farmacovigilància, també hi ha hagut casos de retirada de fàrmacs del mercat degut a que posteriorment s'ha detectat DILI idiosincràtic d'un fàrmac en un nombre reduït de pacients (2).

2.1. Patrons clinicopatològics del dany hepàtic induït per fàrmacs

El DILI pot afectar el fetge de diferents formes i seguir un patró de dany o un altre segons el fàrmac i la dosi ingerida. Els diferents patrons de dany hepàtic amb les característiques que els distingeixen (2) són els següents:

- **Hepatocel·lular:** La majoria de fàrmacs que provoquen DILI segueixen aquest patró de lesió hepàtica. Molt poques vegades són casos severos. En aquests casos s'observen nivells cinc vegades superiors als fisiològics d'alanina aminotransferasa (ALT) i d'aspartat aminotransferasa (AST) en el sèrum dels pacients mentre que els nivells de fosfatasa alcalina (FA) es mantenen normals i els de Bilirubina (BIL) són variables¹. En el cas del DILI Hepatocel·lular, a nivell visual, el fetge es veu normal tot i que també pot presentar hepatomegàlia. A nivell tissular, es poden veure regions de necrosis quan l'agent causant és un dels més hepatotòxics com l'acetaminofè. Contra la majoria d'agents tòxics no hi ha tractament a part d'aturar l'exposició tan bon punt es diagnostica el DILI. Un cop aturat, si no ha estat greu, la recuperació és força ràpida i els nivells d'ALT i AST en sèrum tornen als nivells normals. En canvi, els casos més aguts poden desencadenar en una malaltia hepàtica crònica.
- **Colestàtic:** En aquests casos s'observen nivells dues vegades per sobre dels normals de FA i BIL mentre que els nivells d'ALT i AST es mantenen normals o

¹ L'ALT, l'AST, la FA i la BIL han estat descrits com a biomarcadors de la funció hepàtica i es poden conèixer els seus nivells serològics de forma fàcil mitjançant un anàlisi de sang.

lleugerament elevats però sense arribar als del DILI Hepatocel·lular. A nivell visual el fetge es veu normal. En aquests casos hi ha obstrucció dels conductes biliars i a nivell tissular es troba bilis en els hepatòcits. Si es compara amb el DILI Hepatocel·lular, en el cas del DILI Colestàtic la recuperació dels nivells serològics normals tarda molt més en aconseguir-se un cop aturada l'exposició amb l'agent causant. El tractament habitual és l'administració d'àcid ursodeoxicòlic. Els casos més greus també es poden arribar a cronificar.

- **Combinat**: Es tracta d'un patró de DILI que aglutina característiques dels dos patrons anteriors. En aquest cas els nivells en sang de tots els marcadors serològics anomenats anteriorment (ALT, AST, FA i BIL) es troben elevats per sobre del normal, entre dues i tres vegades més.
- **Esteatòtic**: També anomenat patró Microvesicular, consisteix en l'acumulació de greix al fetge degut a que la toxicitat ha afectat sobretot a nivell mitocondrial i no es degraden els àcids grassos que s'acumulen en vesícules. Aquest patró també presenta uns nivells entre 5 i 25 vegades superiors als normals de transaminases (ALT i AST) mentre que la FA es manté en nivells normals i la BIL és variable segons el grau d'afectació del fetge. A nivell visual no s'observa cap anomalia en el fetge, tot i que a nivell tissular sí que es veu l'acumulació difusa de vesícules de lípids entre els hepatòcits. Normalment no hi ha fibrosis en els estadis inicials. En els casos més greus normalment és necessari un transplantament de fetge, mentre que en els que no ho són tant, eliminant l'exposició a l'agent causant la recuperació es força ràpida.

2.2. Efecte de l'acetaminofè

Un exemple de fàrmac que és hepatotòxic segons la dosi ingerida és l'acetaminofè o N-acetil-para-aminofenol (APAP), un fàrmac aprovat per la simptomatologia de la febre i el dolor general (29). Si és consumit amb excés (> 125mg/kg) provoca un dany hepàtic agut ja que el fetge és el principal òrgan on es metabolitza l'APAP i una sobredosi acaba sent tòxica pel mateix fins al punt de poder causar la mort. En l'organisme, l'APAP és

metabolitzat i transformat en N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) que és la substància tòxica que danya el fetge. La seva toxicitat rau en el fet que és capaç d'unir-se a diverses proteïnes mitocondrials inutilitzant-les. Alguns exemples de la toxicitat de NAPQI són:

- Adhesió a proteïnes de la cadena respiratòria, provocant que augmenti la concentració d'oxigen en els mitocondris i com a conseqüència també la de superòxids (30).
- Formació d'adductes proteics amb la subunitat alfa de l'ATP sintetasa inhibint així la producció d'ATP (31).
- Unió amb enzims que controlen els nivells d'estrès oxidatiu, inhibint-los i provocant així un augment de les espècies reactives d'oxigen als mitocondris (32).

Tots aquests efectes tòxics afecten significativament la funció mitocondrial, ja sigui per la falta d'energia o per l'augment d'estrès oxidatiu, causant la mort dels hepatòcits.

La patologia causada pel dany hepàtic induït per APAP té 3 fases: mort cel·lular al fetge, reacció inflamatòria, i inducció de la regeneració hepàtica (33). La necrosis dels hepatòcits provocada per l'acumulació de NAPQI fa que aquests alliberin patrons moleculars associats al perill (DAMPs) que atrauen cèl·lules del sistema immunitari iniciant així una resposta inflamatòria (34). Posteriorment, per mecanismes que encara es troben en estudi, s'inicia la regeneració hepàtica amb la proliferació dels diferents tipus cel·lulars del fetge que no han estat afectats.

Quan el dany agut és molt sever, aquest procés de regeneració pot fallar donant pas a un procés de reparació tissular aberrant, iniciant així un primer estadi de fibrosi hepàtica que podria ser el desencadenant d'una malaltia hepàtica crònica.

3. Malalties cròniques del fetge

Una malaltia crònica és aquella que es defineix perquè està present durant un llarg període de temps i acostuma a presentar una progressió lenta. La majoria de vegades, des de que es contrau, dura la resta la vida d'una persona.

Actualment, les **malalties cròniques del fetge** són una de les principals preocupacions per la seva prevalença a la societat, la càrrega sanitària que comporten i la manca d'un tractament eficaç. Són la causa d'aproximadament dos milions de morts cada any a nivell global (35).

3.1. Procés de cronificació en la malaltia hepàtica: La Fibrosi Hepàtica

El desenvolupament de les malalties hepàtiques cròniques s'associa a la progressió de la fibrosi hepàtica. Aquesta situació patològica s'inicia a partir d'un procés de reparació tissular aberrant (37) desencadenat en resposta a un dany hepàtic.

3.1.1. Aspectes generals de la fibrosi hepàtica

La fibrosi hepàtica és un procés de cicatrització que es caracteritza per l'acumulació progressiva de proteïnes i altres elements de la matriu extracel·lular del fetge en resposta a una lesió hepàtica (36). Aquesta acumulació de components de la matriu extracel·lular, majoritàriament col·làgens tipus I i III, substitueix el teixit hepàtic danyat juntament amb cèl·lules amb característiques miofibroblàstiques (38). En aquesta resposta al dany hepàtic també hi participa una reacció inflamatòria, per la qual cosa no només hi estan involucrades les cèl·lules pròpies del fetge sinó que cèl·lules del sistema immunitari també hi tenen un paper important (36,38)

Aquesta reacció, a curt termini, és beneficiosa i necessària pel fetge ja que implica una reparació tissular. En condicions fisiològiques, existeix un equilibri entre els mecanismes moleculars pro-fibròtics i anti-fibròtics que permeten la regressió de la fibrosi hepàtica després de la substitució del teixit (39). En canvi, quan el dany hepàtic persisteix, no es

dona aquesta situació d'equilibri, prevalent els mecanismes pro-fibrogènics. Aquests mantenen activa la fibrogènesi en el fetge, agreujant l'arquitectura i conformació de l'òrgan fins arribar a l'estadi de cirrosi hepàtica (40) on trobem una cronificació de la malaltia hepàtica que incrementa el risc de desenvolupar carcinoma hepatocel·lular. (41) (Fig. 3).

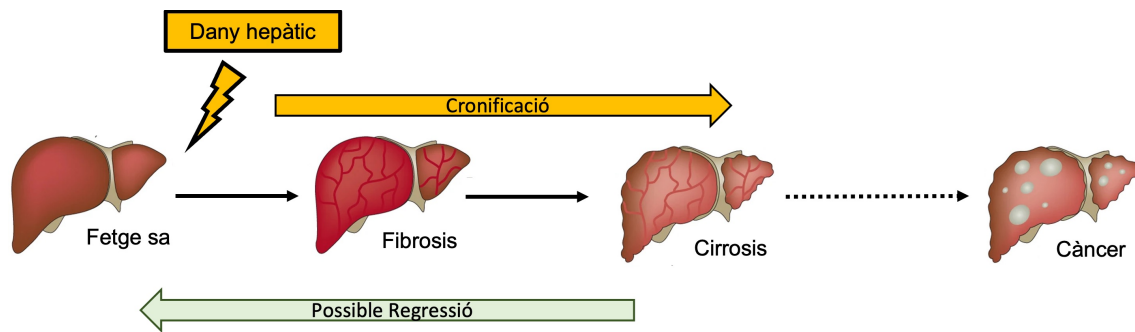


Figura 3. Cronificació de la malaltia hepàtica. Figura adaptada a partir de Pellicoro et. al. 2014 (42).

3.1.2. Participació dels diferents tipus cel·lulars implicats en la fibrosi hepàtica

A continuació s'exposen els diferents processos per els que passen els principals tipus cel·lulars involucrats en la fibrosi hepàtica.

3.1.2.1. Mort cel·lular i apoptosi dels hepatòcits

La necrosi i/o apoptosi dels hepatòcits degut al dany hepàtic són l'inici de tot el mecanisme que desencadena la fibrosi hepàtica. Els hepatòcits morts o necròtics alliberen DAMPs que indueixen a les cèl·lules del voltant a generar una resposta inflamatòria que portarà a l'activació de les cèl·lules hepàtiques estrellades i miofibroblàstiques (38).

Per altra banda, els hepatòcits apoptòtics no generen tants DAMPs perquè els components de la cèl·lula queden retinguts en els cossos apoptòtics. De totes maneres, aquests cossos poden ser fagocitats per les cèl·lules hepàtiques estrellades (43) i les cèl·lules de Kupffer (44) que induiran una resposta pro-fibrogènica.

3.1.2.2. Activació de les cèl·lules hepàtiques estrellades

En condicions fisiològiques, les cèl·lules hepàtiques estrellades resideixen a l'espai de Disse i es troben en un estat de quiescència (45) en el qual la seva principal funció és l'emmagatzematge de vitamina A (46), però quan s'esdevé el dany hepàtic, la mort cel·lular dels hepatòcits desencadena una resposta inflamatòria amb la consegüent alliberació al medi de les principals citocines pro-fibrogèniques, IL-6 i TGF- β , així com el factor PDGF (47–49), que activen les HSCs (50) iniciant un procés de transdiferenciació en el que passen d'un fenotip quiescent a un fenotip de miofibroblast proliferatiu (51). Per exemple, la cascada de senyalització que inicia TGF- β 1 resulta en l'expressió de la família de proteïnes SMAD en les HSCs (52). Entre les proteïnes d'aquesta família, hi ha l'SMAD3 que és clau per induir l'activació de les HSCs i la transcripció de gens pro-fibrogènics com *α -sma* i *Col1a1* (36). Un altre exemple n'és la unió del PDGF al receptor del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGFR) de les HSCs que desencadena diverses cascades de senyalització (Ras/Raf; PI3K/Akt; i JAK/STAT) que finalitzen amb l'expressió de gens pro-fibrogènics com el *Col1a1* i el *Timp1* però també regulen l'expressió del gen *Bcl2*, conegut pel seu paper en el procés de l'apoptosi, promovent així la proliferació i supervivència de les HSCs (53). A més, el PDGF també és expressat per les HSCs activades, podent aquestes rebre'n l'estímul tant de forma paracrina com autocrina (54).

Per tant, l'activació de les cèl·lules hepàtiques estrellades consisteix en dues fases (55). Una primera fase inicial en la que modifiquen la seva expressió gènica degut a les senyals que reben dels hepatòcits danyats i de les cèl·lules de Kupffer, canviant així el seu fenotip; i una segona fase de perpetuació de l'activació que s'estableix degut al manteniment d'aquestes senyals pro-inflamatòries i pro-fibrogèniques. A més, també es dona una situació de retroalimentació per part dels propis miofibroblasts ja que ells mateixos secreten quimosines que atrauen cèl·lules secretores de les mateixes senyals que les activen (55).

Les cèl·lules hepàtiques estrellades activades o miofibroblasts migren a l'ubicació de la lesió (56) i comencen el procés de reparació tissular mitjançant la secreció d'elements de la matriu extracel·lular com col·làgens, fibronectines, laminines i proteoglicans. També expressen alts nivells d'actina del múscul llis (α -SMA) i d'Inhibidor de Metal·loproteinases 1 (TIMP1) (57).

En una situació fisiològica normal, aquests miofibroblasts són retirats quan el teixit està reparat mitjançant mecanismes anti-fibrogènics que indueixen l'apoptosi (58) o la inactivació d'aquestes cèl·lules (59).

En els casos en els que la lesió hepàtica persisteix, el procés de reparació tissular també persisteix i esdevé crònic provocant una sobre-activació de les HSCs i el manteniment de la fibrosi hepàtica. Els miofibroblasts augmenten considerablement la seva producció de col·làgens i altres proteïnes de la matriu extracel·lular, afectant així l'equilibri síntesi-degradació que garanteix la correcta renovació de la mateixa (60). Concretament, el col·lagen tipus I se sintetitza al reticle endoplasmàtic mitjançant la unió de dos pèptids del precursor del col·lagen α 1 (COL1A1) i un pèptid del precursor del col·lagen α 2 (COL1A2)(61). Els gens d'aquests dos pèptids precursors de col·lagen estan regulats transcripcionalment per múltiples factors de transcripció com per exemple la proteïna d'especificitat 1 (Sp1) i la proteïna E 26-1 (Ets1) (62–65).

L'excés de col·lagen i altres elements de la matriu extracel·lular es va depositant i acumulant a la zona perisinusoidal, impedit així la correcta comunicació entre els diferents tipus cel·lulars que conformen el fetge i pertorbant també l'òptima irrigació del propi teixit. Aquest procés fa que hi hagi una substitució significativa d'hepatòcits funcionals per teixit fibròtic, conduint a una alteració estructural del propi òrgan i la consegüent degeneració de la funció hepàtica, així com la pèrdua dels mecanismes associats a la regeneració i al manteniment de l'homeòstasi del fetge (66).

3.1.2.2.1. El factor de transcripció nuclear 20

Entre la gran varietat de factors de transcripció que intervenen en la síntesi del col·lagen de la matriu extracel·lular, hi trobem Sp1 i Ets1. L'expressió d'aquests està a la vegada regulada per una altra proteïna, el factor de transcripció nuclear 20 (TCF20), també conegut anteriorment com la proteïna d'unió a l'element responsiu del factor de creixement derivat de la Stromelysin-1 (SPBP).

El gen *Tcf20* es troba a la regió del cromosoma 22q13.2 i codifica dos marcs de lectura oberts generats per splicing alternatiu; la isoforma 1 s'expressa al cervell, al cor, al teixit testicular i de forma predominant al fetge i als ronyons. D'altra banda, la isoforma 2 s'expressa principalment als pulmons (67).

TCF20 és una proteïna amb capacitat d'unió a la cromatina que actua com a regulador transcripcional mitjançant la interacció amb diferents factors, com ara c-Jun, la proteïna d'especificitat 1 (Sp1), la proteïna E 26-1 (Ets1), la proteïna de caixa emparellada 6 (PAX6), la proteïna RING finger 4 (RNF4), el receptor d'estrogen α (ER α) i el factor nuclear E2 relacionat amb el factor 2 (Nrf2) (67–72). TCF20, donat que en la seva estructura conté un motiu RxRxxS/T, també és una diana d'Akt (73). Per tant, TCF20 podria tenir un paper important en la regulació de diferents vies de senyalització canòniques.

Actualment però, encara existeix poca bibliografia sobre aquesta proteïna a banda dels estudis que la relacionen amb malalties neuronals.

3.1.2.2.1.1. Relació entre *Tcf20* i les malalties neuronals

Pel que fa a les malalties neurològiques humanes, les variants patogèniques de *Tcf20*, tant *de novo* com heretades, s'han associat amb trastorns de l'espectre autista (TEA), discapacitat intel·lectual (DI) i retard del desenvolupament neurològic (RDN) (74–79). Estudis amb ratolins transgènics que els hi falta el gen *Tcf20* han relacionat aquesta manca amb trastorns en el comportament d'aquests animals (80,81).

3.1.2.3. Activació dels macròfags al fetge

Els macròfags que participen en la fibrosi hepàtica són els residents del propi fetge, com les cèl·lules de Kupffer, i els macròfags derivats de monòcits que són reclutats durant la resposta inflamatòria al dany hepàtic (82,83) i que provenen de diferents orígens com per exemple de la mèdulla òssia o la melsa (83). La seva activació és induïda pels DAMPs alliberats pels hepatòcits danyats (84), la senyalització metabòlica generada per l'acumulació d'àcids grassos (85) i/o la presència d'espècies reactives d'oxigen (36).

Segons el seu origen i estat d'activació, podem trobar diferents grups de macròfags exercint funcions diferents durant la fibrosi hepàtica (83). El fenotip que adquireixen i les funcions que realitzen ve determinat pel microambient (presència d'unes o altres molècules al medi) en el que es troba cada macròfag. D'aquesta manera, en el context d'una lesió hepàtica, podem trobar a la vegada macròfags amb un fenotip més pro-inflamatori que perpetui la fibrogènesi, macròfags amb un fenotip que promogui la regressió de la fibrosi i fins i tot macròfags que expressin a la vegada alguns dels marcadors inflamatoris i alguns de regressió (83,86,87).

Les cèl·lules de Kupffer, un cop activades i en un microambient que els fa tenir un fenotip inflamatori, segreguen TNF- α , IL6, IL1- β , TGF- β 1, CCL2 i CCL5 (83,87) produint l'activació de les cèl·lules estrellades hepàtiques i el reclutament d'altres cèl·lules del sistema immunitari com els macròfags derivats de monòcits (82,83,86) o les plaquetes que són la principal font de del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), una de les principals molècules que també participen en l'activació de les HSCs (36). Per altra banda, les KCs també poden expressar diferents MMPs per promoure la degradació de la ECM i per tant ajudar en la regressió de la fibrosi (83,86).

Els macròfags derivats de monòcits que són reclutats al fetge expressen també diferents molècules que promouen la fibrogènesi. Per exemple, secretant TGF- β , activen les HSCs i incrementen l'expressió d' α -sma i col·lagen tipus I dels miofibroblasts activats,

promovent així la síntesi d'ECM. Amb l'expressió de PDGF promouen la proliferació dels miofibroblasts activats i també activen les HSCs (83,87). Per altra banda, aquests macròfags també poden expressar molècules que promouen la regressió de la fibrosi hepàtica com el lligand inductor de l'apoptosi relacionat amb el TNF (TRAIL) que indueix l'apoptosi de miofibroblasts activats o expressant MMPs que ajudaran a la degradació de la ECM excessiva (83,87).

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'estimulació de les cèl·lules inflamatòries que promouen l'activació de les HSCs i la posterior capacitat d'aquestes últimes per modular el reclutament de més cèl·lules del sistema immunitari mitjançant la secreció de molècules pro-inflamatòries i quimo-atraients, que a la vegada mantenen actius els macròfags, dona com a resultat la perpetuació de l'estat pro-fibrogènic del fetge (88).

3.1.2.4. Participació d'altres tipus cel·lulars

En l'apartat anterior s'ha descrit la participació dels principals tipus cel·lulars en el procés de fibrosi hepàtica, però no són els únics que hi intervenen. Per exemple, les cèl·lules endotelials sinusoidals, en condicions fisiològiques, promouen la quiescència de les HSCs amb moduladors com l'òxid nítric (89), mentre que en condicions patològiques canvien el seu fenotip i deixen d'ajudar en el manteniment de la quiescència de les HSCs (90). Les plaquetes també tenen un paper important en aquest procés ja que són la principal font de PDGF que també promou l'activació de les HSCs (36). Per últim, altres cèl·lules del sistema immunitari com els limfòcits també són atretes a la ubicació de la lesió hepàtica i per tant, tot i que no han estat tant estudiades com altres tipus cel·lulars, també tenen una implicació important en la fibrogènesi. La bibliografia que hi ha al respecte, apunta cap a la secreció de més molècules pro-fibrogèniques (91).

3.2. Regressió de la fibrosi hepàtica

Si el dany hepàtic persisteix, la fibrosi hepàtica progressa a estadis més avançats fins arribar a la cirrosi hepàtica, però si s'aconsegueix retirar la font causant de la lesió hepàtica, i segons en quin estadi fibròtic estigui el fetge, es pot donar un procés anomenat **Regressió de la fibrosi hepàtica** (36,38) com ja s'ha demostrat en estudis amb pacients i amb models animals (92–94).

La regressió de la fibrosi hepàtica està associada a la disminució dels nivells de les principals citocines proinflamatòries i TGF- β que condueix a la inactivació i/o apoptosi dels miofibroblasts reduint així la producció excessiva de matriu extracel·lular. En aquest procés també augmenta la secreció de metal·loproteïnases per part dels macròfags que degraden el col·lagen i altres elements de la ECM reduint així la cicatriu fibrosa en el teixit hepàtic (38,95).

3.3. Indicadors de la fibrosi hepàtica

L'avaluació de la gravetat de la fibrosi en la malaltia hepàtica és de gran importància per a un bon diagnòstic i poder prendre decisions sobre el tractament i la gestió del pacient. Encara que per obtenir aquesta avaluació, el mètode estàndard és l'anàlisi histopatològic d'una biòpsia hepàtica, aquesta presenta una sèrie de limitacions que la fan poc atractiva tant pels metges com pels pacients. Es tracta d'un procediment invasiu que pot presentar complicacions al pacient com dolor i sagnat, a més de la possibilitat d'errors que poden portar a obtenir una biòpsia no representativa al tractar-se d'un mostreig tant reduït (96).

Altres sistemes d'avaluació de la fibrosi com per exemple les proves d'elastografia transitòria o elastografia RM han permès disminuir la necessitat d'una biòpsia hepàtica en un 70% dels casos (96). De totes maneres, la disponibilitat d'aquests mètodes d'imatge hepàtica es limita a determinats entorns clínics degut al cost de la prova i la inversió en equips que suposa.

Per tot l'anterior, s'han validat altres mètodes no invasius de determinació de la fibrosi hepàtica més accessibles i basats en fórmules que utilitzen els valors de marcadors serològics analitzats al laboratori combinats o no amb altres dades clíniques del pacient per obtenir un indicador de la fase de fibrosi hepàtica en la que es troba i poder donar un diagnòstic més precís (96,97). D'aquesta manera el metge pot avaluar ràpidament si el pacient té un risc baix o alt de tenir fibrosi avançada i determinar si una biòpsia és necessària.

Actualment existeixen diferents indicadors de fibrosi validats a partir de grups de pacients d'etiologies hepàtiques concretes. A continuació s'exposen els més utilitzats.

3.3.1. NAFLD-FS

L'indicador de fibrosi de la malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD), també conegut per les seves sigles en anglès NAFLD-FS, és un mètode no invasiu per a la determinació de l'estat fibròtic del fetge que va ser dissenyat específicament per pacients amb malaltia del fetge gras no alcohòlic (98).

Aquest indicador es basa en 6 variables que acostumen a estar disponibles en les dades clíniques i bioquímiques del pacient: edat, índex de massa corporal (IMC), hiperglucèmia, recompte de plaquetes, albúmina i la ratio entre els nivells d'aspartat aminotransferasa (AST) i alanina aminotransferasa (ALT) (96). Per obtenir el valor d'aquest indicador s'utilitza la següent fórmula:

$$\begin{aligned} \text{NAFLD} = & -1.675 + 0.037 \times \text{edat}(\text{anys}) + 0.094 \times \text{IMC}(\text{kg}/\text{m}^2) \\ & + 1.13 \times \text{hiperglucèmia}(\text{Sí}=1; \text{No}=0) \\ & + 0.99 \times \frac{\text{AST}(\text{UI}/\text{l})}{\text{ALT}(\text{UI}/\text{l})} - 0.013 \times \text{plaquetes}(\times 10^9/\text{l}) - 0.66 \times \text{albúmina}(\text{g}/\text{dl}) \end{aligned}$$

3.3.2. APRI

APRI són les sigles en anglès de l'indicador de fibrosi hepàtica de l'índex de la ratio d'AST entre el recompte de plaquetes. És un dels panells de marcadors més senzills que pot diagnosticar fibrosi i cirrosi de forma significativa amb una precisió acceptable (99). Es va desenvolupar en pacients amb hepatitis virals però també ha estat validat per pacients amb NAFLD (98).

El càlcul d'aquest indicador segueix la següent fórmula (96):

$$\text{APRI} = \left[\frac{\frac{\text{AST}(\text{UI}/\text{l})}{\text{AST ULN}(\text{UI}/\text{l})}}{\text{Plaquetes}(\times 10^9/\text{l})} \right] \times 100$$

3.3.3. FIB-4

L'índex Fibrosi 4 (FIB-4) és un altre indicador de fibrosi desenvolupat per al diagnòstic de fibrosi avançada i cirrosi en pacients amb hepatitis víriques (99) tot i que ara també es troba validat per pacients amb NAFLD (98). Com el seu propi nom indica, es basa en 4 variables diferents: L'edat, els nivells d'AST, els d'ALT i el recompte de plaquetes (99).

El càlcul d'aquest indicador segueix la fórmula següent (96):

$$\text{FIB4} = \frac{\text{edat (anys)} \times \text{AST (UI/l)}}{\sqrt{\text{AST (UI/l)}}}$$

3.3.4. ELF

L'indicador ELF, de l'anglès *Enhanced Liver Fibrosis*, és un algorisme basat en marcadors que s'obtenen en les analítiques de sang. Va ser desenvolupat pel Grup Europeu de Fibrosi Hepàtica (96) i té en compte els nivells plasmàtics de 3 proteïnes que participen en la reposició de la matriu extracel·lular: l'àcid hialurònic (HA), l'inhibidor tissular de la metaloproteïnasa 1 (TIMP1) i el pèptid N-terminal del procollagen III (PIIINP) (100,101).

La fórmula per calcular-lo és la següent:

$$\text{ELF} = 2.494 + 0.846 \times \ln(\text{HA}) + 0.735 \times \ln(\text{PIIINP}) + 0.391 \times \ln(\text{TIMP1})$$

3.3.5. HFS

Aquest indicador de fibrosi, l'Hepamet (HFS), es va validar en una població multicèntrica de pacients amb NAFLD diagnosticats per biòpsia (98). Va sorgir de la necessitat de més precisió en l'avaluació de la fibrosi en pacients amb malaltia del fetge gras no alcohòlica ja que altres indicadors com FIB-4 i NAFLD-FS havien mostrat limitacions degut a algunes de les variables incloses en es seves fórmules (102).

La fórmula per calcular-lo és la següent:

$$HFS = 1/(1 + e^y)$$

On $y = 5.39 - (0.986 \times \text{edat (si 45-64 anys) o } 1.719 \times \text{edat (si >65 anys)}) + (0.875 \text{ si sexe masculí}) - (0.896 \times \text{AST (si 35-69 U/L) o } 2.216 \times \text{AST (si <70 U/L)}) - (0.027 \times \text{Albúmina (si 4-4.49) o } 0.897 \times \text{Albúmina (si <4)}) - (0.899 \times \text{HOMA (si 2-3.99 sense diabetis mellitus) o } 1.497 \times \text{HOMA (si >4 sense diabetis mellitus)}) - 2.184 - (0.082 \times \text{plaquetes (si 155-219) o } 2.233 \times \text{plaquetes (si <155)})$.

3.3.6. Precisió dels diferents indicadors de fibrosi

A la Taula 1 s'aporten dades de precisió dels diferents indicadors explicats anteriorment per a la detecció de la fibrosi avançada. Aquestes dades han estat extretes de diferents estudis amb pacients de diverses malalties hepàtiques cròniques (103,104).

Taula 1: Precisió dels diferents indicadors de fibrosi hepàtica

Indicadors de fibrosi	Diagnòstic	Precisió (AUC)
NAFLD-FS	Fibrosi avançada (F3-F4)	0.80 – 0.84
APRI		0.75 – 0.79
FIB4		0.80 – 0.84
ELF		0.85 – 0.89
HFS		0.83 – 0.86

Per NAFLD-FS, APRI, FIB4 i ELF les dades han estat obtingudes a partir de la revisió de Loomba R i Adams L 2020 (103); per HFS les dades s'han obtingut de Chong S, et al 2023 (104). **NAFLD-FS**: sigles en anglès de l'indicador de fibrosi de la malaltia del fetge gras no alcohòlic; **APRI**: sigles en anglès de l'indicador de fibrosi hepàtica de l'índex de la ratio d'AST entre el recompte de plaquetes; **FIB4**: Índex Fibrosi 4; **ELF**: de l'anglès Enhanced Liver Fibrosis; **HFS**: Indicador de fibrosi Hepamet.

4. Tractament de la lesió hepàtica i la malaltia crònica del fetge

Actualment no existeix una teràpia genèrica completament eficaç pels casos de dany hepàtic ja sigui agut o crònic. El tractament més efectiu és la retirada de l'agent causant del dany hepàtic o la medicació per intentar neutralitzar-lo, com en les situacions d'intoxicació per APAP en les que s'administra acetil-cisteïna (NAC), o l'administració de corticoesteroides per les hepatitis autoimmunes (105).

En els casos no gaire avançats de fibrosi hepàtica, el tractament consisteix en mitigar les possibles complicacions derivades d'aquest tipus de lesions com les encefalopaties, coagulopaties i la icterícia (105), i mirar de revertir el procés de fibrogènesi. L'estratègia principal és l'eliminació o control de l'agent causant del dany hepàtic mitjançant diferents protocols segons sigui l'origen d'aquest dany: perdre pes per reduir el greix acumulat, ús de teràpies antivirals en els casos d'hepatitis víriques o deixar d'ingerir alcohol entre altres (106,107). Altres estratègies enfocades a actuar sobre els mecanismes cel·lulars de la fibrosi hepàtica busquen afavorir la regressió de la fibrosi hepàtica (38). Aquestes es poden diferenciar segons el tipus cel·lular sobre el que es vol actuar:

- La protecció dels hepatòcits mitjançant la inhibició de l'apoptosi.
- La inhibició de l'activació de les cèl·lules hepàtiques estrellades i afavorir l'apoptosi o desactivació dels miofibroblasts. Per això són necessaris sistemes de transport de fàrmacs que arribin específicament a aquestes cèl·lules (108).
- El control de la resposta immunitària per afavorir la resolució de la inflamació i la degradació de la ECM. Per exemple mitjançant la modulació de la cascada de senyalització de TGF- β 1

Moltes d'aquestes propostes encara es troben en fase d'estudi ja que actualment no hi ha un tractament o un fàrmac antifibròtic eficaç disponible. Per altra banda, en la majoria de casos de fibrosi molt avançada i cirrosi, l'única estratègia eficaç passa per un transplantament de l'òrgan.

Per tot l'anterior, és de gran interès trobar noves dianes terapèutiques per evitar la progressió de la fibrosi en la malaltia crònica hepàtica i també l'estudi de noves estratègies per al tractament de la lesió hepàtica.

5. La regeneració hepàtica

El fetge és l'òrgan encarregat de filtrar i processar metabòlicament totes les substàncies absorbides a través del tracte gastrointestinal i proveir de metabòlits la resta de teixits i òrgans del cos, sent una de les seves principals funcions el manteniment de l'homeòstasi de l'organisme. Aquesta podria ser una de les principals raons per les quals l'organisme no pot tolerar una pèrdua de teixit hepàtic i sempre manté una relació proporcional entre la massa del fetge i la massa del cos (109).

Per al manteniment d'aquesta regla de proporcionalitat, el fetge té una característica que no presenten altres òrgans quan, degut a una lesió hepàtica, es dona una pèrdua de teixit hepàtic: la capacitat de regenerar-se fins a tornar a la massa que li correspon segons la proporció amb el pes del cos.

En condicions fisiològiques, les taxes de proliferació dels diferents tipus cel·lulars del fetge són molt baixes. En el cas dels hepatòcits és inferior al 0,2% (109). És després d'haver sofert una lesió hepàtica, com per exemple una resecció, que s'activa la proliferació cel·lular i el fetge és capaç de tornar a augmentar la seva mida i massa de forma proporcional al pes del cos que el conté.

En les situacions patològiques de la majoria de malalties hepàtiques cròniques hi ha pèrdua d'hepatòcits independentment de l'etiologia de la malaltia crònica, i això desencadena respostes regeneratives constants. Aquesta compensació crònica es dona en un ambient inflamatori i moltes vegades amb presència d'agents genotòxics o espècies reactives d'oxigen (110) que poden portar a una síntesi aberrant de l'ADN durant el procés regeneratiu i per tant a l'aparició de mutacions que podrien comportar el desenvolupament de carcinoma hepatocel·lular (109). Aquest és un dels motius pels quals les malalties hepàtiques cròniques s'associen a un major risc de desenvolupament de càncer de fetge.

El procés de regeneració del fetge s'ha estudiat àmpliament al llarg dels anys i s'ha descrit com un procés altament regulat en el que participen moltes vies de senyalització que interaccionen, es regulen i es compensen entre elles. També s'ha determinat que els mecanismes implicats en aquest procés poden variar segons la massa romanent de la qual parteix el procés (111). Per exemple, després d'una hepatectomia del 30% del fetge, aquest es recupera principalment per mitjà de la hipertrofia mentre que després d'una hepatectomia del 70% són la hipertrofia i la hiperplàsia les que contribueixen a la recuperació de la totalitat de la massa de l'òrgan amb una replicació de cèl·lules hepàtiques molt més significativa (112).

5.1. Hepatectomia Parcial

La major part del coneixement que hi ha disponible sobre aquest procés en models experimentals prové de l'estudi d'un model de regeneració hepàtica aplicat en rosegadors conegut amb el nom de: "Hepatectomia parcial de dos terços (PHx)". Es tracta d'un procediment quirúrgic que consisteix en la resecció dels dos lòbuls més grans del fetge dels rosegadors, és a dir aproximadament dos terços de la seva massa, i va ser descrit per primera vegada l'any 1933 per Higgins i Anderson (113) en rates. En aquest model, els dos lòbuls romanents després de la resecció, que queden intactes, inicien el procés regeneratiu augmentant la seva massa fins a recuperar la proporció amb el pes de l'animal.

En ratolins, després d'una hepatectomia parcial del 70% del fetge, la part romanent és capaç de regenerar-se fins al 100% entre 7 i 10 dies (112). En humans, la recuperació total de la massa hepàtica després de la resecció d'un dels lòbuls pot tardar uns 3 mesos (112). Aquesta capacitat regenerativa és crucial per assegurar l'èxit en les reseccions hepàtiques i els transplants de fetge.

5.2. Mecànica i fases de la regeneració hepàtica

5.2.1. Inici de la regeneració hepàtica: proliferació d'hepatòcits i colangiòcits

Després d'una PHx, es produeixen senyals físics i químics que porten a l'inici de la regeneració hepàtica. Un dels primers canvis és l'augment immediat de flux sanguini als lòbuls del fetge romanent provocant un increment de la tensió de cisalla del fluid sanguini en la capa de cèl·lules endotelials sinusoidals. Aquest senyal físic sembla tenir com a primera conseqüència la secreció de mol·lècules entre les quals es troba l'activador del plasminogen de la uroquinasa (uPA) per part de les cèl·lules endotelials sinusoidals (114,115), una de les més estudiades.

L'activador del plasminogen de la uroquinasa indueix la remodelació de la matriu extracel·lular (ECM) alliberant així factors de creixement com el factor de creixement d'hepatòcits (HGF) que està unit als col·làgens i glicosaminoglicans de la ECM on es troba retingut (116). L'HGF és un mitogen produït per les cèl·lules estrellades hepàtiques en forma inactiva que en condicions fisiològiques és dipositat a la ECM. En la fase inicial de la regeneració hepàtica, aquest factor passa a la seva forma activa quan és alliberat de la ECM i, al unir-se al seu receptor Met present a la membrana dels hepatòcits, estimula la síntesi d'ADN d'aquestes cèl·lules (117).

Les cèl·lules endotelials també alliberen les proteïnes Wnt que indueixen la migració de la β -catenina del citoplasma al nucli dels hepatòcits (118,119) que activarà l'expressió de molts gens relacionats amb la proliferació cel·lular (120). Entre aquests gens hi ha el que expressa el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) (121,122). El factor de creixement epidèrmic (EGF) és un altre agent mitogen que arriba al fetge a través de la circulació portal provinent de l'intestí (109) i que s'uneix a l'EGFR present a les membranes dels hepatòcits i els colangiòcits iniciant una cascada de senyalització que promou la proliferació cel·lular(117).

Aquests dos complexos lligand-receptor, HGF-Met i EGF-EGFR, són els principals iniciadors de la proliferació cel·lular en hepatòcits i per tant també de la regeneració hepàtica. De fet s'ha observat que si falla una de les dues vies, la regeneració hepàtica pot progressar igualment però si fallen les dues, la regeneració del fetge queda truncada (123).

L'EGF no és l'únic lligand de EGFR, hi ha altres elements que també poden unir-s'hi com per exemple el factor de creixement transformant alfa (TGF- α), l'amfiregulina i l'EGF unit a heparina (EGF-HB). Els nivells d'aquests lligands alternatius en el fetge són relativament baixos en condicions fisiològiques però augmenten ràpidament després d'una PHx (124–127) pel que tot i que no són elements crítics per la regeneració hepàtica, sí que complementen la funció d'EGF.

Per tant, els hepatòcits i els colangiòcits són els primers tipus cel·lulars en rebre els estímuls mitogènics a l'inici del procés de regeneració hepàtica i també són els primers a iniciar la proliferació cel·lular. L'inici del cicle cel·lular amb el pas de la fase G1 a la fase S ve marcat per l'augment de les ciclines D1 i D2, resultat també de l'activació de la cascada Wnt/ β -catenina. Aquestes ciclines indueixen l'expressió de molts gens necessaris per la progressió del cicle cel·lular (128).

Durant els primers 2-3 dies s'activen gens lipogènics que promouen una acumulació d'àcids grassos que s'ha comprovat que és necessària per a una correcta regeneració hepàtica (129). La proliferació dels hepatòcits dura entre 5 i 7 dies tenint el seu pic màxim a les 48 hores de l'inici de la regeneració hepàtica (109). Aquesta proliferació es dona en forma d'onada al llarg del lobulec hepàtic començant pels hepatòcits de la regió periportal i acabant pels de la regió pericèntrica (130). D'aquesta manera es garanteix que sempre hi ha hepatòcits dedicats a mantenir la funció hepàtica mentre els altres canvien el seu patró d'expressió gènica per dedicar-se a la mitosi.

5.2.2. Proliferació dels altres tipus cel·lulars del fetge

5.2.2.1. Cèl·lules endotelials

Les cèl·lules endotelials sinusoidals inicien la seva proliferació després dels hepatòcits i els colangiòcits, entre els 4 i 7 dies posteriors a la PHx (109). La seva proliferació és induïda pels nous hepatòcits que formen agrupacions sense vasculatura i comencen a secretar el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF) per promoure la migració i la proliferació de les cèl·lules endotelials en aquestes agrupacions i que formin el sinusoides (131). Aquesta migració i activació del cicle cel·lular és deguda a que aquestes cèl·lules presenten en la seva membrana el receptor de VEGF (VEGFR) (132). Les cèl·lules endotelials sinusoidals adquireixen les fenestracions després de formar el sinusoides (133,134) i comencen a produir HGF (135).

5.2.2.2. Cèl·lules estrellades hepàtiques

Les cèl·lules estrellades hepàtiques també inicien la seva replicació més tard que els hepatòcits. Aquestes augmenten en nombre a mesura que augmenta la xarxa sinusoidal disponible i per tant acaben anant en paral·lel amb les cèl·lules endotelials. La principal funció d'aquestes cèl·lules durant la regeneració hepàtica és l'aportació de material a la ECM i la secreció de molècules de senyalització (109). La proliferació d'aquestes cèl·lules és induïda pel PDGF secretat pels colangiòcits proliferatius (136), tot i que també es pot activar per vies similars a les ja comentades anteriorment en l'apartat de la fibrosi hepàtica (137).

5.2.2.3. Cèl·lules de Kupffer

Durant la regeneració hepàtica hi ha dues fonts de cèl·lules de Kupffer. Una són les pròpies cèl·lules residents que es repliquen localment (138) i l'altra és l'entrada al fetge de monòcits de la medul·la òssia que s'acaben diferenciant en cèl·lules de Kupffer (139). El seu nombre augmenta a partir del tercer dia de la PHx després del pic de proliferació

dels hepatòcits. De fet, són aquests juntament amb les cèl·lules hepàtiques estrellades, els que secreten agents mitogens que indueixen la proliferació de les cèl·lules de Kupffer (109).

5.2.3. Finalització de la regeneració hepàtica

La regeneració hepàtica finalitza quan s'acaba la proliferació cel·lular i la mida i massa del fetge són proporcionals a l'organisme que el conté. Aquests dos fets però es poden donar en moments diferents ja que la síntesi d'ADN normalment s'acaba al setè dia posterior a la PHx però fins al dia 14 després de la PHx encara s'observa un patró d'expressió gènica diferent als valors normals (109).

Un possible regulador de la finalització de la regeneració hepàtica podria ser la ECM ja que aquesta és degradada parcialment en les fases inicials de la regeneració però al final del procés la trobem restaurada (140). Per tant es podria inferir que els estímuls que proporciona la ECM a l'inici del procés són diferents dels del final (109). En aquesta hipòtesi, la integrina $\alpha3\beta1$ i la quinasa lligada a integrines (ILK) són les que podrien tenir un paper important donat l'estímul inhibitori de la replicació que generen en els hepatòcits (101).

Una altra via de senyalització important en la finalització de la regeneració hepàtica és la via Hippo que desencadena una cascada de senyalització que porta a la proteïna Yap a migrar al nucli (110). Allà, Yap funciona com un factor de transcripció que regula gens relacionats amb la proliferació i la mida cel·lular. Aquesta proteïna es troba present al nucli 10 dies després de la PHx (141–144).

5.2.4. Resum de les principals vies de senyalització que participen en la regeneració hepàtica

Alguns exemples de les principals vies que participen en la regeneració hepàtica després d'una resecció parcial (110,112) són:

- **La via de Ras/Raf/MEK/ERK** que principalment participa en la regulació de la fase inicial del procés de regeneració hepàtica mitjançant les cascades de senyalització induïdes per receptors cel·lulars de factors de creixement i l'expressió de gens de factors de transcripció involucrats en la progressió del cicle cel·lular.
- **La via JAK/STAT3** activada principalment per IL-6 i el seu receptor IL-6R. És un dels principals mecanismes que inicia la regeneració hepàtica després d'una hepatectomia parcial mitjançant l'estimulació de la proliferació cel·lular.

La via PI3K/Akt on PDK1 i el complex mTORC2 fosforilen Akt per activar-la (145). La forma activa d'Akt té activitat serina/treonina-quinasa sobre proteïnes amb el motiu RxRxxS/T. Aquesta fosforil·lació depenent d'Akt produeix l'activació o inhibició de molècules que regulen l'expressió de factors involucrats en el creixement, la proliferació i la migració cel·lulars (145). Un exemple és el Foxo1, un factor de transcripció relacionat amb el cicle cel·lular i el metabolisme de lípids i de glucosa, la inhibició del qual per part d'Akt s'ha demostrat que és necessària per a una correcta regeneració hepàtica en ratolins (146).

- **La via NF-κB** en les cèl·lules de Kupffer. Quan aquestes cèl·lules són activades, la proteïna NF-κB és translocada al nucli per activar l'expressió de diferents factors com TNF, IL-1, IL-6 i VEGF, interaccionant així amb altres vies de senyalització.
- **La via Wnt/β-Catenina** que principalment regula la proliferació cel·lular, l'adhesió entre cèl·lules i la integritat tissular. Quan la β-catenina migra al nucli

promou l'expressió de gens que activen el cicle cel·lular com els de la ciclina D1 o c-myc.

- **La via Hippo/Yap** és la principal encarregada de regular la mida dels òrgans mitjançant el control de la proliferació cel·lular i l'apoptosi i per tant, una de les més importants en la fase final del procés de regeneració hepàtica.

5.3. L'estrès oxidatiu i les espècies reactives d'oxigen en la regeneració hepàtica

La capacitat de regeneració del fetge és essencial per l'èxit d'alguns tractaments de les malalties cròniques del fetge com per exemple la resecció tumoral i el transplantament de fetge ja que l'eficàcia d'aquests tractaments està condicionada a una adequada regeneració hepàtica. Tot i això, hi ha situacions clíniques en les que el fetge mostra poca capacitat regenerativa com en els casos d'esteatohepatitis no alcohòlica, l'hepatitis C, la cirrosi alcohòlica o el dany hepàtic induït per fàrmacs (147,148). Un procés patològic comú a aquestes situacions clíniques és l'estrès oxidatiu, que és causat per la formació excessiva d'espècies reactives d'oxigen (ROS).

En aquests casos s'han reportat alts nivells d'estrès oxidatiu i una reducció de les defenses antioxidants (149). Aquest desajust entre la producció de ROS i la reducció de defenses antioxidants seria una de les causes per les quals la regeneració del fetge es troba afectada en aquestes situacions. En aquest sentit, s'han reportat resultats de diferents estudis que donen suport a aquesta hipòtesi com per exemple la millora de la regeneració hepàtica observada en rates al reduir la presència d'estrès oxidatiu (150) o l'augment de la regeneració hepàtica gràcies a la resposta antioxidant desencadenada pel factor Nrf2 (151). Aquests fets s'explicarien perquè ROS modula l'expressió d'una gran varietat de reguladors que tenen un paper crucial en la regeneració hepàtica com per exemple diversos factors de creixement i de transcripció, proteïnes involucrades en la regulació del cicle cel·lular com el factor Nrf2 (152), la β -catenina (153) o la ciclina-D1 (154), entre d'altres. Per tant, una bona estratègia per mirar d'incrementar la regeneració hepàtica en les situacions de dany hepàtic crònic i agut podria ser la reducció de ROS en el fetge.

6. Nanopartícules com a tractament

6.1. Ús de nanopartícules en biomedicina

En els últims anys la nanotecnologia ha ofert un ampli ventall de solucions en el camp de la biomedicina ja sigui en el tractament i el diagnòstic de patologies com en el transport i alliberament de fàrmacs en l'organisme (155,156). Aquesta ciència se centra en l'estudi de materials o partícules de dimensions inferiors als 100nm, també anomenats nanopartícules (156).

Gràcies a la gran superfície que tenen en comparació amb el seu volum, les nanopartícules, segons la seva composició, mida i forma, poden presentar unes propietats òptiques, mecàniques, magnètiques i catalítiques que els hi confereixen un gran potencial per al seu ús en biomedicina (156). També han de complir una sèrie de condicions per a poder ser emprades en usos terapèutics o de diagnòstic, com per exemple que no siguin tòxiques per l'organisme, han de ser estables i no immunogèniques (156).

La seva composició també determina la biodistribució d'aquestes dins l'organisme. S'ha de tenir en compte que el fetge actua com un sistema de filtració i per tant la majoria de les nanopartícules administrades podrien quedar retingudes en aquest òrgan (156). Per això, moltes vegades es conjuguen amb altres elements com anticossos o pèptids que assegurin una distribució focalitzada al lloc desitjat (155).

Hi ha tres tipus de nanopartícules en funció de la seva composició que s'utilitzen en biomedicina (156):

- Nanopartícules orgàniques: polímers i liposomes.
- Nanopartícules inorgàniques: metalls, òxids de metall, ceràmiques, entre altres.
- Nanopartícules de carboni.

6.2. L'òxid de ceri

El Ceri és el metall rar més abundant a la natura i pertany al grup dels lantànids (157). Amb una densitat de 6,77g/ml, una temperatura de fusió de 798°C i punt d'ebullició de 3424°C, el ceri és un metall mal·leable que a temperatura ambient s'oxida molt fàcilment (157).

L'òxid de ceri el podem trobar formant dues estructures cristal·lines diferents; l'òxid de ceri IV (CeO_2) i l'òxid de ceri III (Ce_2O_3) sent més estable a temperatura ambient l'estructura CeO_2 (158). A nivell nanoscòpic apareixen vacants d'àtoms d'oxigen en la superfície de la seva estructura modificant-ne la configuració electrònica (157–159). Aquesta característica fa que les nanopartícules d'òxid de ceri tinguin dos estats d'oxidació autoregeneratius mitjançant cicles de reaccions de reducció-oxidació: Ce^{3+} i Ce^{4+} (157,158). Aquests llocs reactius (Fig. 4) confereixen a les nanopartícules d'òxid de ceri (CeO_2NPs) propietats antioxidants ja que tenen la capacitat d'eliminar radicals lliures (molècules amb electrons no aparellats a la capa de valència i que, per tant, són altament reactives químicament) (158).

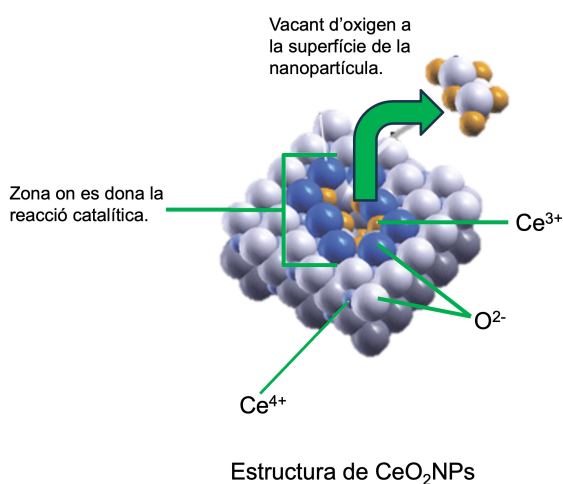


Figura 4. Estructura de CeO_2NPs . Figura adaptada a partir de Campbell C., et al. 2005 (160).

En l'organisme, els radicals lliures es produeixen en petites quantitats durant el metabolisme i poden presentar-se de diferents formes, sent les espècies reactives d'oxigen (ROS) un dels principals subproductes del metabolisme (157,158). L'excés de ROS provoca danys en l'ADN i degradació proteïnes i lípids mitjançant la seva oxidació. Aquests danys cel·lulars acaben desencadenant una resposta inflamatòria que a la vegada augmenta més els nivells de ROS (158). Per tant, l'acumulació de ROS és un procés que es retroalimenta a ell mateix si no té un control. Són enzims del propi organisme, com la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa o la peroxidasa, els encarregats d'aquest control mitjançant la modificació de l'estat electrònic de l'oxigen de les espècies reactives per transformar-les en molècules no reactives (158). En condicions patològiques però, l'increment de ROS pot ser tant elevat que els mecanismes del propi organisme per controlar-lo es vegin sobrepassats i que l'estrès oxidatiu acabi causant danys que agreugin la pròpia patologia (157,158).

En aquest sentit, les CeO₂NPs han adquirit molta rellevància en biomedicina gràcies a les seves propietats antioxidants que permeten reduir significativament la presència excessiva de ROS en condicions en què l'increment de l'estrès oxidatiu té un paper patogènic. Les CeO₂NPs poden participar en diverses reaccions imitant enzims propis de l'organisme (161,162) com la SOD, que converteix l'anió superòxid en peròxid d'hidrogen i finalment en oxigen (163); la catalasa, que converteix el peròxid d'hidrogen en oxigen i aigua (164); i la peroxidasa, que converteix el peròxid d'hidrogen en radicals hidroxils (161,162). A més, també poden reduir les espècies reactives de nitrogen (RNS) gràcies a la seva capacitat d'eliminar l'òxid nítric (157). Altres característiques que les fan atractives pel seu ús en medicina són, per una banda, el fet de tenir un cicle autoregeneratiu les CeO₂NPs que fa que no es consumeixin totalment en la reacció i puguin seguir participant en les reaccions catalítiques per continuar disminuint l'excés de ROS de forma sostinguda (158,165); i per l'altra, que gràcies a la seva estructura actuen com a tamponador aportant equilibri en l'homeòstasi entre les reaccions de reducció-oxidació, la qual cosa significa que aquestes NPs només actuen quan hi ha una sobreproducció de ROS, sent inertes en condicions fisiològiques normals en l'organisme

(158,165). La seva eliminació a llarg termini passa per ser expulsades de l'organisme en forma d'ions de ceri innocus per via hepàtica o urinària (158).

Les capacitats de les nanopartícules d'òxid ceri ja es coneixien i fa temps que s'apliquen en activitats industrials com la fabricació de cèl·lules solars, l'oxidació de combustible o la protecció contra la corrosió (157), però no va ser fins la publicació d'un estudi en el que es va demostrar que les CeO₂NPs allargaven la vida de cultius de cèl·lules cerebrals que l'aplicació d'aquestes NPs en medicina es va començar a investigar (158). A partir d'aquí s'han reportat moltes aplicacions beneficioses de les CeO₂NPs com la protecció front a la radiació en cèl·lules epitelials de mama immortalitzades, la prevenció de la degeneració de la retina induïda per peròxids intracel·lulars, efectes cardioprotectors gràcies a la supressió del procés inflamatori mitjançant la reducció de l'estrès oxidatiu del miocardi o la reducció de la hepatotoxicitat induïda per CCl₄ en ratolins (158).

A part de ser innòcues en condicions fisiològiques i la regeneració contínua de la seva capacitat catalítica (166,167), les CeO₂NPs també presenten més avantatges en comparació amb altres antioxidants. Es poden funcionalitzar i per tant dirigir de forma localitzada en l'organisme a on es vulgui que realitzin la seva activitat (165). Per tant les CeO₂NPs són un potencial agent terapèutic per la prevenció i el tractament de les malalties relacionades amb l'estrès oxidatiu.

HIPÒTESIS

Hipòtesi 1

En situacions d'estrès oxidatiu elevat en el fetge, la regeneració hepàtica es veu afectada negativament degut a que les espècies reactives d'oxigen regulen molts factors que intervenen en aquest procés. Per tant, les nanopartícules d'òxid de ceri, gràcies a les seves propietats catalítiques, poden millorar la regeneració hepàtica mitjançant la reducció dels nivells d'espècies reactives d'oxigen.

Hipòtesi 2

El factor nuclear TCF20 és una diana d'Akt molt conservada a nivell evolutiu i degut a la seva capacitat de regular l'expressió gènica de diversos factors com Sp1 i Ets1 que estan relacionats amb la síntesi del col·lagen, pot tenir diverses funcions més enllà de les descrites a la bibliografia relacionades amb la neurogènesi, inclosa la regulació de la fibrogènesi i el metabolisme.

OBJECTIUS

En el context de l'etapa avançada de la malaltia hepàtica, hi ha una substitució important d'hepatòcits funcionals per teixit fibròtic que condueixen a la degeneració de la funció i la pèrdua de mecanismes associats a la regeneració i al manteniment de l'homeòstasi hepàtica (66). Per tant, urgeix desenvolupar noves estratègies terapèutiques dirigides a millorar la regeneració hepàtica i la funció hepàtica (Objectiu 1) i obtenir nous coneixements sobre els mecanismes moleculars implicats en la progressió de la malaltia hepàtica (Objectiu 2).

1. Objectiu 1: Anàlisi de l'efecte de les CeO₂NPs en la regeneració hepàtica

1.1. Subobjectius

- Estudiar la biodistribució de les nanopartícules d'òxid de ceri.
- Analitzar l'efecte de les CeO₂NPs en la regeneració hepàtica en un model experimental d'hepatectomia parcial.
- Analitzar l'efecte de les CeO₂NPs en la regeneració hepàtica en un model experimental de dany hepàtic induït per acetaminofè.

2. Objectiu 2: Anàlisi de la deficiència de Tcf20 en ratolins i humans

2.1. Subobjectius

- Caracteritzar la deficiència de Tcf20 en ratolins.
- Estudiar si hi ha algun mecanisme mitjançant el qual la deficiència de Tcf20 en ratolins està associada a la fibrosi hepàtica.
- Entendre l'impacte de la deficiència de Tcf20 en humans.

MATERIALS, MÈTODES, RESULTATS

RESUM ESTRUCTURAT PRIMER ARTICLE

Títol: Les nanopartícules d'òxid de ceri milloren la regeneració hepàtica després d'un dany hepàtic induït per acetaminofè i hepatectomia parcial en rates

Introducció: Les nanopartícules d'òxid de ceri són agents capaços de reduir els nivells de les espècies reactives d'oxigen i s'han proposat com un potencial tractament de les malalties relacionades amb l'estrès oxidatiu. Per tant el nostre principal objectiu ha estat investigar l'efecte d'aquestes nanopartícules en la regeneració hepàtica després d'un dany hepàtic causat per una hepatectomia parcial i per sobredosi d'acetaminofè.

Mètodes: Tots els experiments in vitro s'han fet emprant cèl·lules HepG2. Pels models animals de lesió hepàtica per hepatectomia parcial i sobredosi d'acetaminofè s'han utilitzat rates Wistar dividides en 3 grups: (1) grup que rep 0.1mg/kg de nanopartícules 2 cops per setmana durant 2 setmanes abans d'aplicar la sobredosi d'acetaminofè (1g/kg), (2) grup que rep 300mg/kg de N-acetil-cisteïna 1 hora després de la sobredosi d'acetaminofè i (3) grup que rep el mateix tractament de nanopartícules abans d'una hepatectomia parcial. Cada grup es va relacionar amb un grup control al que se li administrava vehicle.

Resultats: En el grup d'hepatectomia parcial, les rates tractades amb nanopartícules d'òxid de ceri van presentar un increment significatiu de la regeneració hepàtica al comparar-les amb el grup control. En model experimental de sobredosi d'acetaminofè tant les nanopartícules com l'N-acetil-cisteïna van reduir el dany hepàtic precoç tot i que només les nanopartícules es van associar a un increment significatiu de la proliferació hepatocel·lular. El tractament amb nanopartícules també va reduir els marcadors d'estrès oxidatiu i va incrementar la progressió del cicle cel·lular en hepatòcits així com l'activació del factor de transcripció NF-KB in vitro i in vivo.

Conclusions: Els nostres resultats han demostrat que les nanopartícules d'òxid de ceri, a part de la seva coneguda activitat antioxidant, poden incrementar la proliferació hepatocel·lular en models experimentals de regeneració hepàtica i de dany hepàtic induït per fàrmacs.

RESEARCH

Open Access



Cerium oxide nanoparticles improve liver regeneration after acetaminophen-induced liver injury and partial hepatectomy in rats

Bernat Córdoba-Jover^{1†}, Altamira Arce-Cerezo^{1†}, Jordi Ribera¹, Montse Pauta¹, Denise Oro¹, Gregori Casals^{1,2}, Guillermo Fernández-Varo¹, Eudald Casals^{3,4,6}, Victor Puntès^{3,4,5}, Wladimiro Jiménez^{1,7} and Manuel Morales-Ruiz^{1,2,7*} 

Abstract

Background and aims: Cerium oxide nanoparticles are effective scavengers of reactive oxygen species and have been proposed as a treatment for oxidative stress-related diseases. Consequently, we aimed to investigate the effect of these nanoparticles on hepatic regeneration after liver injury by partial hepatectomy and acetaminophen overdose.

Methods: All the in vitro experiments were performed in HepG2 cells. For the acetaminophen and partial hepatectomy experimental models, male Wistar rats were divided into three groups: (1) nanoparticles group, which received 0.1 mg/kg cerium nanoparticles i.v. twice a week for 2 weeks before 1 g/kg acetaminophen treatment, (2) *N*-acetyl-cysteine group, which received 300 mg/kg of *N*-acetyl-cysteine i.p. 1 h after APAP treatment and (3) partial hepatectomy group, which received the same nanoparticles treatment before partial hepatectomy. Each group was matched with vehicle-controlled rats.

Results: In the partial hepatectomy model, rats treated with cerium oxide nanoparticles showed a significant increase in liver regeneration, compared with control rats. In the acetaminophen experimental model, nanoparticles and *N*-acetyl-cysteine treatments decreased early liver damage in hepatic tissue. However, only the effect of cerium oxide nanoparticles was associated with a significant increment in hepatocellular proliferation. This treatment also reduced stress markers and increased cell cycle progression in hepatocytes and the activation of the transcription factor NF- κ B in vitro and in vivo.

Conclusions: Our results demonstrate that the nanomaterial cerium oxide, besides their known antioxidant capacities, can enhance hepatocellular proliferation in experimental models of liver regeneration and drug-induced hepatotoxicity.

Keywords: Liver regeneration, Oxidative stress, Cerium oxide nanoparticles, Partial hepatectomy, Acetaminophen-induced liver injury

*Correspondence: morales@clinic.cat

[†]Bernat Córdoba-Jover and Altamira Arce-Cerezo contributed equally to this study

¹ Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic of Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd, 170 Villarroel St., 08036 Barcelona, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



Background

The liver regenerative capability is essential in the success of some treatments for chronic liver diseases, such as tumor resection and donor liver transplantation, which are conditioned by adequate liver regeneration [1, 2]. However, there are some clinical situations in which the liver shows poor regenerative capacity, such as in the case of liver cirrhosis and severe drug-induced liver injury (DILI) [3, 4].

One pathological process that is common to these two clinical conditions is oxidative stress, which is caused by the excessive formation of reactive oxygen species (ROS). The presence of oxidative stress has been described in most of the clinical conditions associated with chronic liver injury (i.e.: nonalcoholic steatohepatitis, hepatitis C viral infection, alcoholic liver cirrhosis) [5, 6]. In addition, recent reports suggest that drug-induced oxidative stress also significantly correlate with increased DILI risk [7]. Concurrently, the association between high levels of oxidative stress and a reduction of antioxidant defenses has also been reported in most of these pathological situations [8, 9]. According to the results obtained by several studies, the imbalance between the production of ROS and antioxidant defense in some of these liver diseases affects liver regeneration [10–12]. One of the reasons that explain this ROS effect is that ROS modulates the expression of a variety of regulators that play major roles in liver regeneration, including growth factors, transcription factors and cell cycle proteins such as β -catenin [13], cyclin D [14], p53 [15], Nrf2 [16] and JNK/p38 mitogen activated kinases [17].

Cerium oxide nanoparticles (CeO_2 NPs) have drawn considerable attention as a potential therapeutic tool in the prevention and treatment of oxidative stress related diseases. This interest relies on the multi-enzyme mimetic properties of CeO_2 NPs due to their unique electronic structure [18–20]. At the nanoscale, the oxygen vacancies that appear in the CeO_2 nanocrystals modify their electronic structure enabling them to participate as a catalyst in a wide range of reactions (e.g. promoting the simultaneous oxidation of Carbon Monoxide (CO) and hydrocarbons to CO_2 and the reduction of Nitrogen Oxides (NOx) to N_2 in three way catalytic converters) [21]. Similarly, in biological contexts, it has been reported that cerium oxide nanoparticles can mimic enzymatic antioxidants such as superoxide dismutase [22] and catalase [23]. The beneficial effects of CeO_2 NPs have been reported in different clinical conditions associated with excess production of ROS such as neurology [24–27], diabetes [28, 29], chronic inflammation [30], cirrhosis [31] and cancer [32–34].

Considering the above, we hypothesize that CeO_2 NPs may improve liver regeneration by scavenging ROS in

regenerative livers. To test our hypothesis we studied the hepatic regenerative process using two different rat experimental models of liver regeneration that are commonly associated with ROS production: partial hepatectomy (PHx) [35, 36] and DILI caused by acetaminophen (APAP) overdose. In the last case, the therapeutic effect of CeO_2 NPs was compared with the gold standard treatment for APAP-induced injury, *N*-acetylcysteine (NAC) [4].

Results

Characterization and biodistribution of cerium oxide nanoparticles in rats

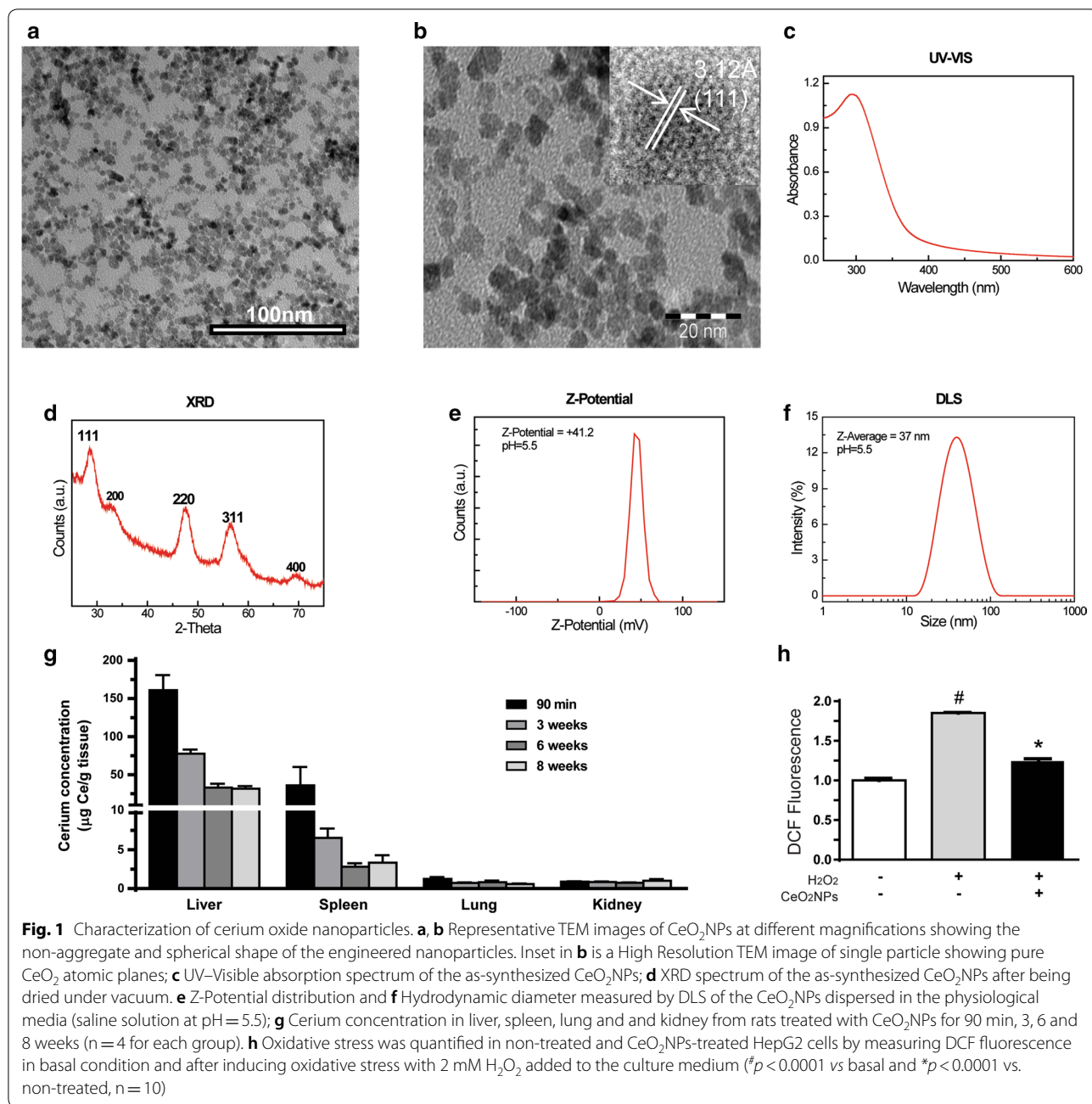
Cerium oxide nanoparticles (CeO_2 NPs) were analyzed by HR-TEM. The engineered nanoparticles showed spherical morphology (Fig. 1a, b) and were predominantly in the size range of 4 nm. The UV–visible absorption spectrum of CeO_2 NPs showed a characteristic absorption peak of Ce^{4+} at 298 nm (Fig. 1c). The X-ray diffraction pattern of the CeO_2 NPs showed pure CeO_2 NPs with the typical peak broadening characteristic of nanosize particles (Fig. 1d). Measured zeta potentials of the CeO_2 NPs were (+) 41.2 mV (Fig. 1e). The hydrodynamic diameter of the CeO_2 NPs dispersed in saline solution at pH=5.5 was 37 nm (Fig. 1f). These optimally engineered nanoceria were used further in our animal studies.

Several studies have described that after systemic distribution small inorganic NPs accumulate in the liver and spleen [31, 37]. In agreement, CeO_2 NPs treated rats showed CeO_2 NPs retention into the liver and, to a lesser extent, in spleen as early as 90 min following i.v. injection. In these organs and at this time point, CeO_2 NPs reached concentrations of 160.9 μg and 36.0 μg of CeO_2 NPs per gram of tissue, respectively (Fig. 1g). Interestingly, cerium was still detected in liver and spleen for over 8 weeks although in lower concentrations. CeO_2 NPs retention was barely detected in the lungs and the kidneys of the rats at different time points after the intravenous injection (Fig. 1g).

To investigate the antioxidant properties of CeO_2 NPs, we induced oxidative stress in the hepatocyte cell line HepG2 by H_2O_2 treatment, as previously reported [38, 39]. ROS were assessed in these cells by using the dichlorofluorescein (DCF) assay [31]. When exposed to H_2O_2 , CeO_2 NPs-treated HepG2 cells showed a significant reduction in the accumulation of DCF in comparison to that observed in non-treated cells (Fig. 1h).

Rats treated with CeO_2 NPs showed increased liver regeneration and hepatocellular proliferation after PHx

Oxidative stress mediate cell growth arrest and impairs hepatic regeneration in mice [13, 14]. Therefore, testing new anti-oxidant drugs to improve liver regeneration



has clinical interest. To this aim, we studied the effect of CeO₂NPs treatment on liver regeneration after performing PHx in rats. Rats were treated with 0.1 mg/kg CeO₂NPs intravenously twice a week for 2 weeks before PHx. As shown in Fig. 2a, we did not observe any substantial change in body weight between the groups without treatment, vehicle treatment, and CeO₂NPs treatment. Also, we performed liver laboratory tests in rat serum to quantify the liver function (glucose and albumin) and the liver damage (ALT and AST) in response to the CeO₂NPs

treatment in rats that were fasted for 12 h. We did not detect any significant change of these laboratory parameters between vehicle and CeO₂NPs treated groups (Additional file 1: Figure S1). These results support the concept that the CeO₂NPs pretreatment is safe for the liver and is not associated with detectable side effects in the short term. Rats were sacrificed 6 days after the surgical procedure and the wet liver remnant weight/total body weight ratio was used to calculate the hepatic regenerative index. Rats treated with CeO₂NPs showed a significant

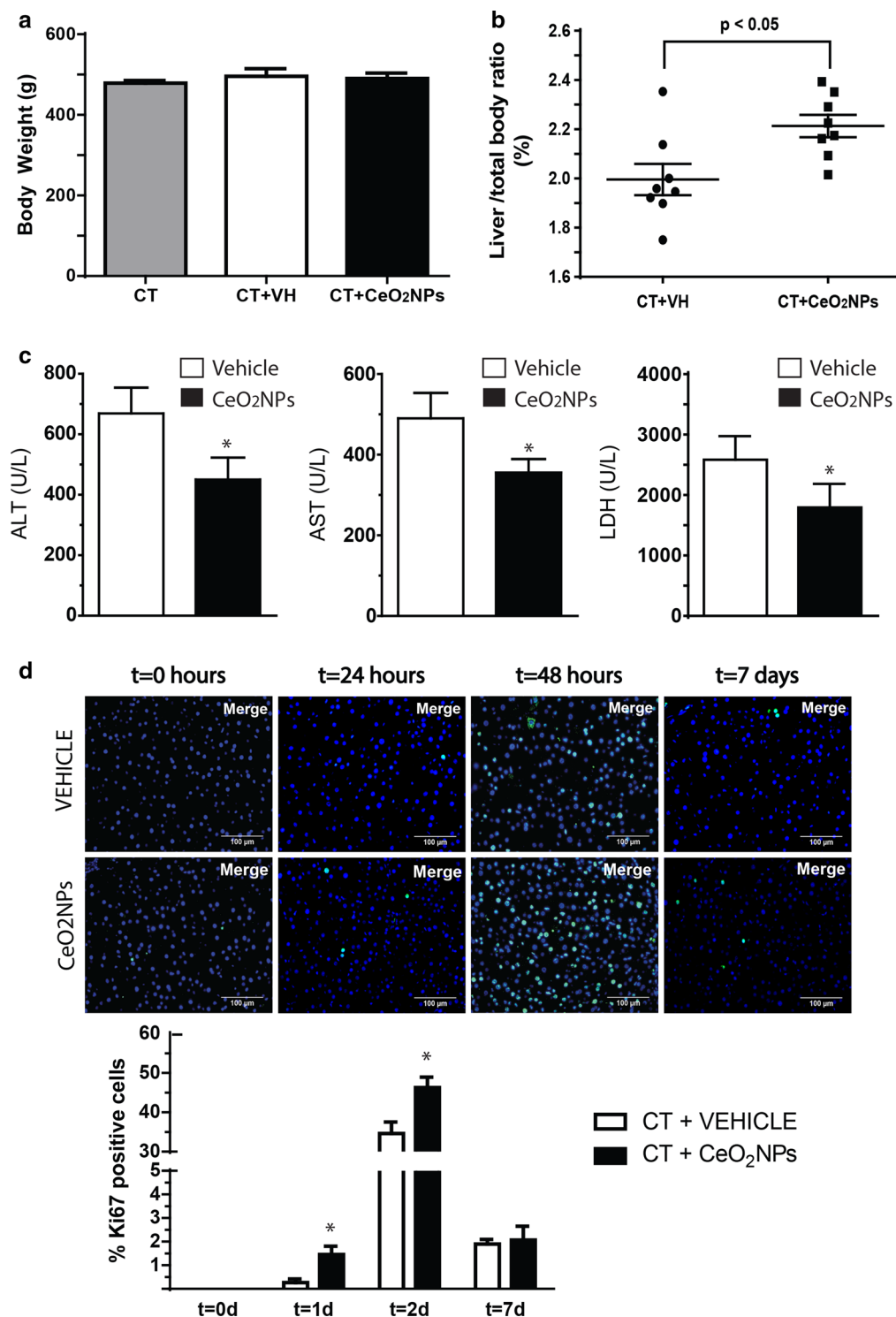


Fig. 2 CeO₂NPs treatment increased liver regeneration and cell proliferation after PHx. **a** Body weights of control rats without treatment and rats that received vehicle or CeO₂NPs before PHx (n = 8). **b** Hepatic regenerative index at day 6 after PHx (n = 8, p < 0.05). **c** Blood levels of ALT (*p < 0.01), AST (*p < 0.05) and LDH (*p < 0.05) in vehicle or CeO₂NPs-treated rats after 3 h post-PHx (n = 8; mean ± SEM). **d** Representative immunostaining for the Ki-67 antigen in liver histological sections of rats treated with either vehicle or CeO₂NPs at different time points (t = 0 h, 24 h, 48 h, 7 days). Merged images show co-localization of Ki-67 (green) and nuclear DNA (DAPI, blue). Original magnification ×200 (n = 8 for each group and treatment). On the bottom, percentage quantification of positive Ki-67 liver cells for each time point and treatment (n = 8; mean ± SEM; *p < 0.05 compared with vehicle at the same time points)

11% increase in the hepatic regenerative index, compared with vehicle-treated rats ($p < 0.05$) (Fig. 2b). The beneficial effect of CeO₂NPs on liver regeneration was also accompanied by lower blood levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) after 3 h post-PHx and compared with the vehicle group (Fig. 2c).

To further investigate the cause through which CeO₂NPs improves liver regeneration, we assessed the expression of the cell proliferation marker Ki67 in liver sections of rats treated with nanoparticles. Rats receiving vehicle or CeO₂NPs showed absence of hepatocellular proliferation in resting livers ($t = 0$ h) (Fig. 2d). However after PHx, the remnant liver from rats treated with CeO₂NPs showed a significant increase in Ki67⁺-hepatocytes at day 1 ($*p < 0.05$, $t = 24$ h) that reached a maximum at $t = 48$ h after partial hepatectomy, compared with vehicle ($44.6 \pm 4.5\%$ vs. $38.5 \pm 6.7\%$ Ki67⁺ cells, $*p < 0.05$, $t = 48$ h); returning to nearly basal levels after 7 days (Fig. 2d). Therefore, improvement of liver regeneration caused by the CeO₂NPs treatment is associated with enhanced hepatocyte proliferation.

CeO₂NPs treated rats showed decreased liver damage and increased hepatocellular proliferation after acetaminophen-induced liver injury

The previous results show us the role played by CeO₂NPs on liver regeneration in the context of basal levels of ROS. Next we assessed whether CeO₂NPs is equally effective after ROS induction caused by APAP toxicity. In this experimental model, excessive oxidative stress plays a major role in APAP hepatotoxicity [40]. The injury induced after 48 h of APAP administration was assessed in three experimental groups: rats previously treated with CeO₂NPs, rats receiving vehicle and rats receiving a simultaneous treatment with NAC, which is the accepted clinical treatment for APAP overdose. Hematoxylin–eosin staining of livers from rats belonging to the vehicle experimental group showed that APAP administration induced severe liver injury characterized by massive necrosis, hepatocyte vacuolation and vascular congestion. Liver injury was significantly reduced in the NAC and the CeO₂NPs-treated groups, although vascular congestion was still present in both groups despite the NAC and the CeO₂NPs treatments (Fig. 3a). As expected, APAP treatment induced a significant increase in hepatic ROS that was quantified by measuring 4-hydroxynonenal in the liver tissue (HNE), a widely accepted marker of lipid peroxidation and oxidative damage. Interestingly, both NAC (Fig. 3b second bar in the graph) and CeO₂NPs (Fig. 3b third bar in the graph) are equally effective as antioxidant treatments for treating APAP-induced oxidative stress when compared with the vehicle condition

(Fig. 3b first bar in the graph). Despite sharing beneficial antioxidant properties, NAC and CeO₂NPs treatments differed in their capability of stimulating hepatocellular proliferation. The liver from rats treated with CeO₂NPs showed an extensive positivity for Ki67, compared with vehicle and NAC treated rats at day 2 after APAP injection ($40.08 \pm 5.04\%$, $10.70 \pm 1.69\%$ and $13.53 \pm 3.13\%$ Ki67⁺ cells, respectively; $p < 0.05$) (Fig. 3c).

We performed additional experiments to characterize better the liver injury induced by APAP and the degree of recovery of the different experimental groups. To this end, we quantified the serum concentration of transaminases (ALT, AST), glucose and albumin from CeO₂NPs-treated and vehicle-treated rats at $t = 0$ h, $t = 48$ h, and $t = 96$ h. We found that the concentration of transaminases was significantly increased to a similar extent in the vehicle and the CeO₂NPs-treated groups 2 days after APAP administration ($t = 48$ h compared with $t = 0$ h). However, CeO₂NPs treatment was associated with a significant decline in serum ALT, reaching basal levels at 96 h after the APAP injection; compared with the vehicle group (Additional file 1: Figure S2). This recovery phase marker, which is a more specific marker of liver injury than AST, points to a more efficient recovery of the CeO₂NPs-treated liver after drug-induced liver damage.

CeO₂NPs treatment stimulates cell cycle progression in HepG2 cells and NFκB activation in vitro and in vivo

To ensure the generalization of the finding that CeO₂NPs improves hepatocyte proliferation in vivo after PHx and APAP-induced toxicity in rats, we characterized the dynamics of the cell cycle in the human hepatocyte cell line HepG2. As shown in Fig. 4a, CeO₂NPs treatment significantly decreased the percentage of HepG2 cells that underwent apoptosis following 48 h of serum starvation, as detected by propidium iodide staining and flow cytometry. Moreover, CeO₂NPs treatment was associated with a higher percentage of HepG2 cells that were in the G2/M phase of the cell cycle, reflecting the stimulatory role played by CeO₂NPs on cell cycle progression. We further validate these observations in the HepG2 cells by quantifying active caspase-3 and cyclin D1 (markers of apoptosis and cell cycle progression, respectively). CeO₂NPs treatment of HepG2 cells reduced the amount of activated caspase-3 and increased the levels of cyclin D1 following 48 h of serum starvation (Fig. 4b).

The NF-κB/Rel family of transcription factors (NFκB) is a central hub of signaling pathways that regulates apoptosis and cell proliferation. In addition, the activity NFκB is modulated by ROS [41–43]. These confluent evidences let us to assess whether the activity of NF-κB is affected by the CeO₂NPs treatment in vitro and in vivo. In HepG2

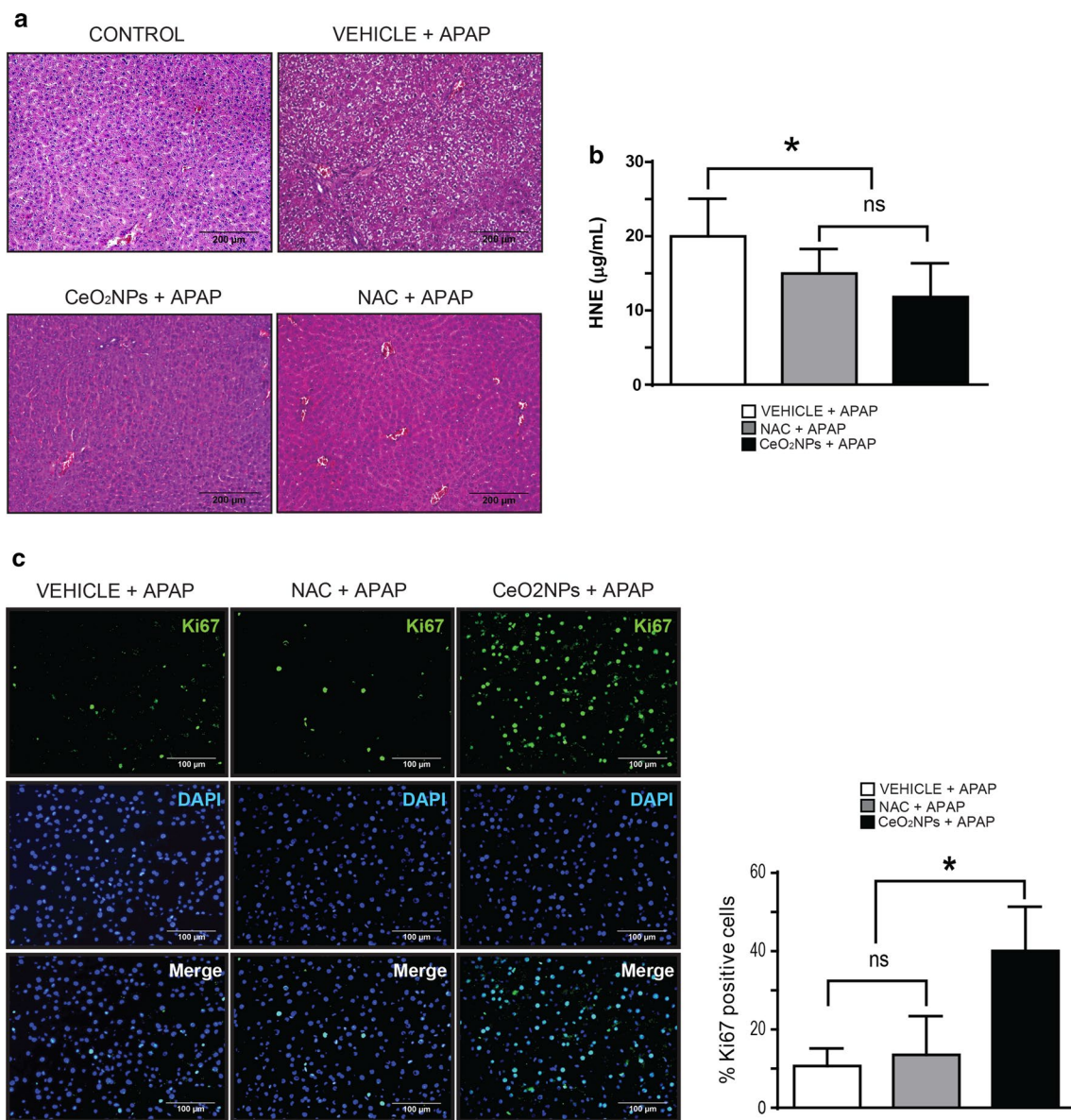
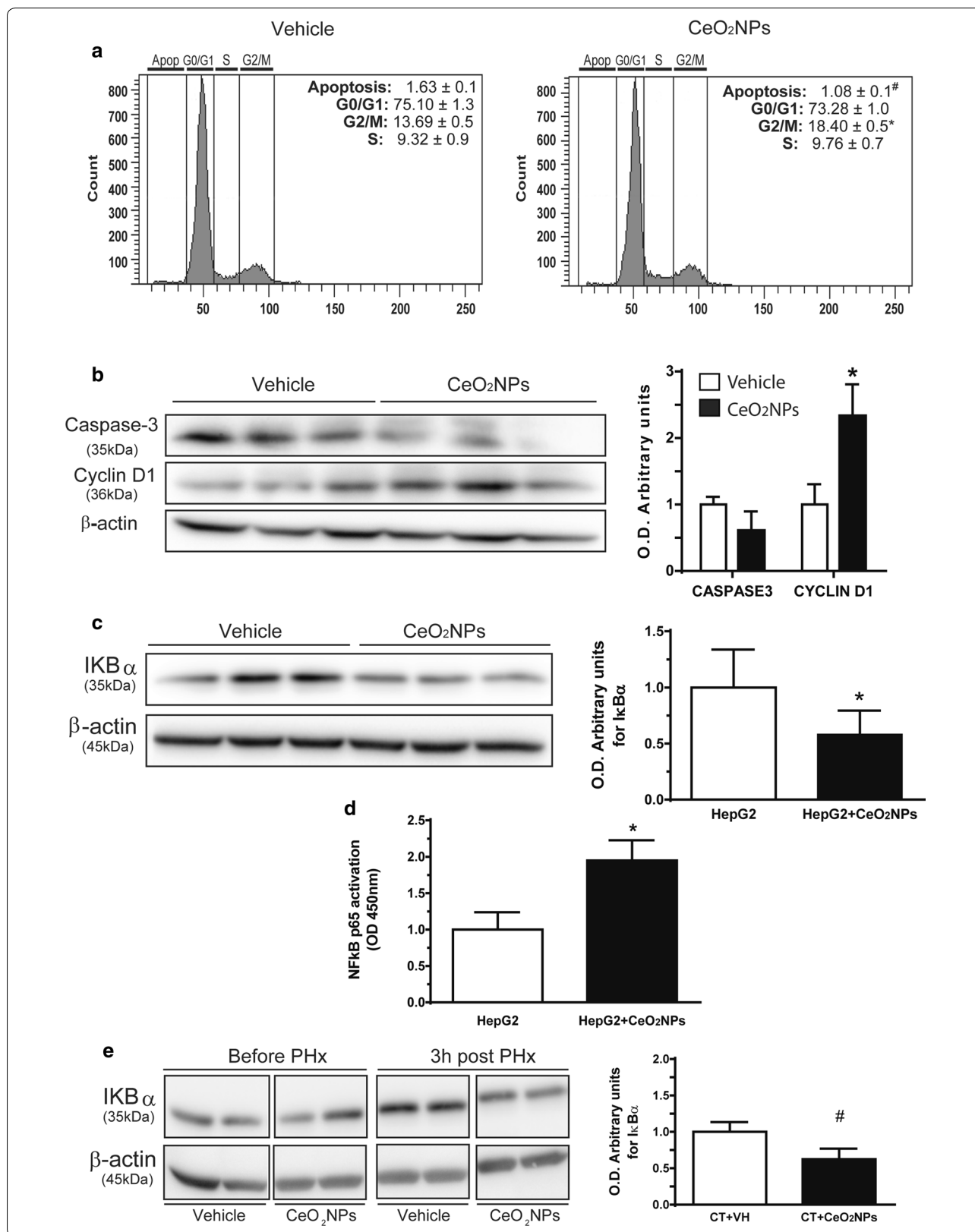


Fig. 3 CeO₂NPs treatment reduces histological damage and increases cell proliferation after APAP-induced injury. **a** Hematoxylin-eosin stained liver sections (n = 13). After vehicle or CeO₂NPs treatments, rats received 1 g/kg APAP and were sacrificed after 48 h (vehicle + APAP and CeO₂NPs + APAP, respectively). Another group was treated with 300 mg/kg NAC 1 h after APAP (NAC + APAP). Also, healthy non-treated rats were included as experimental controls (upper left panel), ×100. **b** Quantification of HNE in liver from vehicle + APAP, NAC + APAP and CeO₂NPs + APAP groups (n = 13; mean ± SEM; *p < 0.05). **c** Immunostaining for Ki-67 in liver of rats treated with vehicle + APAP, NAC + APAP and CeO₂NPs + APAP. Ki-67 (green) and DAPI (blue), ×200. On the right, quantification of Ki-67 positive cells (n = 13; mean ± SEM; *p < 0.05)

(See figure on next page.)

Fig. 4 CeO₂NPs stimulates cell cycle progression and NF-κB activation. **a** Flow cytometry of HepG2 showing cell cycle profiles from propidium iodide DNA staining after vehicle or CeO₂NPs treatment (n = 5; #p < 0.01 and *p < 0.05). **b** Western blot for activated caspase 3 and cyclin D1 abundance from HepG2 incubated with vehicle or CeO₂NPs. β-actin was used as loading control (mean ± SEM; n = 5; *p < 0.05 versus vehicle in the same experimental condition). O.D.: optical density. **c** Western blot for IκBα abundance from HepG2 (mean ± SEM; n = 5; *p < 0.05). **d** Transcription factor immunosorbent assay for NF-κB (p65) activity in HepG2 (n = 5, *p < 0.05). **e** Western blot for IκBα abundance in the liver vehicle and CeO₂NPs-treated rats before and 3 h post-PHx (mean ± SEM; n = 5; #p < 0.01)



cells treated with CeO₂NPs, the abundance of IκBα (that function as an inhibitor of NFκB) significantly decreased when compared to vehicle-treated HepG2 cells ($p < 0.05$) (Fig. 4c). Next, the transcriptional activity of NF-κB was assessed by detecting specific p65 DNA binding in nuclear extracts from CeO₂NPs treated and non-treated HepG2 cells. As shown in Fig. 4d, CeO₂NPs treated cells showed increased p65 transcriptional activity compared with non-treated HepG2 cells ($p < 0.05$). We next investigated whether the described stimulation of NF-κB activity by CeO₂NPs was also detected in regenerative livers in vivo. Before PHx, there were no differences in the expression of IκBα in the livers from vehicle or CeO₂NPs treated rats. However, and in agreement with the results obtained in HepG2, the abundance of IκBα was significantly lower in the livers from CeO₂NPs treated rats 3 h after PHx, compared with the group of rats receiving vehicle ($p < 0.01$) (Fig. 4e).

Discussion

We previously described that CeO₂NPs showed hepatoprotective activity in vivo against fibrosis [31]. Another study also demonstrated the beneficial effects of these nanoparticles against hepatic oxidative damage caused by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline, which causes oxidative vascular damage in the liver [44]. Considering this hepatoprotective role of CeO₂NPs, we further investigated whether these nanoparticles might also stimulate other hepatoprotective functions, such as liver regeneration. In the present study we describe for the first time that CeO₂NPs stimulate liver regeneration in the rat experimental models of partial hepatectomy and DILI caused by acetaminophen overdose. Consistently with this observation, we demonstrated that CeO₂NPs treatment decreases liver damage after PHx and APAP-induced liver injury. The treatment with CeO₂NPs also leads to the reduction of oxidative stress markers and stimulates the cell cycle progression in hepatocytes and the activation of the transcription factor NF-κB in vitro and in vivo.

It is known that excess of oxidative stress inhibits efficient regeneration after partial hepatectomy or acute liver failure caused by DILI. For example, the genetic deficiency of Nrf2 (a regulator of the cellular antioxidant response) and UCP2 (an uncoupling protein of the electron transport chain) cause enhanced oxidative stress and impaired liver regeneration in partially hepatectomized mice [43]. Moreover, oxidative cellular damage in mitochondria and DNA is associated with deficient liver regeneration after acetaminophen toxicity [45]. Therefore, several strategies have been investigated by others to diminish ROS in the context of liver regeneration in pre-clinical models. For example, thymoquinone, an essential

oil with free radical scavenging capacity, protects rat liver against ischemia/reperfusion injury [46] and prevents liver injury in hepatectomized mice under I/R by blunting oxidative stress, mitochondrial damage, endoplasmic reticulum stress and apoptosis [47]. Exogenous administration of GSH or resveratrol significantly decreased oxidative stress and protect against APAP-induced liver injury [48, 49]. Similarly, pharmacological inhibition of JNK activity, which enhances mitochondrial-derived ROS production upon APAP toxicity, reduced liver damage [50]. Some drugs approved for its clinical use in different pathologies have also been tested pre-clinically for APAP hepatotoxicity. Both methylene blue and metformin reduced mitochondrial oxidant stress [51] and protected against APAP liver injury [52].

Our study has potential limitations regarding the APAP-induced toxicity model in rats. It has been shown that rats are more resistant to acetaminophen damage than mice [53]. Despite this observation, the presence of oxidative stress in the APAP-induced toxicity model in rats has broadly been demonstrated [54–56], regardless of the severity of the injury between species. Therefore, this experimental model in rats is still valid to test the antioxidant properties of CeO₂NPs treatment on liver regeneration after drug-induced injury. Regarding the metabolism of APAP in the rat liver, we found in our study that the concentration of transaminases was significantly increased to a similar extent in the vehicle and the CeO₂NPs-treated groups 2 days after APAP administration. This result confirmed that there is significant toxicity induced by APAP overdose in our experimental rat model and that the CeO₂NPs pretreatment does not modify the metabolism of APAP in the liver. Nevertheless, the quantification of an intermediary metabolite of APAP (i.e., *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine) would have supported more robustly this conclusion.

Our study presents an innovative treatment for diminish ROS in the context of liver regeneration using nanoparticles. Some of the advantages of using CeO₂ nanomaterials over the traditional anti-oxidative drugs are: (1) minimal toxicity in cumulative doses [57, 58], (2) the multi-enzyme mimetic activities of CeO₂NPs, which targets several sources of ROS generation and (3) the continuous regeneration of the CeO₂NPs catalytic activity, which avoids the exhaustion of its anti-oxidative properties [58]. Among these theoretical benefits over traditional drugs, we also observed superior therapeutic performance compared with the gold standard treatment used for acetaminophen toxicity in patients, NAC. In our study, CeO₂NPs treatment is equally effective reducing oxidative stress and tissue damage in rats receiving APAP overdose compared with NAC. However, while NAC did not affect hepatocyte proliferation in injured livers,

CeO₂NPs robustly increased cell proliferation *in vivo* and *in vitro*. In addition, we observed a significant decrease in the percentage of CeO₂NPs-treated HepG2 cells that underwent apoptosis following 48 h of serum starvation, suggesting that the anti-apoptotic effect associated to the nanoceria treatment may also contribute to enhance liver regeneration.

NF-κB plays a major role in liver homeostasis and liver regeneration. For instance, NF-κB (p65) knockout mice show embryo lethality and display massive hepatocyte apoptosis [59]. In addition, the transduction of rat livers with different forms of IκB, an inhibitor of NF-κB activity, before PHx was associated with impaired liver regeneration [60]. Furthermore, the inactivation of NF-κB in Kupffer cells as well as in hepatocytes impaired the regenerative process after PHx [61]. Here, we demonstrated that the treatment with CeO₂NPs lead to the activation of the transcription factor NF-κB *in vitro* and *in vivo*. Our results are not sufficient to establish a robust link between NF-κB activation and the beneficial effects of CeO₂NPs treatment on liver regeneration yet. However, the agreement between our findings and the studies mentioned above make this relationship plausible.

It has been described that oxidative stress can inhibit the transcriptional activity of NFκB through different mechanisms including direct interaction with NF-κB, inactivation of IKK (an IκB repressor), and alternative inhibitory phosphorylation of IκBα [41]. Our *in vitro* and *in vivo* results showed that CeO₂NPs are associated with a significant decrease in the intracellular IκBα content, which is translated in the activation of NF-κB. Therefore, our findings suggest that the anti-oxidant property of CeO₂NPs is responsible for the increase in NF-κB activation. However, our results are in disagreement with other studies which have shown that CeO₂NPs treatment inhibits NF-κB *in vivo* mostly in the pathological context of sepsis [62–64]. One of the reasons that may explain the seemingly contradictory findings is differences in the CeO₂NPs stability used in these studies, what has been recently recognized as key in order to employ CeO₂NPs for medicine [22]. In addition, these studies used higher *in vivo* doses of CeO₂NPs compared with ours (from 0.5 mg/kg to 3.5 mg/kg b.w. compared with 0.1 mg/kg b.w.). Our previous dosage standardization experiments [31] indicate that at higher doses CeO₂NPs shows a hormetic-like dose response characterized by an increasing dose inefficacy in ROS scavenging.

Conclusions

In summary, drug-induced hepatotoxicity and impaired liver regeneration are major concerns in medical practice as they are leading causes of acute liver failure and liver transplantation. Our results demonstrated that CeO₂NPs,

besides their known antioxidant capacities, can enhance liver regeneration in experimental models that replicate these two clinical scenarios. Hence, CeO₂NPs treatment may provide avenues to overcome deficient liver regeneration in patients.

Methods

Synthesis and characterization of CeO₂NPs

CeO₂NPs were synthesized by the chemical precipitation of cerium (III) nitrate hexahydrated (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in aqueous solution, as reported elsewhere [19]. Controlling the pH of synthesis, small-sized nanoceria can be obtained. Here, we used 4 nm nanoparticles at a concentration of 1 mg/mL. The surface charge of the NPs was characterized by the Z-potential in a Z-sizer (Malvern, Worcestershire, UK) while the crystal size was characterized by High Resolution Transmission Electron Microscopy (HR-TEM) in the Tecnai G2 F20 (FEI, Oregon, USA). Nanocrystalline morphology and composition was analyzed by HR-TEM (Tecnai 200 kV) and XRD (Xpert Pannalytical, MA, USA), and the light interaction by UV–VIS spectroscopy (Shimadzu, Kyoto, Japan). Size distribution was computer analyzed by ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). CeO₂NPs were stabilized with Tetramethylammonium hydroxide (TMAOH), which was used as vehicle in all the experiments as a control condition, and kept at 4 °C until use. Prior to the animal studies, 15 μL from the nanoparticles solution were dispersed on a copper grid coated with a formvar film. The samples were then let to dry for TEM observation and digital photomicrographs were taken (BioScan Gatan, CA, USA). Free CeO₂NPs samples available for evaluation if requested.

Animal experimentation and *In vivo* CeO₂NPs treatment

This study was performed in male Wistar rats (Charles-River, Saint Aubin les Elseuf, France). Rats were fed with standard chow diet and housed on a 12 h light/12 h dark cycle. For each experiment of this study, treated rats were administered 0.1 mg/kg CeO₂NPs dispersed in saline solution as a bolus (500 μL), given intravenously through the tail vein twice a week for 2 weeks. Control groups without treatment and treated with vehicle (TMAOH) were also included in the study. At the end of each experiment rats were euthanized by isoflurane anesthesia overdose.

CeO₂NPs tissue quantification

For tissue quantification, at the end of the 2 weeks treatment, rats were euthanized at days 1, 21, 42, and 56 (90 min, 3, 6 and 8 weeks respectively) and their livers, spleens, lungs and kidneys dissected and kept at – 80 °C for further analysis. For CeO₂NPs quantification, samples

were diluted in an aqueous solution of HNO₃ 2% w/w (Trace Metal Basis; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and analyzed for cerium concentration by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Agilent 7500; Agilent Technologies, California, USA). The quantitative results were obtained by interpolation in a standard curve obtained from a commercial 1000 ppm Ce standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Reactive oxygen species quantification

Reactive oxygen species were measured by fluorescence spectrophotometry using 2',7'-DCF-DA as a probe. For these experiments, HepG2 cells alone or treated with H₂O₂ in the presence or absence of CeO₂NPs were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with 10 μM DCF-DA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) for 40 min at 37 °C in the dark. The supernatant was collected to measure the extracellular production of ROS, and the intensity of fluorescence was immediately read in a fluorescence spectrophotometer (FLUOstar Optima; BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at 485 nm for excitation and at 520 nm for emission.

In vitro CeO₂NPs treatment

The human cell line HepG2 (a suitable in vitro model system for the study of polarized human hepatocytes) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). HepG2 cells were cultured and maintained in DMEM containing 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were serum-starved and treated with 0.1 mg/mL CeO₂NPs, or vehicle as a control condition, for 48 h.

Measurement of NF-κB activation

NF-κB activity in HepG2 cells was measured using a NF-κB Transcription Factor Assay Kit (specific for p65), following the manufacturer's instructions (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). To this end, nuclear extracts from HepG2 were incubated with double stranded DNA immobilized in a 96-well plate that contained the κB response motif site. The complex p65-DNA was detected by enzyme-linked immunosorbent assay using specific primary antibody directed against p65 and a secondary antibody conjugated to HRP. The results were quantified by measuring absorbance at 450 nm in a FLUOstar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

Statistical analysis

Quantitative data were analyzed using GraphPad Prism, version 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA,

USA) and public libraries from The Comprehensive R Archive Network (CRAN; <http://CRAN.R-project.org>) rooted in the open source statistical computing environment R, version 3.4 (<http://www.R-project.org/>). The statistical analysis of the results was performed using unpaired Student's t-tests and ANOVA models (with Tukey's post hoc test) with normally distributed data. For other type of data, the Mann–Whitney U-test and the Kruskal–Wallis tests (with Dunn post hoc test) were used. Results are expressed as mean ± sem and considered significant at a p value lower than 0.05.

Additional Materials and Methods are shown in Additional file 1. Free CeO₂NPs samples available for evaluation if requested.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0544-5>.

Additional file 1. Additional materials and methods, additional figures and references.

Abbreviations

CeO₂NPs: cerium oxide nanoparticles; PHx: partial hepatectomy; APAP: acetaminophen; NAC: N-acetyl-cysteine; DILI: drug-induced liver injury; ROS: reactive oxygen species; DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium; PBS: phosphate-buffered saline; DCF: dichlorofluorescein; HNE: 4-hydroxynonenal; PI: propidium iodide; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; LDH: lactate dehydrogenase.

Acknowledgements

We thank Ministerio de Economía y Competitividad, Fundació La Marató de TV3 and CIBERhd (Instituto de Salud Carlos III) for the grants and financial support to this research.

Authors' contributions

BC-J: experiments, procedures and writing of article; AA-C: experiments, procedures and writing of article; JR: experiments and generation of experimental models; MP: generation of experimental models; DO: experiments, GC: measurement of biochemical parameters, GF-V: measurement of biochemical parameters, EC: synthesis of CeO₂NPs and writing of article, VP: synthesis of CeO₂NPs and writing of article, WJ: concept, design and writing of article; MM-R: concept, design, experiments and writing of article. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This research was supported by grant from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (SAF2016-75358-R to MM-R), co-financed by FEDER, European Union, a way of making Europe; Grant from the Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (PI15/00777 to GC); Grant from Wuyi University Funding for Hight Talents Introduction (2018TP010 to EC); Grant from Department of Education of Guangdong Province (2017KSYS010 to EC) and Fundació La Marató de TV3 (Marató 120930 to WJ). CIBERhd is financed by Instituto de Salud Carlos III.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study is available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

All animals received human care and all procedures were approved by the Investigation and Ethics Committee of Animal Experimentation of the University of Barcelona.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic of Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd, 170 Villarroel St., 08036 Barcelona, Spain. ² Working Group for the Biochemical Assessment of Hepatic Disease-SEQC-ML, Barcelona, Spain. ³ Vall d'Hebron Institut of Research (VHIR), Barcelona, Spain. ⁴ Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (ICN2), CSIC and The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Barcelona, Spain. ⁵ Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain. ⁶ School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, Jiangmen 529020, China. ⁷ Department of Biomedicine-Biochemistry Unit, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Received: 25 March 2019 Accepted: 18 October 2019

Published online: 31 October 2019

References

- Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006;43:S45–53.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science*. 1997;276:60–6.
- Cho Lam Wong T, Mau Lo C. Resection strategies for hepatocellular carcinoma preoperative evaluation of liver function clinical and biochemical tests. *Semin Liver Dis*. 2013;33:273–81.
- Wendon J, Córdoba J, Dhawan A, et al. EASL Clinical Practical Guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure. *J Hepatol*. 2017;66:1047–81.
- Morales-Ruiz M, Rodríguez-Vita J, Ribera J, Jiménez W. Pathophysiology of portal hypertension. *Panvascular medicine*. Berlin: Springer; 2015. p. 3631–65.
- Ezhilarasan D. Oxidative stress is bane in chronic liver diseases: clinical and experimental perspective. *Arab J Gastroenterol*. 2018;19:56–64.
- Xu JJ, Henstock PV, Dunn MC, Smith AR, Chabot JR, De Graaf D. Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury. *Toxicol Sci*. 2008;105:97–105.
- Li S, Tan H-Y, Wang N, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16:26087–124.
- Kaffe ET, Rigopoulou EI, Koukoulis GK, Dalekos GN, Moulas AN. Oxidative stress and antioxidant status in patients with autoimmune liver diseases. *Redox Rep*. 2015;20:33–41.
- Ben Mosbah I, Duval H, Mbatchesi S-F, et al. Intermittent selective clamping improves rat liver regeneration by attenuating oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1107.
- Dayoub R, Vogel A, Schuett J, et al. Nrf2 activates augmenter of liver regeneration (ALR) via antioxidant response element and links oxidative stress to liver regeneration. *Mol Med*. 2013;19:237–44.
- di Bello G, Vendemiale G, Bellanti F. Redox cell signaling and hepatic progenitor cells. *Eur J Cell Biol*. 2018;97:546–56.
- Sun S, Xie F, Xu X, et al. Advanced oxidation protein products induce S-phase arrest of hepatocytes via the ROS-dependent, β -catenin-CDK2-mediated pathway. *Redox Biol*. 2018;14:338–53.
- Barnouin K, Dubuisson ML, Child ES, et al. H_2O_2 induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J Biol Chem*. 2002;277:13761–70.
- Geng Y, Zhang C, Lei J, et al. Walsuronoid B induces mitochondrial and lysosomal dysfunction leading to apoptotic rather than autophagic cell death via ROS/p53 signaling pathways in liver cancer. *Biochem Pharmacol*. 2017;142:71–86.
- Murakami S, Motohashi H. Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation. *Free Radic Biol Med*. 2015;88:168–78.
- Tormos AM, Taléns-Visconti R, Nebreda AR, Sastre J. p38 MAPK: a dual role in hepatocyte proliferation through reactive oxygen species. *Free Radic Res*. 2013;47:905–16.
- Esch F, Fabris S, Zhou L, et al. Electron localization determines defect formation on ceria substrates. *Science*. 2005;309:752–5.
- Cafun J-D, Kvashnina KO, Casals E, Puentes VF, Glatzel P. Absence of Ce^{3+} sites in chemically active colloidal ceria nanoparticles. *ACS Nano*. 2013;7:10726–32.
- Wang Z, Shen X, Gao X, Zhao Y. Simultaneous enzyme mimicking and chemical reduction mechanisms for nanoceria as a bio-antioxidant: a catalytic model bridging computations and experiments for nanozymes. *Nanoscale*. 2019;11:13289–99.
- Montini T, Melchionna M, Monai M, Fornasiero P. Fundamentals and catalytic applications of CeO_2 -based materials. *Chem Rev*. 2016;116:5987–6041.
- Heckert EG, Karakoti AS, Seal S, Self WT. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials*. 2008;29:2705–9.
- Pirmohamed T, Dowding JM, Singh S, et al. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem Commun*. 2010;46:2736–8.
- D'Angelo B, Santucci S, Benedetti E, et al. Cerium oxide nanoparticles trigger neuronal survival in a human Alzheimer disease model by modulating BDNF pathway. *Curr Nanosci*. 2009;5:167–76.
- Kim CK, Kim T, Choi I-Y, et al. Ceria nanoparticles that can protect against ischemic stroke. *Angew Chemie Int Ed*. 2012;51:11039–43.
- Ranjbar A, Soleimani Asl S, Firozian F, et al. Role of cerium oxide nanoparticles in a paraquat-induced model of oxidative stress: emergence of neuroprotective results in the brain. *J Mol Neurosci*. 2018;66:420–7.
- Kalashnikova I, Mazar J, Neal CJ, et al. Nanoparticle delivery of curcumin induces cellular hypoxia and ROS-mediated apoptosis via modulation of Bcl-2/Bax in human neuroblastoma. *Nanoscale*. 2017;9:10375–87.
- Pourkhalili N, Hosseini A, Nili-Ahmadabadi A, et al. Biochemical and cellular evidence of the benefit of a combination of cerium oxide nanoparticles and selenium to diabetic rats. *World J Diabetes*. 2011;2:204–10.
- Khurana A, Tekula S, Godugu C. Nanoceria suppresses multiple low doses of streptozotocin-induced Type 1 diabetes by inhibition of Nrf2/NF- κ B pathway and reduction of apoptosis. *Nanomedicine*. 2018;13:1905–22.
- Niu J, Azfer A, Rogers LM, Wang X, Kolattukudy PE. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2007;73:549–59.
- Oró D, Yudina T, Fernández-Varo G, et al. Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal hypertension and display anti-inflammatory properties in rats with liver fibrosis. *J Hepatol*. 2016;64:691–8.
- Alili L, Sack M, Karakoti AS, et al. Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions. *Biomaterials*. 2011;32:2918–29.
- Nourmohammadi E, Khoshdel-sarkarizi H, Nedaenia R, et al. Evaluation of anticancer effects of cerium oxide nanoparticles on mouse fibrosarcoma cell line. *J Cell Physiol*. 2019;234:4987–96.
- Li H, Liu C, Zeng Y-P, et al. Nanoceria-mediated drug delivery for targeted photodynamic therapy on drug-resistant breast cancer. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8:31510–23.
- Alizai PH, Bertram L, Fragoulis A, et al. In vivo imaging of antioxidant response element activity during liver regeneration after partial hepatectomy. *J Surg Res*. 2016;206:525–35.
- Guerrieri F, Vendemiale G, Grattagliano I, Cocco T, Pellicchia G, Altomare E. Mitochondrial oxidative alterations following partial hepatectomy. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:34–41.
- Comenge J, Sotelo C, Romero F, et al. Detoxifying antitumoral drugs via nanoconjugation: the case of gold nanoparticles and cisplatin. *PLoS ONE*. 2012;7:e47562.
- Ling Liao L, Suzana M, Ghani Nur Azurah A, Hui Chua K. Hydrogen peroxide induces acute injury and up-regulates inflammatory gene expression in hepatocytes: an in vitro Model. *Sains Malaysiana*. 2016;45:451–8.
- Jiang C, Yu S, Jiang Z, et al. N-acetyl-serotonin protects HepG2 cells from oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide. *Oxid Med Cell Longev*. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/310504>.
- Du K, Ramachandran A, Jaeschke H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biol*. 2016;10:148–56.
- Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*. 2011;21:103–15.
- Imran M, Lim IK. Regulation of Btg2/TIS21/PC3 expression via reactive oxygen species-protein kinase C-NF κ B pathway under stress conditions. *Cell Signal*. 2013;25:2400–12.

43. Horimoto M, Fülöp P, Derdák Z, Wands JR, Baffy G. Uncoupling protein-2 deficiency promotes oxidant stress and delays liver regeneration in mice. *Hepatology*. 2004;39:386–92.
44. Amin KA, Hassan MS, Awad E-ST, Hashem KS. The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:143–9.
45. Viswanathan P, Sharma Y, Gupta P, Gupta S. Replicative stress and alterations in cell cycle checkpoint controls following acetaminophen hepatotoxicity restrict liver regeneration. *Cell Prolif*. 2018;51:e12445.
46. Bouhlef A, Ben Mosbah I, Hadj Abdallah N, et al. Thymoquinone prevents endoplasmic reticulum stress and mitochondria-induced apoptosis in a rat model of partial hepatic warm ischemia reperfusion. *Biomed Pharmacother*. 2017;94:964–73.
47. Bouhlef A, Bejaoui M, Ben Mosbah I, et al. Thymoquinone protects rat liver after partial hepatectomy under ischaemia/reperfusion through oxidative stress and endoplasmic reticulum stress prevention. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12961>.
48. Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and *N*-acetylcysteine. *Hepatology*. 2010;51:246–54.
49. Du K, McGill MR, Xie Y, Bajt ML, Jaeschke H. Resveratrol prevents protein nitration and release of endonucleases from mitochondria during acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 2015;81:62–70.
50. Han D, Dara L, Win S, et al. Regulation of drug-induced liver injury by signal transduction pathways: critical role of mitochondria. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34:243–53.
51. Lee KK, Imaizumi N, Chamberland SR, Alder NN, Boelsterli UA. Targeting mitochondria with methylene blue protects mice against acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology*. 2015;61:326–36.
52. Du K, Ramachandran A, Weemhoff JL, et al. Editor's highlight: metformin protects against acetaminophen hepatotoxicity by attenuation of mitochondrial oxidant stress and dysfunction. *Toxicol Sci*. 2016;154:214–26.
53. Davis D, Potter W, Jollow D, Mitchell J. Species differences in hepatic glutathione depletion, covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. *Life Sci*. 1974;14:2099–109.
54. Lakshmi T, Sri Renukadevi B, Senthilkumar S, et al. Seed and bark extracts of *Acacia catechu* protects liver from acetaminophen induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress, antioxidant enzymes and liver function enzymes in Wistar rat model. *Biomed Pharmacother*. 2018;108:838–44.
55. Al-Brakati AY, Fouda MS, Tharwat AM, Elmahallawy EK, Kassab RB, Abdel Moneim AE. The protective efficacy of soursop fruit extract against hepatic injury associated with acetaminophen exposure is mediated through antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities. *Environ Sci Pollut Res*. 2019;26:13539–50.
56. Porto HKP, Grando MD, Ramalho LNZ, et al. Exposure to acetaminophen impairs vasodilation, increases oxidative stress and changes arterial morphology of rats. *Arch Toxicol*. 2019;93:1955–64.
57. Muhammad F, Wang A, Qi W, Zhang S, Zhu G. Intracellular antioxidants dissolve man-made antioxidant nanoparticles: using redox vulnerability of nanoceria to develop a responsive drug delivery system. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6:19424–33.
58. Xu C, Qu X. Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications. *NPG Asia Mater*. 2014;6:e90.
59. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature*. 1995;376:167–70.
60. Iimuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, et al. NF- κ B prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest*. 1998;101:802–11.
61. Maeda S, Kamata H, Luo J-L, Leffert H, Karin M. IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*. 2005;121:977–90.
62. Chen G, Xu Y. Biosynthesis of cerium oxide nanoparticles and their effect on lipopolysaccharide (LPS) induced sepsis mortality and associated hepatic dysfunction in male Sprague Dawley rats. *Mater Sci Eng C*. 2017;83:148–53.
63. Selvaraj V, Manne ND, Arvapalli R, et al. Effect of cerium oxide nanoparticles on sepsis induced mortality and NF- κ B signaling in cultured macrophages. *Nanomedicine*. 2015;10:1275–88.
64. Selvaraj V, Nepal N, Rogers S, et al. Inhibition of MAP kinase/NF- κ B mediated signaling and attenuation of lipopolysaccharide induced severe sepsis by cerium oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2015;59:160–71.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



ADDITIONAL INFORMATION

Cerium oxide nanoparticles improve liver regeneration after acetaminophen-induced liver injury and partial hepatectomy in rats

Bernat Córdoba-Jover^{1,&}, Altamira Arce-Cerezo^{1,&}, Jordi Ribera¹, Montse Pauta¹, Denise Oró¹, Gregori Casals^{1,2}, Guillermo Fernández-Varo¹, Eudald Casals^{3,4,6}, Victor Puntès^{3,4,5}, Wladimiro Jiménez^{1,7} and Manuel Morales-Ruiz^{1,2,7*}.

[&]Both authors contributed equally to this study

*Corresponding authors:

-Manuel Morales-Ruiz, Ph.D., Biochemistry and Molecular Genetics

Department, Hospital Clinic, 170 Villarroel St. Barcelona, 08036, Spain. Tel:

+34-932275466, Fax: +34-932275697, e-mail: morales@clinic.cat

Table of content:

1. Additional Materials and methods
2. Additional Figure and Legend
3. References

Additional Materials and methods

Experimental model of partial hepatectomy.

All the surgical procedures performed in rats were made under isoflurane anesthesia (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Partial hepatectomy (PHx) was performed according to the technique described by Higgins and Anderson[1]. The abdomen was opened via a midline incision and the median and left lobes were removed. After PHx, control and treated rats were euthanized at different time points. The regenerating bottom right lobe was snap-frozen into liquid nitrogen and the upper right lobe was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C, cryoprotected overnight in 30% sucrose solution, and embedded in OCT medium (Tissue-Tek® O.C.T™ Compound, SAKURA) and frozen for future processing. The percentage of liver regeneration was calculated following the formula: weight of non-removed lobes/total body weight of rats, as previously described [1].

Acetaminophen (APAP) toxicity and N-acetyl-cysteine treatment.

After vehicle administration or CeO₂NPs treatment, rats were administered 1g/kg APAP (Acetaminophen BioXtra, ≥99.0%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) intraperitoneally and euthanized at 0h, 48h and 96h to obtain liver and serum samples for further analysis. As a therapeutic control group, thirteen rats were treated with 300mg/kg N-acetyl-cysteine (NAC) (*N*-Acetyl-L-cysteine, Sigma Grade, ≥99% [TLC], Sigma Aldrich, St. Louis, MO) intraperitoneally 1h after APAP administration. Liver left lobes were removed from these rats and dissected into pieces for: 1/ fixation in 4% PFA at 4°C, cryoprotection in 30% sucrose solution overnight and inclusion in OCT medium (Tissue-Tek® O.C.T™ Compound, SAKURA); 2/ fixation in 10% formaldehyde and paraffin inclusion

and 3/ storage in liquid nitrogen for protein extraction. APAP-induced liver injury was microscopically evaluated by performing hematoxylin-eosin staining (Hematoxylin Solution, Gill No. 3, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) on liver sections included in paraffin. All the histology images were taken using a light microscope coupled with a digital image acquisition system (Nikon Eclipse E600, Kawasaki, Kanagawa, Japan). In addition, the presence of oxidative stress in the livers of the APAP-treated animals was determined by measuring the end product of lipid peroxidation 4-hydroxynonenal (HNE), a well known marker for oxidative damage, using OxiSelect™ HNE Adduct Competitive ELISA kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA), following manufacturer's instructions.

Immunofluorescence.

For both models, PHx and APAP, frozen sections of 8-µm were rehydrated, blocked with 5% normal goat serum and incubated with mouse anti-ki67 (1:100, Abcam, ab16667). Controls without primary antibodies were revealed with Alexa-488 goat-anti-rabbit IgG (1:500, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Next, slides were mounted with mounting medium containing DAPI (VECTASHIELD®, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Tissue slides were visualized with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E600, Kawasaki, Kanagawa, Japan). Ki67 positive cells were counted using Image J (version 1.37, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Western blot analysis.

Tissue lysates were prepared in a lysis buffer (Tris-HCl 20 mM pH 7.4 containing 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM Na₄P₂O₇ 10H₂O, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 2 mM Pefabloc and Complete® from Roche, Basel, Switzerland). Proteins were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel (Mini Protean III, BioRad, Richmond, CA, USA) and transferred for 1 hour at 4°C to 0,2 µm nitrocellulose transfer membranes (BioRad, Richmond, CA, USA). Membranes were incubated at 4°C overnight with the following antibodies; rabbit anti-IKB alpha (1:1000, ab32518, abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-Cyclin D1 (1:1000, #2922, Cell Signaling, Danvers MA, USA), rabbit anti-active Caspase-3 antibody (1:1000, ab32042, abcam, Cambridge, UK) and rabbit anti β-actin (13E5 HRP conjugate, 1:1000, #4970, Cell Signaling, Danvers MA, USA). Membranes were incubated with a donkey ECL™-anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at 1:5000 dilution (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) for 1 hour at room temperature. Bands were visualized using Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) and ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Densitometry analysis of membranes was performed using Image J (version 1.37, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Cell cycle analysis.

HepG2 cells were washed twice with ice-cold PBS, fixed in 70% cold ethanol, treated with 100 µg/mL ribonuclease A (Roche, Basel, Switzerland) and labeled with 50 µg/mL propidium iodide (PI) for at least 4h at 4°C. Next, cells were analyzed by flow cytometry (FACScalibur, Becton-Dickinson) using selective

gating to exclude the doublets of cells and quantified using the MODFIT software (Verity Software House, Inc.).

Biochemical assays.

At the end of the treatment, rats were euthanized, serum was obtained by blood centrifugation and biochemical parameters were assayed using an automatic chemistry analyzer (BS-200E, Mindray Medical International LTD, Shenzhen, China). In these samples, aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT), glucose, albumin, and lactate dehydrogenase (LDH) were determined.

Additional Figures and Legends

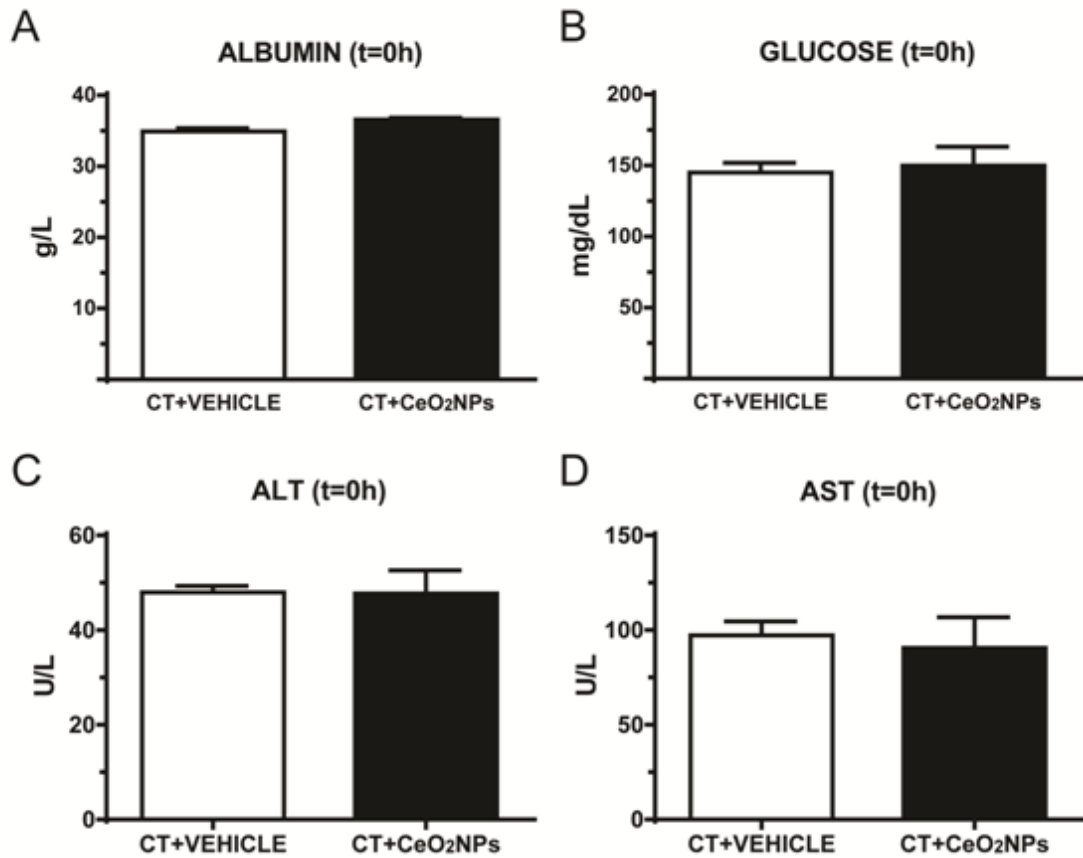


Figure S1. Measurement of serum laboratory parameters in rats treated with vehicle and CeO₂NPs before PHx or APAP *i.p.* injection. Serum concentration of albumin, glucose, ALT and AST in rats treated with vehicle (white bars, n=8) and CeO₂NPs (black bars, n=8) at t=0 hours before PHx or APAP treatment. No significant differences were found between groups in any of the biochemical parameters evaluated.

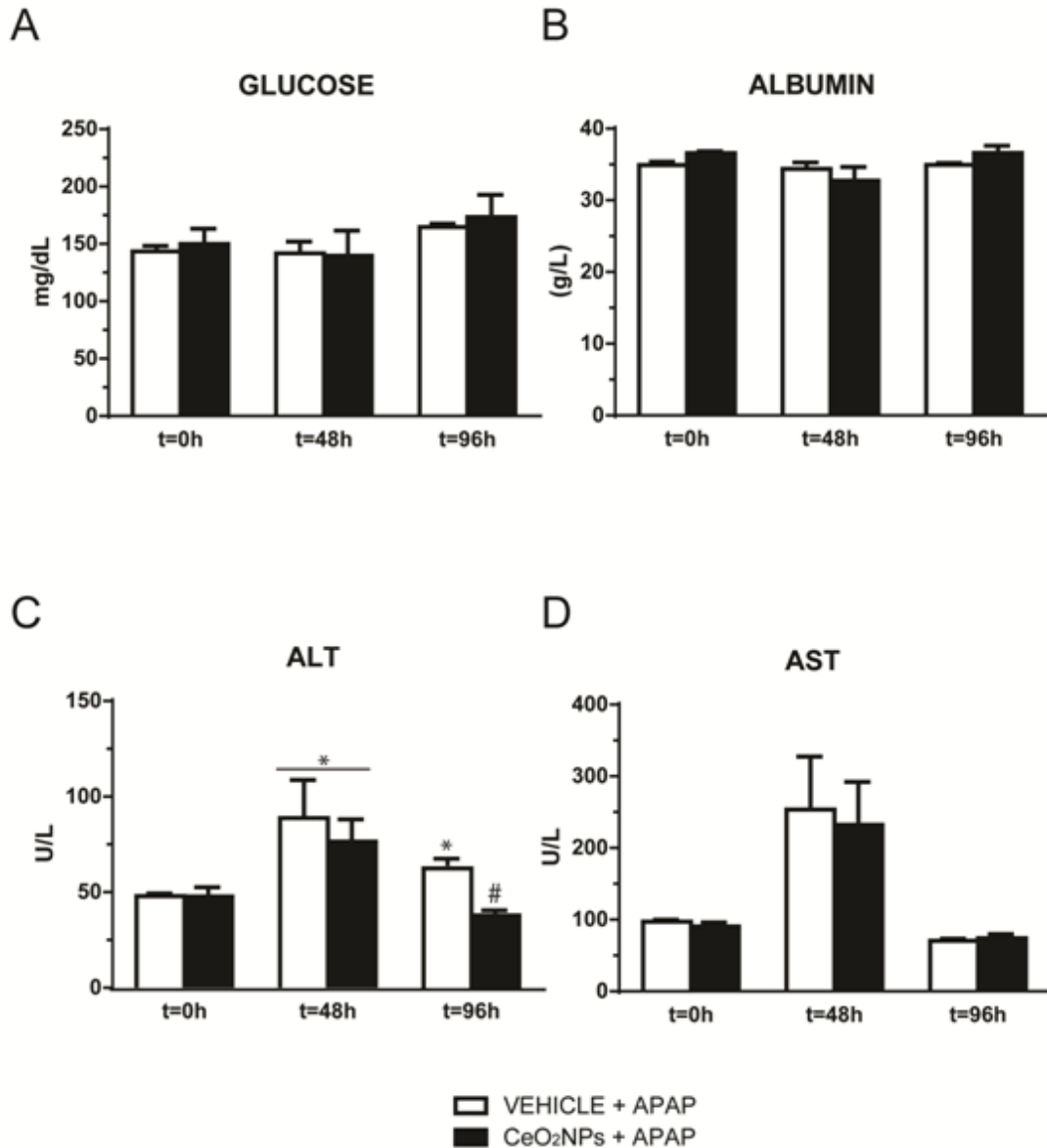


Figure S2. Measurement of serum laboratory parameters in rats treated with vehicle and CeO₂NPs after APAP i.p. injection. Serum concentration of glucose, albumin, ALT and AST in rats treated with vehicle (white bars, n=8) and CeO₂NPs (black bars, n=8) at t=0h, t=48h and t=96h after APAP *i.p.* injection (* $p < 0.01$ compared with t=0 and CeO₂NPs treatment at t=96h; # $p < 0.05$ compared with vehicle at the same time points).

References

1. Higgins GM. Anderson. RM. Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch Pathol. 1931;12:186–202.

RESUM ESTRUCTURAT SEGON ARTICLE

Títol: La deficiència de Tcf20 està associada a un increment de la fibrogènesi hepàtica i a alteracions en el metabolisme mitocondrials en ratolins i humans



Introducció: El factor de transcripció 20 (TCF20) és un regulador de molts factors de transcripció involucrats en la homeòstasi de la matriu extracel·lular. Variants genòmiques d'aquest factor en humans s'han associat a discapacitat intel·lectual. La nostra hipòtesi és que TCF20 té diverses funcions a part de les descrites en neurogènesi com per exemple en la fibrogènesi.

Mètodes: Els ratolins amb deficiència total de *Tcf20* (*Tcf20*^{-/-}) i heterozigots per *Tcf20* s'han generat mitjançant recombinació homòloga. El genotipat del gen *Tcf20* i la seva expressió es van fer en pacients amb variants patogèniques de TCF20. El desenvolupament neuronal en ratolins es va fer mitjançant immunofluorescència. L'activitat metabòlica mitocondrial va ser avaluada mitjançant l'analitzador Seahorse.

Resultats: La caracterització de ratolins *Tcf20*^{-/-} va mostrar un deteriorament neuronal en el desenvolupament del cervell a nivell embrionari i mortalitat dels recent nascuts. En canvi, els ratolins heterozigots van resultar ser viables. Aquests van presentar més fibrosi induïda per tetraclorur de carboni i una expressió diferencial dels gens involucrats en l'homeostasi de la matriu extracel·lular al comparar-los amb ratolins sense deficiència per *Tcf20*. A més, vam observar patrons de comportament anòmals compatibles amb fenotips relacionats amb el trastorn de l'espectre autista. Els fetges d'embrions de ratolins *Tcf20*^{-/-} i els fibroblasts embrionaris de ratolins van revelar una expressió diferencial de proteïnes estructurals involucrades en la cadena de la fosforilació oxidativa mitocondrial amb ratios d'activitat mitocondrial incrementada i alteracions en els metabòlits del cicle de l'àcid cítric. Aquests resultats concorden amb els trobats en pacients amb variants patogèniques de *Tcf20*, incloent les alteracions en els indicadors de fibrosi (ELF i APRI) així com en els nivells de succinat en sang.

Conclusions: Hem demostrat un nou rol de TCF20 en la fibrogènesi i el metabolisme mitocondrial en ratolins i presentat l'associació entre la deficiència de *Tcf20* i la fibrosi en humans.

Tcf20 deficiency is associated with increased liver fibrogenesis and alterations in mitochondrial metabolism in mice and humans

Bernat Córdoba-Jover¹ | Jordi Ribera^{1,2} | Irene Portolés¹ | Elena Lecue¹ | Juan Rodríguez-Vita³ | Leticia Pérez-Sisqués⁴ | Francesco Mannara⁵ | Estel Solsona-Vilarrasa^{2,6} | Carmen García-Ruiz^{2,6,7} | José C. Fernández-Checa^{2,6,7} | Gregori Casals^{1,2,4} | Laia Rodríguez-Revenga^{1,8} | María Isabel Álvarez-Mora^{1,8,9} | Ana Arteche-López^{9,10} | Aranzazu Díaz de Bustamante¹¹ | Rosa Calvo^{5,12} | Anna Pujol¹³ | Mikel Azkargorta¹⁴ | Felix Elortza¹⁴ | Cristina Malagelada⁴ | Roser Pinyol¹⁵ | Júlia Huguet-Pradell¹⁵ | Pedro Melgar-Lesmes^{1,2,4} | Wladimiro Jiménez^{1,2,4}  | Manuel Morales-Ruiz^{1,2,4} 

¹Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clinic of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

²CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

³Tumour-Stroma Communication Laboratory, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain

⁴Department of Biomedicine-Biochemistry Unit, School of Medicine University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

⁶Cell Death and Proliferation, Institute of Biomedical Research of Barcelona (IIBB), Consejo Superior Investigaciones Científicas (CSIC), Liver Unit, Hospital Clinic, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁷USC Research Center for ALPD, Keck School of Medicine, Los Angeles, California, USA

⁸CIBER of Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁹Genetics Department, 12 de Octubre University Hospital, Madrid, Spain

¹⁰UDISGEN (Unidad de Dismorfología y Genética), 12 de Octubre University Hospital, Madrid, Spain

¹¹Unidad de Genética, Hospital Universitario de Móstoles, Madrid, Spain

¹²Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychology, Hospital Clinic of Barcelona. School of Medicine, University of Barcelona, Centro de Investigación Biomédica en Red Salud Mental (CIBERSAM), Madrid, Spain

¹³Unidad de Animales Transgénicos UAT-CBATEG, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Valles, Spain

¹⁴Proteomics Platform, CIC bioGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), CIBERehd, Derio, Spain

¹⁵Translational Research in Hepatic Oncology Group, Liver Unit, IDIBAPS, Barcelona Clinic Hospital, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Abbreviations: ACADS, acyl-CoA dehydrogenase; AKT, protein kinase B; ALT, alanine transaminase; APRI, AST to platelet ratio index; ASD, autism spectrum disorders; AST, aspartate aminotransferase; ATP5C1, ATP synthase subunit gamma; ATP5D, ATP synthase subunit delta; BUN, blood urea nitrogen; BW, black and white; CCl₄, carbon tetrachloride; COL1A1, collagen type I alpha 1 chain; COL1A2, collagen type I alpha 2 chain; COX4I1, cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1 from complex IV; DCF, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DD, developmental delay; ECM, extracellular matrix; ELF, enhanced liver fibrosis; ER α , oestrogen receptor alpha; ETS1, E twenty six-1 protein; FIB-4, fibrosis-4 score; GC-MS, gas chromatography mass spectrometry; GRX Scramble, GRX cells transfected with a scramble mouse shRNA plasmid; GRX shTCF20, GRX cells transfected with a TCF20 mouse shRNA plasmid; GRX, immortalized mouse primary hepatic stellate cells; HA, hyaluronic acid; HCDH, hydroxy acyl-coenzyme A dehydrogenase; HFS, hepamet fibrosis score; ID, intellectual disability; IPA, ingenuity pathway analysis (software); MeCP2, methyl-CpG binding protein 2; MEF, mouse embryonic fibroblasts; MMP, matrix metalloproteinase; NRF2, nuclear factor E2-related factor 2; OCR, oxygen consumption rate; PAX6, paired box protein 6; PIIINP, procollagen type III N-terminal peptide; RNF4, ring finger protein 4; SNPs, single nucleotide polymorphisms; SP1, specificity protein 1; SPBP, stromelysin-1 platelet derived growth factor responsive element binding protein; SPRE, stromelysin-1 PDGF-responsive element; TCF20, transcription co-activator factor 20; TCF20^{-/-}, knock-out for Tcf20 gene; TCF20^{+/-}, heterozygous for Tcf20 gene; Tcf20 haploinsufficiency; TCF20^{+/+}, wild-type for Tcf20 gene; TEM, transmission electron microscopy; TGF β , transforming growth factor beta; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; UQCRC1, cytochrome b-c1 complex subunit from complex III; VZ, ventricular zone.

Bernat Córdoba-Jover and Jordi Ribera contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2023 The Authors. *Liver International* published by John Wiley & Sons Ltd.

Correspondence

Manuel Morales-Ruiz, Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clinic, 170 Villarroel St., Barcelona 08036, Spain.
Email: morales@clinic.cat

Funding information

Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca; European Cooperation in Science and Technology; Fundació la Marató de TV3; Fundació Mutua Madrileña; Agencia Estatal de Investigación, Ministerio de Ciencia e Innovación

Handling Editor: Luca Valenti

Abstract

Background & Aims: Transcription co-activator factor 20 (TCF20) is a regulator of transcription factors involved in extracellular matrix remodelling. In addition, *TCF20* genomic variants in humans have been associated with impaired intellectual disability. Therefore, we hypothesized that TCF20 has several functions beyond those described in neurogenesis, including the regulation of fibrogenesis.

Methods: *Tcf20* knock-out (*Tcf20*^{-/-}) and *Tcf20* heterozygous mice were generated by homologous recombination. *TCF20* gene genotyping and expression was assessed in patients with pathogenic variants in the *TCF20* gene. Neural development was investigated by immunofluorescence. Mitochondrial metabolic activity was evaluated with the Seahorse analyser. The proteome analysis was carried out by gas chromatography mass-spectrometry.

Results: Characterization of *Tcf20*^{-/-} newborn mice showed impaired neural development and death after birth. In contrast, heterozygous mice were viable but showed higher CCl₄-induced liver fibrosis and a differential expression of genes involved in extracellular matrix homeostasis compared to wild-type mice, along with abnormal behavioural patterns compatible with autism-like phenotypes. *Tcf20*^{-/-} embryonic livers and mouse embryonic fibroblast (MEF) cells revealed differential expression of structural proteins involved in the mitochondrial oxidative phosphorylation chain, increased rates of mitochondrial metabolic activity and alterations in metabolites of the citric acid cycle. These results parallel to those found in patients with *TCF20* pathogenic variants, including alterations of the fibrosis scores (ELF and APRI) and the elevation of succinate concentration in plasma.

Conclusions: We demonstrated a new role of *Tcf20* in fibrogenesis and mitochondria metabolism in mice and showed the association of *TCF20* deficiency with fibrosis and metabolic biomarkers in humans.

KEYWORDS

collagen, liver fibrosis, metabolic disease, newborn lethality, succinate, TCF20

1 | INTRODUCTION

Transcription co-activator factor 20 (*TCF20*) gene, alternatively known as Stromelysin-1 platelet derived growth factor responsive element binding protein (*SPBP*) gene, is located in the 22q13.2 chromosome region and encodes two open reading frames generated by alternative splicing. Isoform 1 is expressed in brain, heart, and testis tissue, and predominantly in liver and kidney, isoform 2 is mostly expressed in lungs.¹

In humans, de novo and inherited *TCF20* pathogenic-variants have been detected in patients with autism spectrum disorders (ASD), intellectual disability (ID), and developmental delay (DD),²⁻⁴ which lead to a new autosomal dominant neurodevelopmental syndrome named developmental delay with variable intellectual impairment and behavioural abnormalities (OMIM#618430). In agreement with the human pathology, *Tcf20* loss in mice has been associated with neurogenesis defects and autistic-like behaviours.^{5,6}

Key Points

Tcf20 deficiency in mice is associated with an altered mitochondria metabolism and an increased fibrogenesis in an experimental model of cirrhosis. Moreover, patients with *TCF20* pathogenic variants present increased scores for liver fibrosis.

Although in the context of neuronal development and ID the implication of *TCF20* has been recognized, its role on other physiological or pathophysiological functions is still unknown. Several studies have demonstrated that *TCF20* acts as a transcriptional regulator through the interaction with several factors, including c-Jun, Paired box protein 6 (PAX6), RING finger protein 4 (RNF4), Nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2), Specificity protein 1 (SP1) and E twenty six-1 protein

(ETS1).⁷⁻¹⁰ Among all these transcriptional regulators, the activation of SP1 and ETS1 is associated with significant changes in the expression of the extracellular matrix components, such as the collagen precursor genes *COL1A1* and *COL1A2*.¹¹⁻¹³ Also, the protein encoded by *TCF20* gene was originally found to regulate the expression of matrix metalloproteinase 3 (*MMP3*) through its capability to bind to the stromelysin-1 PDGF-responsive element (SPRE) in the promoter region of *MMP3* gene.¹⁴ In a different context, the transcription factors ER α , ETS-1, and NRF2 have been related to energy metabolism, mitochondrial biogenesis, and the maintenance of mitochondrial function.¹⁵⁻¹⁷ We have also described that *Tcf20* is a downstream target of the serine/threonine kinase Akt,¹⁸ which regulates major cellular and tissular functions such as cell growth, liver regeneration and metabolism.^{19,20} The previous studies suggest that *TCF20* could have several functions beyond those described in neurogenesis, including the regulation of fibrogenesis and mitochondrial metabolism.

To test this hypothesis, we generated a *Tcf20* knockout mice model and examined the consequences of *Tcf20* deficiency at embryo stages and in postnatal *Tcf20*^{+/-} mice. Also, we investigated non-invasive fibrosis markers and mitochondrial metabolism in patients with altered *TCF20* function.

2 | METHODS

2.1 | Subjects with pathogenic variants in the *TCF20* gene

We prospectively recruited 3 patients from unrelated families that had received clinical exome sequencing evaluation (subject 1 and 2) or SNV/indel evaluation (subject 3) and presented pathogenic variants in the *TCF20* genes. Subjects 1 and 2, who underwent whole exome sequencing evaluation at the Genetics service of the Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain), presented hypotonia, autism spectrum disorder, and behavioural abnormalities. One additional patient also presenting with ASD (subject 3) was identified through the CIBERER network as control group, 3 cases presenting ASD, in which *TCF20* gene alterations were discarded by Sanger sequencing, were prospectively recruited from the Psychiatry and Psychology Service at the Hospital Clinic of Barcelona based on their clinical condition, age, and sex to match the *TCF20* cohort. All the individuals were recruited under research protocols approved by the Ethic Committee of their respective institutions. This study was conducted in accordance with the principles of the Declarations of Helsinki and Istanbul, and all patients provided written informed consent prior to enrollment.

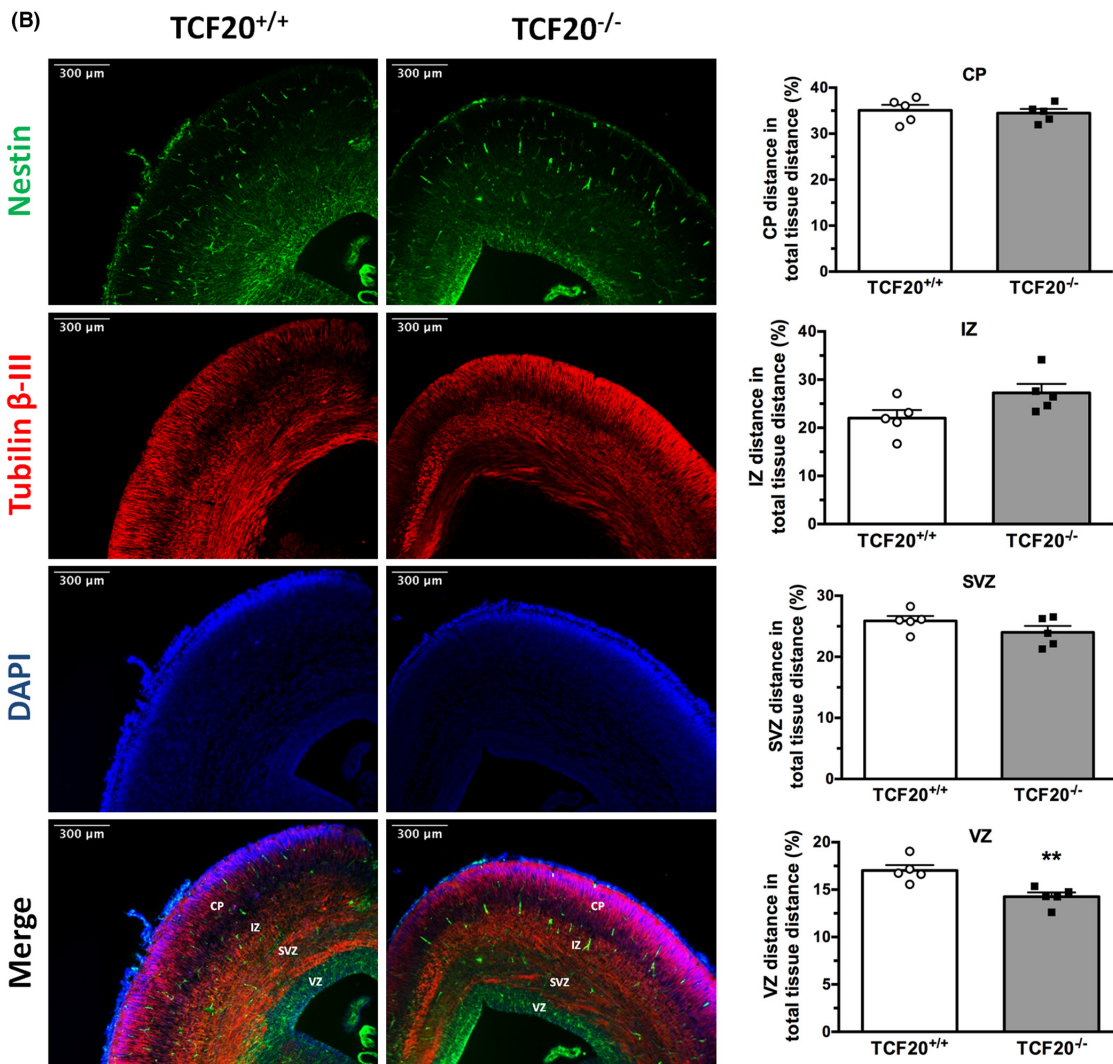
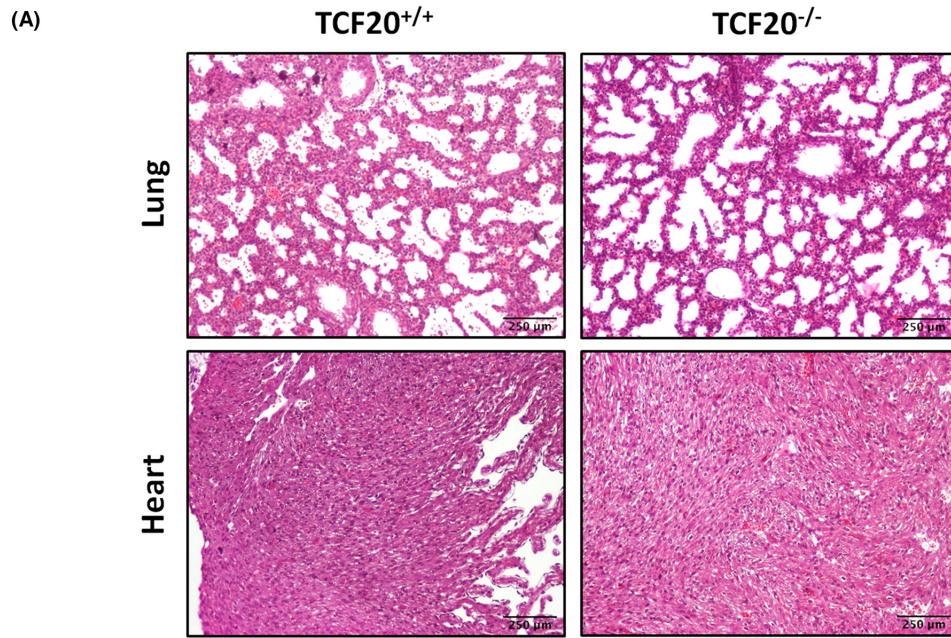
2.2 | *Tcf20* knockout mice generation

Chimerical C57BL/6 mice were generated at Transgenic Animals Unit (UAT-CBATEG) in Universitat Autònoma de Barcelona by microinjecting mouse embryonic stem cells D09^{tm1(KOMP)Mbp} (KOMP Repository) to blastocysts C57Bl/6J.Ola.Hsd. Chimerical male mice were bred with wild-type C57Bl/6J.Ola.Hsd. females to obtain heterozygous knockout mice (*Tcf20*^{+/-}). Then *Tcf20*^{+/-} female and male mice were bred to obtain homozygous knockout mice (*Tcf20*^{-/-}). For mice genotyping, a tail biopsy was obtained from each mouse for genomic DNA isolation with a specific kit (Extract-N-AmpTM Tissue PCR Kit; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) following manufacturer's instructions. PCR was performed to amplify specific DNA bands for wild-type and knockout genotype. The following primers were used in the same PCR mix for each genomic DNA sample: Forward: 5'-CCACCAGAATTTCAGCCCTA-3' and Reverse: 5'-ATTCCCCTCTCCATTGTGGT TAGAGC-3' to amplify a band of 964pb specific for wild-type genotype and Fwd: 5'-ACACCTCCCCTGAACCTGAAA-3' and the same reverse primer mentioned before to amplify a band of 670pb specific for knockout genotype. PCR conditions were as follows: 40 cycles at 94°C for 15 s, 58.7°C for 30 s, and 72°C for 40 s. PCR products were mixed with loading buffer 6x (Invitrogen) in 1.5% agarose gel and run in Tris-Acetate-EDTA buffer (TAE) 1x at 100V for 30 min. Bands were visualized using ImageQuantTM LAS 4000. The number of observed bands in each lane and their position in the agarose gel depending on their length were used to determine the genotype of every animal: a unique band of 964pb corresponded to *Tcf20*^{+/+} mice, a unique band of 670pb corresponded to *Tcf20*^{-/-} mice and the presence of both bands in the same lane corresponded to *Tcf20*^{+/-} mice. All animals were fed ad libitum on a standard pellet diet and kept in a 24-hours controlled dark/light cycle under constant temperature and humidity. We performed all animal experiments following the guidelines of the Investigation and Ethics Committees of Hospital Clinic and the University of Barcelona after study approval.

2.3 | Statistical analyses

All data was analysed using the open-source statistical computing environment R (<http://www.r-project.org/>) or GraphPad Prism, version 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). In the case of homoscedasticity and normally distributed data, groups were compared using Student's t-test or ANOVA for independent samples. For other types of data, the Mann-Whitney U test or the Kruskal-Wallis

FIGURE 1 *Tcf20* deficiency in mice embryo. (A) Representative haematoxylin and eosin staining of heart and lung tissue sections from *Tcf20*^{+/+} and *Tcf20*^{-/-} mice embryo at x100 magnification. (B) Representative immunostaining for the neural markers nestin and tubulin- β III in brain histological sections of both, *Tcf20*^{+/+} and *Tcf20*^{-/-} mice embryo (E17.5). Merged images show co-localization of nestin (green), tubulin- β III (red) and nuclear DNA (DAPI, blue). Original magnification x100. Graphs show the relative distance quantification of every brain region for each genotype (mean \pm SEM; $n=5$ for each group; ** $p < 0.01$, versus *Tcf20*^{+/+} genotype). CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone; VZ, ventricular zone.



test were used. Tukey's test (with ANOVA) or Dunn's test (with Kruskal–Wallis) were used as post hoc tests to perform pairwise comparisons. Results are expressed as mean \pm SEM and considered significant at a p value lower than 0.05.

3 | RESULTS

3.1 | Homozygous *Tcf20* gene deficiency causes new-born lethality and impaired brain neurodevelopment

We generated a global knockout mouse for *Tcf20* as described in the Materials and Methods section. After heterozygous breeding, only wild-type (*Tcf20*^{+/+}) and heterozygous (*Tcf20*^{+/-}) mice survived while *Tcf20* knockout (*Tcf20*^{-/-}) pups died within 2 and 5 hours after birth, linking the complete lack of *Tcf20* to newborn lethality. To study the causes of this premature lethality, we timed pregnancies of *Tcf20*^{+/-} breeding to examine embryo at advanced stage of development (E17.5). Histopathological examination with haematoxylin and eosin staining of heart and lung tissue from *Tcf20*^{-/-} mice embryo revealed no significant differences from the tissue structure obtained from wild-type mice (Figure 1A). Since *Tcf20* deficiencies have been reported to be associated to neuronal defects, we first analysed whether *Tcf20* gene deficiency affected neural development. In agreement with what was described by others in the brain of *Tcf20* knockout mice generated by CRISPR/cas9 gene edition,^{5,6} brain slices from *Tcf20*^{-/-} embryos generated by homologous recombination also showed impaired neural structures at the ventricular zone (VZ) of the mouse brain at embryonic stage E17.5, compared with *Tcf20*^{+/+} embryos (Figure 1B). These abnormalities were evident by immunofluorescence staining for nestin, a neural progenitor cell marker,²¹ and beta-III tubulin, a neuron specific marker.²² Specifically, *Tcf20*^{-/-} embryos presented a thinner ventricular zone layer when compared to wild type embryos (14.25 \pm 0.46 vs. 17.02 \pm 0.57% of distance in total tissue distance, respectively; ** p < 0.01) (Figure 1B), suggesting that the absence of *Tcf20* is associated with an impairment

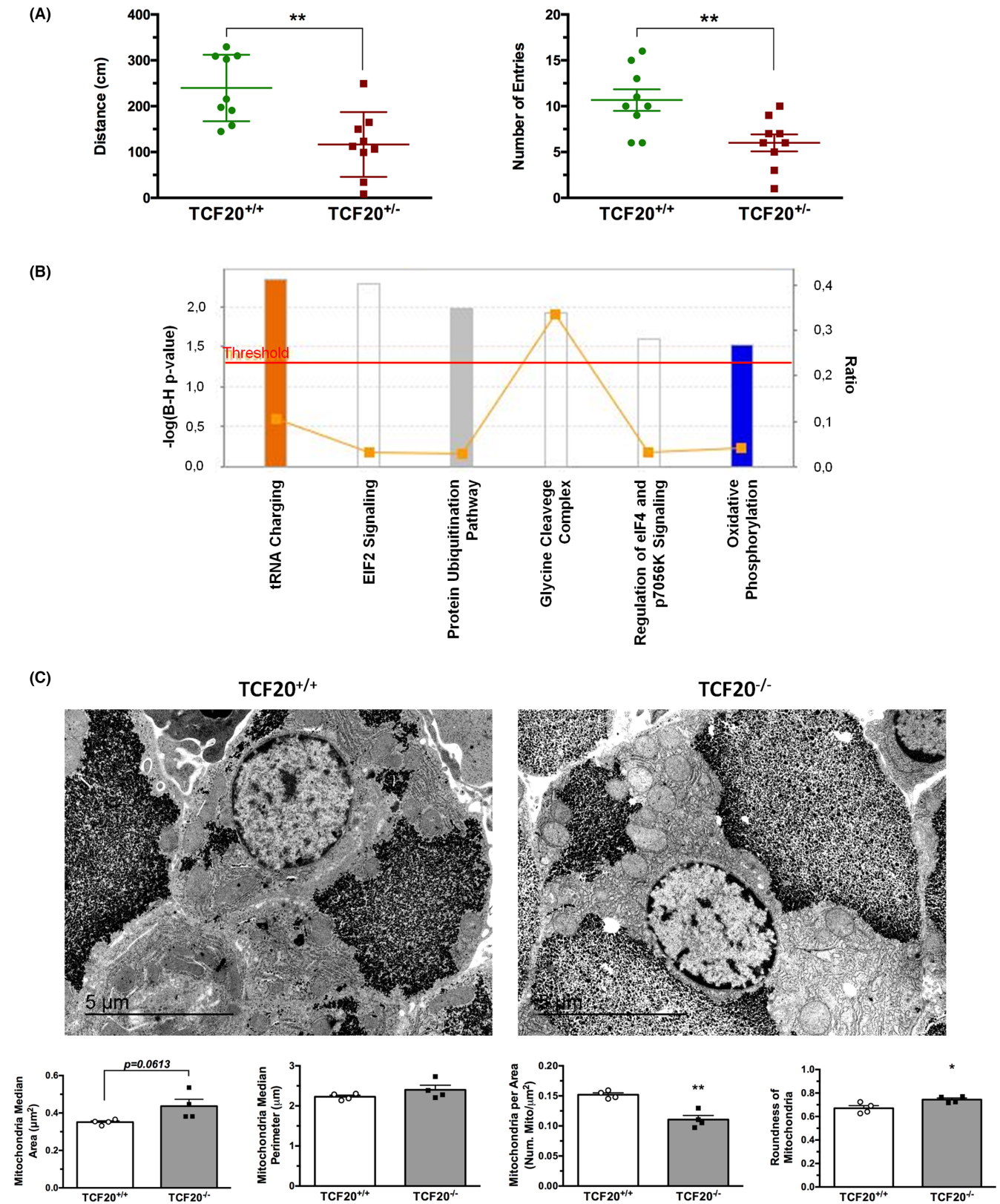
in neuronal progenitors proliferation and therefore, in neuronal differentiation.

3.2 | *Tcf20* haploinsufficiency is associated with abnormal behavioural patterns and increased mitochondria activity

Tcf20^{+/-} mice were viable without any apparent morphological abnormality and with similar weight at birth compared with wild-type mice. Regarding the behaviour of *Tcf20*^{+/-} mice, recent studies linked the lack of *Tcf20* function to different neurological disorders involving abnormal behaviour in adults.^{5,6} In agreement with these observations, we also found that *Tcf20* haploinsufficiency in our model was associated with abnormal behavioural patterns that were evident after performing the Black & White (BW) test in 18 mice, 9 *Tcf20*^{+/+} and 9 *Tcf20*^{+/-}. The number of entries and the time spent in the white compartment and in the distal section were recorded over a period of 5 min. After analysing all recorded data, we found that *Tcf20*^{+/-} mice entered less often and wandered less distance at the distal portion of the white region when compared to *Tcf20*^{+/+} wild type mice (Figure 2A). In addition, female heterozygous mice (\varnothing *Tcf20*^{+/-}) did not breed or look after their newborn. Altogether, these findings highlight the major role of TCF20 in neuronal differentiation and its relationship with autism-like behaviour.

In aged mice, ranging from 9 to 13 months, the most evident morphological difference consisted of two-fold lower body weight of *Tcf20*^{+/-} mice compared with wild-type mice (Figure S1A) suggesting a role of *Tcf20* as a regulator of body metabolism. In particular, we found 7 up- and 5 downregulated mitochondrial proteins significantly deregulated among *Tcf20*^{-/-} mice and wild type (WT) mice. Among the down-regulated genes, we found ATP synthase subunits delta (*Atp5d*) and gamma (*Atp5c1*), cytochrome b-c1 complex subunit from complex III (*Uqcrc1*), and cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1 from complex IV (*Cox4i1*) (Data S1). On the other hand, changes in protein abundance due to the loss of *Tcf20* significantly correlated with aminoacid metabolism, lipid metabolism, and neurological disease (Figure S1C). IPA analysis also revealed as top

FIGURE 2 Lack of *Tcf20* affects and impairs metabolism in mice. (A) Results from the recorded Black and White test. The graphics show the distance wandered and the number of entries in the distal portion of the white sector from both, *Tcf20*^{+/+} and *Tcf20*^{+/-} mice (mean \pm SEM; $n=9$ for each group; ** p < 0.01, versus *Tcf20*^{+/+} genotype). (B) Proteomic analysis of *Tcf20*^{+/+} and *Tcf20*^{-/-} E17.5 mice embryo liver samples ($n=4$, for each experimental condition) revealed different affected canonical pathways due to the complete loss of *Tcf20*, including the oxidative phosphorylation pathway. The comparison of canonical pathways affected by the knockout of *Tcf20* activity in embryo livers were modelled using the Ingenuity Pathways Knowledge Base (IPA). The results obtained were compared with global molecular networks using the Fisher's Exact Test. The resulting p -values were adjusted for multiple comparisons using the Benjamini and Hochberg's method to control the false discovery rate. After multi-test adjustment, differences were considered as significant at a p value less than 0.05 (left axis). The red line across the graph indicates the point where the significance value equals 0.05. In addition, the significance of the association was measured based on the ratio of the number of targets from the data set that map to the pathway divided by the total number of targets that are included in the canonical pathway (yellow line and right axis). (C) Representative TEM wild type (*Tcf20*^{+/+}) and *Tcf20* knockout (*Tcf20*^{-/-}) embryonic mouse liver sections showing mitochondria. Original magnification: 15000x. Graphs show the different mitochondria parameters (Mitochondria Area; Mitochondria Perimeter; Number of mitochondria per area; and Mitochondria roundness) quantified by FIJI software from TEM micrographs (mean \pm SEM; $n=4$ animals per group; * p < 0.05, ** p < 0.01, compared to *Tcf20*^{+/+} genotype).



biological network affected “cellular, embryonic and organismal development” (Figure S1B).

To functionally confirm these results, we studied mitochondria morphology by TEM in the liver of *Tcf20^{+/+}* and *Tcf20^{-/-}* embryos as well as mitochondria function by measuring their oxygen

consumption rate in MEF isolated from *Tcf20^{+/+}* and *Tcf20^{-/-}* embryos. *Tcf20^{-/-}* embryonic livers presented fewer mitochondria per micrograph area when compared to wild-type embryonic livers (0.11 ± 0.01 vs. 0.15 ± 0.01 number of mitochondria/ μm^2 , respectively; $**p < 0.01$) and larger mitochondria area when compared to

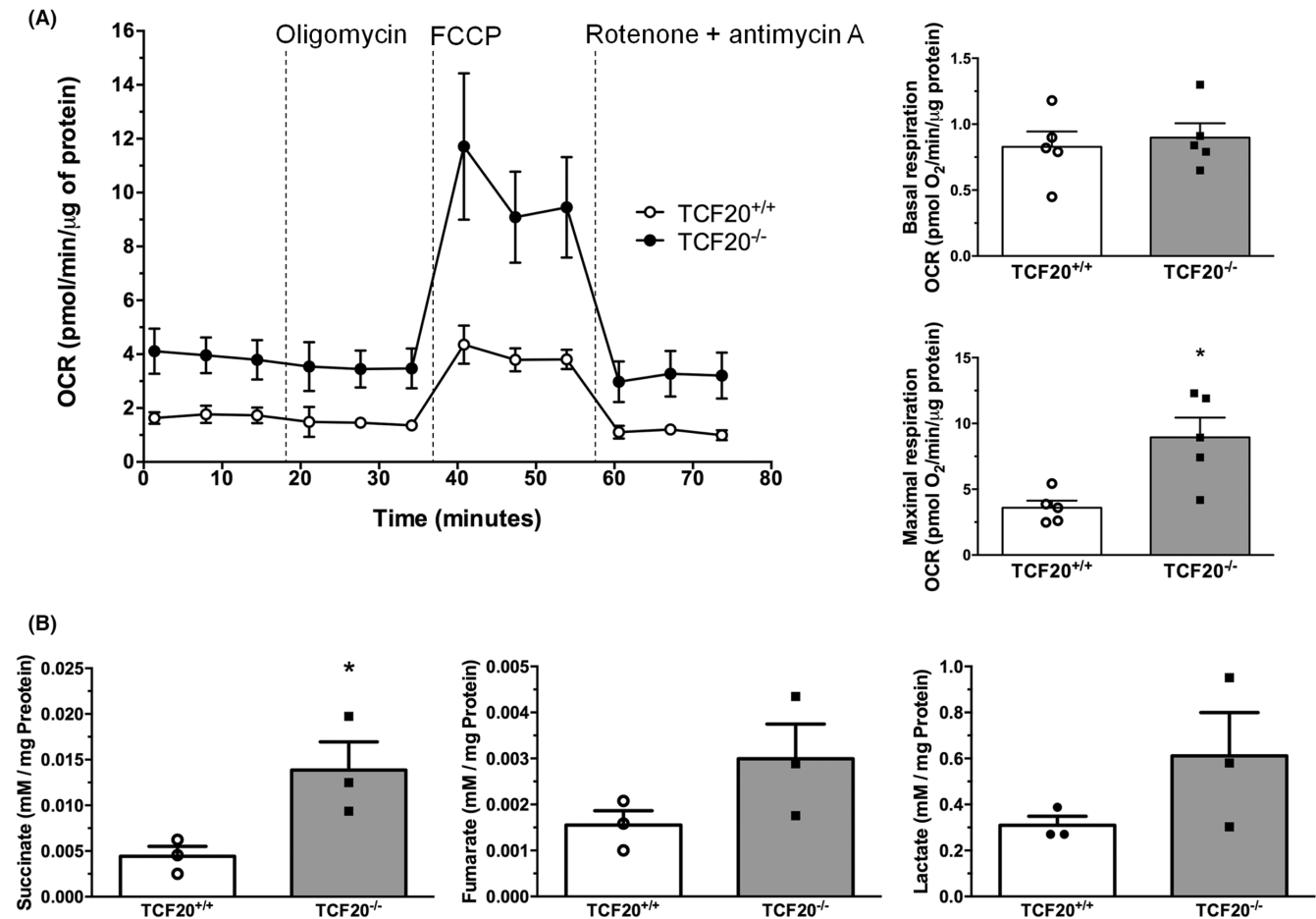


FIGURE 3 Total loss of *Tcf20* affects mitochondria function and metabolism in MEF cells. (A) Mouse embryo fibroblasts (MEF) cells from *Tcf20*^{+/+} and *Tcf20*^{-/-} embryos were evaluated for basal, coupled and maximal respiration in a mito-stress assay using a Seahorse XFe24 analyser ($n=10$ replicate Seahorse wells for each condition). OCR is normalized to μg of total protein (mean \pm SEM; * $p < 0.05$, compared to *Tcf20*^{+/+} MEF). (B) Succinate, Fumarate and Lactate levels were measured by mass spectrometry from *Tcf20*^{+/+} and *Tcf20*^{-/-} MEF protein extracts. Results were normalized per total protein amount ($n=3$ for each genotype; mean \pm SEM; * $p < 0.05$, compared to wild-type MEF).

wild-type embryonic livers (0.44 ± 0.04 vs. $0.35 \pm 0.01 \mu^2$, respectively; $p=0.06$) (Figure 2C). Mitochondrial metabolic activity was further evaluated by measuring the cellular oxygen consumption rate (OCR) with the Seahorse analyser. MEF from *Tcf20*^{-/-} embryos depicted an increase in real-time OCR, leading to increased rates of basal and maximal respiration compared with MEF from *Tcf20*^{+/+} embryos (0.90 ± 0.14 vs. 0.83 ± 0.15 basal pmol O₂/min/ μg protein, respectively, and 8.95 ± 1.97 vs. 3.60 ± 0.69 maximal pmol O₂/min/ μg protein, respectively; * $p < 0.05$) (Figure 3A). To determine whether this increase in the oxygen consumption in the cell culture media may also contribute to alterations in metabolic intermediates we measured succinate, fumarate, and lactate by gas chromatography mass-spectrometry in MEF from *Tcf20*^{+/+} and *Tcf20*^{-/-} embryos. We found that *Tcf20* deficiency in MEF was associated with a significant increase in succinate synthesis, which is compatible with alterations in mitochondrial metabolism. We also observed an increasing trend in the concentration of fumarate and lactate metabolites in the *Tcf20* deficiency condition, although these differences were not significant (Figure 3B). Overall, our analyses revealed a role for *Tcf20* as a regulator of mitochondria activity.

3.3 | *Tcf20* haploinsufficiency aggravates liver fibrosis in mice

Two different lines of observations led us to study the effect of *Tcf20* deficiency on fibrogenesis in vitro and in vivo. First, the role of *Tcf20* as a transcriptional regulator of *Ets1*, and *Sp1*, which are involved in the expression of extracellular matrix components.^{11-13,23,24} Second, the role played by succinate as a critical regulator of hepatic stellate cell activation in liver fibrosis through the specific binding to the G-protein coupled receptor 91 (Gpr91, also known as succinate receptor 1).²⁵ To investigate in vitro the relationship of *Tcf20* with fibrosis, we silenced *Tcf20* gene expression in hepatic stellate cells (GRX cells, Figure S3A). Interestingly, *Tcf20*-silenced GRX cells (GRX sh*Tcf20*) showed increases in the extracellular matrix component Col1a1 compared to control GRX (GRX scramble) cells ($p < 0.05$) both in basal conditions (Figure 4A) and after stimulation with TGF β 1, the major regulator of the extracellular matrix (Figure S3B). Since Col1a1 expression in hepatic stellate cells is also associated with an increase in reactive oxygen species (ROS),²⁶ we assessed ROS in these cells by using the dichlorofluorescein (DCF)

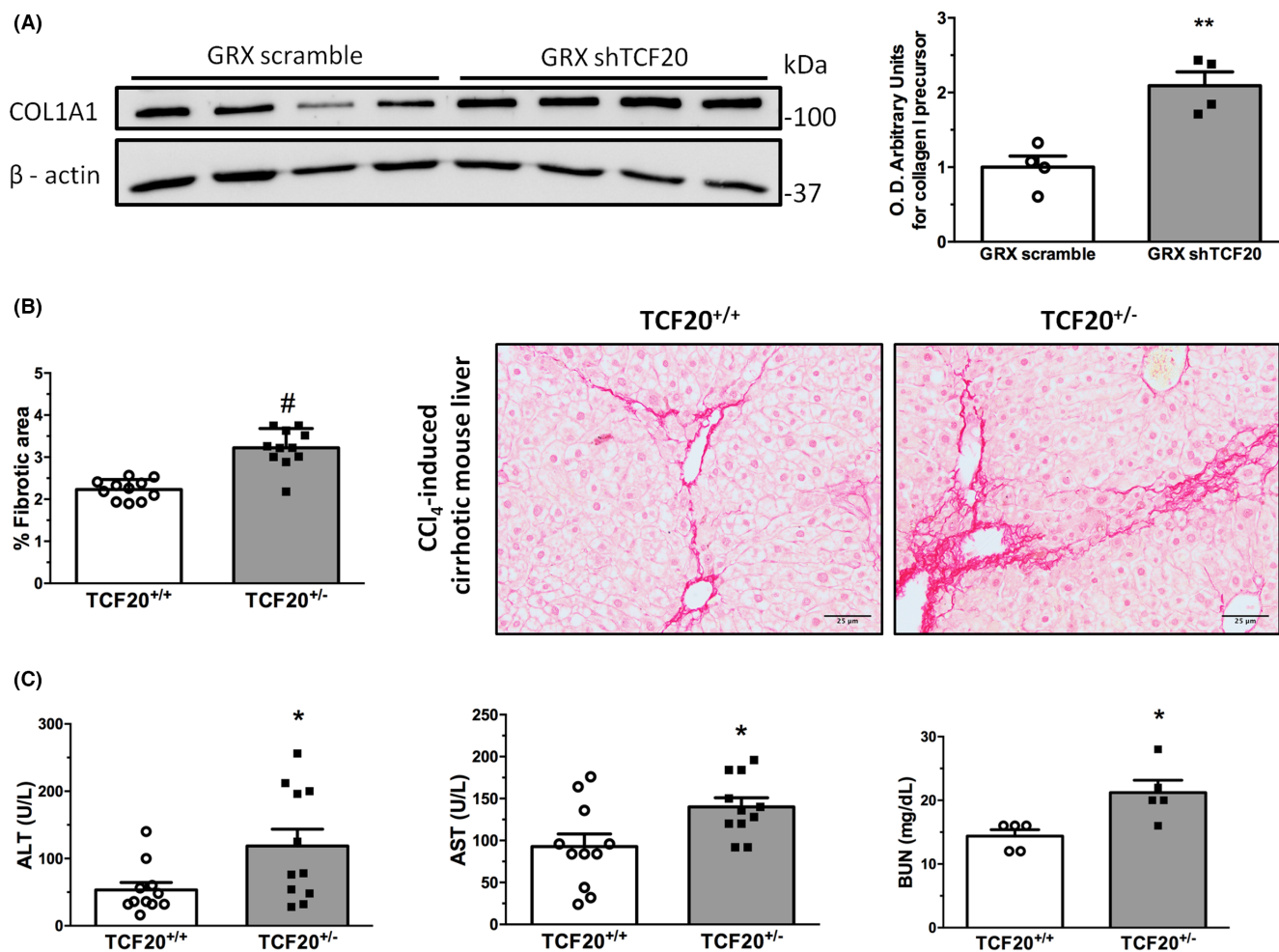


FIGURE 4 *Tcf20* haploinsufficiency in mice liver fibrosis. (A) Western blot for collagen precursor $\alpha 1$ (Col1a1) abundance from GRX scramble cells and *Tcf20* silenced GRX cells (GRX sh*Tcf20*). β -Actin was used as loading control (mean \pm SEM; $n = 4$; ** $p < 0.01$ compared to scramble GRX cells used as control in the same experimental conditions). O.D.: Optical density. (B) Representative Sirius-Red stained liver sections from cirrhotic mice after CCl₄ treatment. Original magnification $\times 200$. (mean \pm SEM; $n = 11$; # $p < 0.0001$, versus *Tcf20*^{+/+} genotype). (C) Blood levels of ALT, AST (mean \pm SEM; $n = 11$; * $p < 0.05$ compared to *Tcf20*^{+/+} genotype) and BUN (mean \pm SEM; $n = 5$; * $p < 0.05$, compared to *Tcf20*^{+/+} genotype) after CCl₄ treatment.

assay. When *Tcf20* was silenced, GRX cells showed a significant increase of $13.6 \pm 8.3\%$ in the accumulation of DCF in comparison to that observed in non-silenced cells (Figure S3C). In this context, the deficient *Tcf20* expression in GRX also caused a decreased expression of $48.08 \pm 8.7\%$ in the antioxidative transcription factor Nrf2 levels (Figure S3D).

Next, we studied whether the depletion of *Tcf20* had an effect in the progression of liver fibrosis in vivo. After the CCl₄ fibrosis induction protocol, *Tcf20*^{+/-} mice presented a major fibrotic area when compared to control *Tcf20*^{+/+} (3.2 ± 0.1 vs. $2.1 \pm 0.1\%$ fibrosis, respectively; # $p < 0.001$) (Figure 4B); as well as increased levels of ALT (118.00 ± 27.60 vs. 53.45 ± 10.92 U/L, * $p < 0.01$), AST (140.2 ± 11.87 vs. 92.73 ± 15.05 U/L, * $p < 0.01$), and BUN (21.00 ± 2.51 vs. 14.40 ± 0.98 U/L, * $p < 0.01$) (Figure 4C).

Overall, *Tcf20* seems to have a significant role as a mediator of liver fibrosis in mice and its deficiency increased Col1a1 expression in hepatic stellate cells.

3.4 | *Tcf20* haploinsufficiency is associated with altered hepatic expression of proteins involved in fibrosis remodelling

To better understand the mechanisms by which the *Tcf20* deficiency is associated with worsening of liver fibrosis in mice, we focused on the expression of proteins involved in extracellular matrix turnover, as the interaction between *Tcf20* and metalloproteinases has been previously described for MMP3.¹⁴ MMP3 is known to be involved in the breakdown of various components of the extracellular matrix, such as certain types of collagens, elastin, proteoglycans, and laminin.²⁷ Based on these observations, we wanted to investigate whether *Tcf20* haploinsufficiency in mice affects *Mmp3* expression and extend this study to other members of the metalloproteinase (MMPs) family and metalloproteinase inhibitors (TIMPs).

Figure 5 shows that the liver of *Tcf20*^{+/-} mice overexpressed *Mmp3* and down-regulated the expression of *Timp1*, *Mmp8*, and

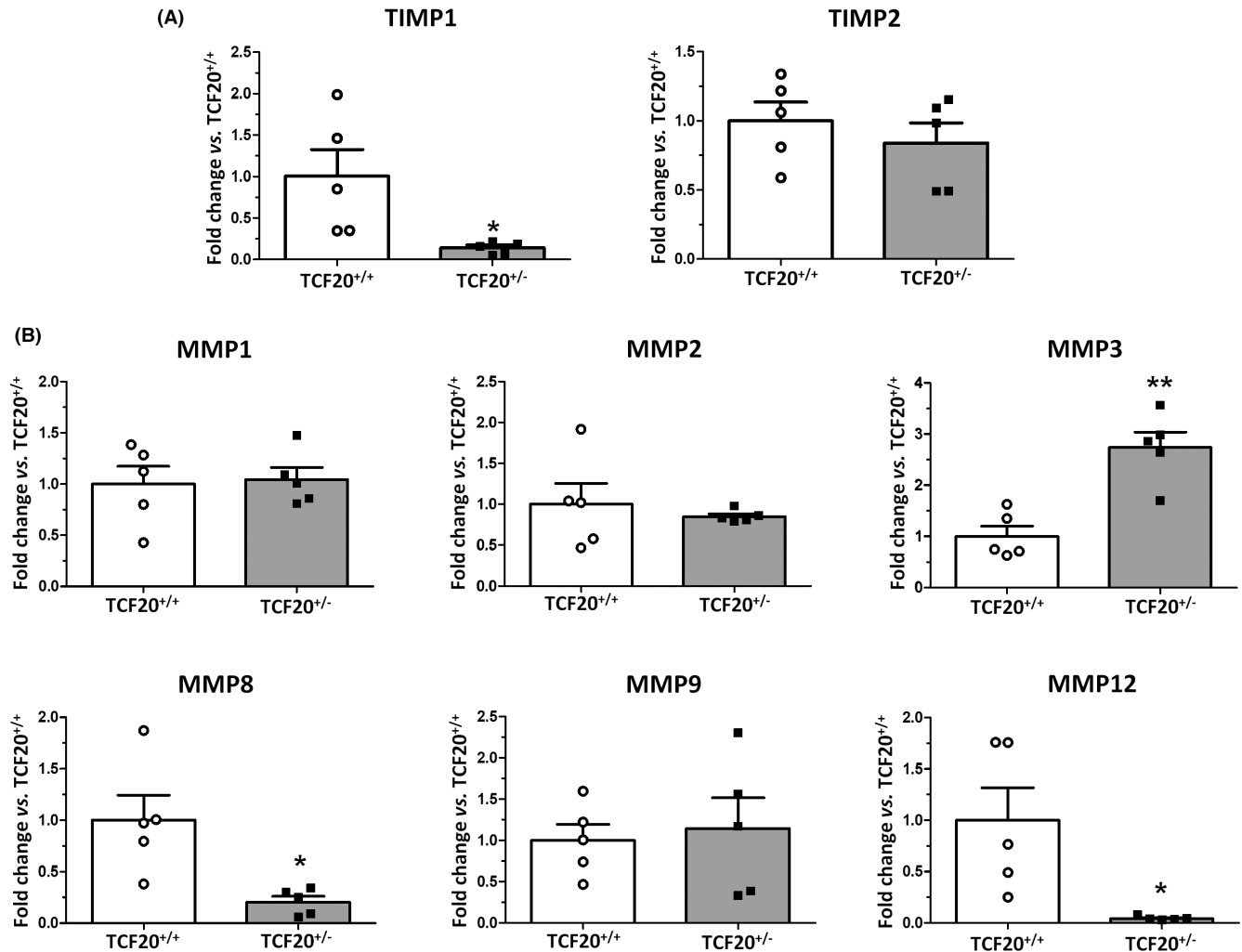


FIGURE 5 Effect of the haploinsufficiency of *Tcf20* on TIMPs and MMPs hepatic expression in mice. The expression of *Timp1*, *Timp2*, *Mmp1*, *Mmp2*, *Mmp3*, *Mmp8*, *Mmp9* and *Mmp12* was quantified by RT-qPCR in the liver of *Tcf20*^{+/+} and *Tcf20*^{+/-} mice. The expression of these TIMPs (panel A) and MMPs (panel B) family members is shown as a fold change relative to *Hprt* mRNA levels. All bar graphs depicted mean ± SEM (**p* < 0.05 versus *Tcf20*^{+/+}, ***p* < 0.01 versus *Tcf20*^{+/+}; *n* = 5 for each group).

Mmp12 compared with the wild-type mice. However, we did not detect changes in the gene expression of the other members of the MMPs and TIMPs families that we studied: *Mmp1*, *Mmp2*, *Mmp9*, or *Timp2*. Thus, changes in the expression of regulators of the extracellular matrix turnover is another mechanism by which *Tcf20* deficiency alters the response to profibrotic stimuli in mice.

3.5 | Individuals with de novo *TCF20* pathogenic variants showed elevated serum levels of biomarkers for matrix turnover and succinate

To correlate our preclinical findings of exacerbated liver fibrosis and increased mitochondrial activity in the context of *TCF20* deficiency, we recruited patients with loss-of-function variants in the *TCF20* gene and measured changes in biochemical markers of liver damage, liver function, fibrosis scores and mitochondrial metabolites. We included in the study three unrelated individuals with de

novo *TCF20* pathogenic variants. Consistent with previous reports, all three individuals exhibited variable degrees of intellectual disability and autistic features. The *TCF20* cohort's results were compared with age and sex-matched individuals with ASD but without pathogenic variants in the *TCF20* gene (control cohort) (Table 1).

Regarding liver test, the Table 2 and Figure 6 display the results and univariate analysis of the biochemical parameters and fibrosis scores obtained from the subjects enrolled in the study. The *TCF20* deficient group exhibited significantly elevated transaminase levels compared to the control cohort. One of the *TCF20* deficient subjects had transaminase levels above the reference value (43U/L of AST and 40U/L ALT; reference range <40U/L). There were no significant differences between groups for the rest of the biochemical markers we quantified, all of which were within the reference values. None of the recruited subjects presented impaired fasting glucose or diabetes.

Regarding the results of the fibrosis scores, the subjects with pathogenic variants of the *TCF20* gene displayed a significant

TABLE 1 Clinical and genomic features of ASD patients enrolled in this study.

Groups	Control ASD group			TCF20 group		
	Control Case 1	Control Case 2	Control Case 3	TCF20 Case 1	TCF20 Case 2	TCF20 Case 3
Gender	M	M	F	M	F	M
Age	14	16	14	15	16	14
TCF20 variant NM_005650.3	NA	NA	NA	22:42 264 616– 44 068 185 del* de novo	c.322C>T p.(Gln108*) de novo	c.1599_1600del p.(Arg533Serfs*12) de novo
Psychiatric features						
Speech delay	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes
Autistic disorder	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Intellectual disability	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes
SNP genotyping						
rs1260326;(c.1337 T>C)	T, C	C, C	T, C	T, C	T, C	T, C
rs738409;(c.444 C>G)	G, G	G, G	C, G	C, G	C, C	C, G
rs58542926;(c.499 C>T)	C, C	C, C	C, C	C, C	C, C	C, C
rs641738;(c.50 T>C)	C, C	T, C	T, C	T, C	C, C	T, T
PRS	0.0136	0.0136	0.0068	0.0068	0.0136	0.0068

Note: In the SNP genotyping section, the SNP associated with the highest risk for liver disease is shown in bold for each rsID number.

Abbreviations: PRS, polygenic risk score; rs1260326, gene GCKR; rs58542926, gene TM6SF2; rs641738, gene MBOAT/TMC4; rs738409, gene PNPLA3.

*Genomic coordinates are referred to GRCh37/hg19.

increase in the results of the Enhanced Liver Fibrosis (ELF) test (Figure 6A). This fibrosis score is an algorithm that combines the result of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1), hyaluronic acid (HA), and the amino-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) and offers diagnostic accuracy for advanced fibrosis in patients with liver disease.²⁸ The mean \pm SD of the ELF score in the control group was 8.63 ± 0.38 , and the mean \pm SD of the ELF score in the TCF20 deficient group was 9.49 ± 0.35 . An ELF score ≥ 9.8 , which is considered the cut-off criterion for the presence of fibrosis, was present in one of the three patients with TCF20 deficiency. Among the different components that comprise the ELF algorithm, only HA displayed significant differences between groups, with higher levels observed in the TCF20 deficient subject. We also calculated the AST to Platelet Ratio Index (APRI),²⁹ the NAFLD fibrosis score,³⁰ the Fibrosis-4 (FIB-4),³¹ and the Hepamet fibrosis scores (HFS).³² Among them, only the APRI score showed significant differences between groups (Figure 6B). The mean \pm SD of the APRI score in the control group was 0.11 ± 0.01 , and the mean \pm SD of the APRI score in the TCF20 deficient group was 0.41 ± 0.11 . In the TCF20 deficient group, the APRI value was higher than 0.50 in two of the three patients included in the study, which is considered the cut-off criterion for non-fibrosis.²⁹

Regarding the results of the mitochondrial metabolite analysis, MEF from *Tcf20*^{-/-} embryos showed increased mitochondrial activity, compared with the wild-type condition, which resulted in a significant increase in the levels of the metabolite succinate (Figure 3B). Consistent with these preclinical findings, individuals with TCF20

pathogenic variants showed significantly higher serological concentrations of succinate than control individuals ($p = 0.04$) (Figure 6C).

Collectively, our results suggest that TCF20 deficiency in humans is associated with fibrogenesis and alterations in the mitochondrial metabolism.

4 | DISCUSSION

We have previously reported that total *Tcf20* gene deficiency caused by homologous recombination was associated to newborn lethality in mice.³³ This link between the loss of TCF20 function and lethality has also recently been confirmed by Zhou et al.⁵ and Feng et al.⁶ and in experimental models of *Tcf20* deficiency generated by CRISPR/Cas9-mediated genome editing technology. Both groups showed that *Tcf20* is essential for neurogenesis during embryonic brain development. These results are in agreement with studies showing that pathologic variants in the *TCF20* gene in humans are related with different neurological disorders such as ASD, ID and DD.^{2-4,34-36} In the present study, we also observed impaired brain neurodevelopment as in Zhou et al.⁵ and Feng et al.,⁶ using specific markers to differentiate brain cortical regions in embryos; nestin for the neural progenitor cells at the ventricular zone and tubulin-beta-III for fully differentiated neurons at the cortical plate.

In previous studies, we identified *Tcf20* as a downstream target of Akt,¹⁸ which participates in hepatoprotection and liver regeneration as we previously demonstrated.^{20,37,38} This downstream target of Akt acts as a transcriptional regulator of Sp1 and Ets,^{1,8,39}



TABLE 2 Univariate analysis of biochemical parameters and fibrosis scores from the subjects enrolled in the study.

Variables and F. scores	Control ASD group (n = 3)			TCF20 cohort group (n = 3)			Mean ± SD	p-value
	Case 1 male	Case 2 female	Case 3 male	Case 1 female	Case 2 male	Case 3 male		
Age (years)	14	14	16	16	14	15	15.00 ± 1.00	0.724
Platelets (×10 ⁹ /L)	303	273	338	359	213	187	253.00 ± 92.71	0.414
AST (U/L)	14	11	17	29	43	39	37.00 ± 7.21	0.007
ALT (U/L)	7	4	5	20	40	37	32.00 ± 10.44	0.014
Weight (kg)	70.4	46.6	72	63	59.2	52	58.07 ± 5.59	0.606
Height (cm)	166.5	158	165.5	158	174	173	168.3 ± 8.96	0.440
Albumin (g/L)	46	47	44	46	48	49.4	47.8 ± 1.71	0.182
Glucose (mg/dL)	90	84	79	85	78	82	81.67 ± 3.51	0.519
Insulin (μU/mL)	14	15	13.1	12	5.9	13.3	10.40 ± 3.95	0.196
APRI	0.116	0.101	0.126	0.202	0.505	0.521	0.41 ± 0.18	0.047
NAFLD-FS	-3.76	-3.33	-2.65	-4.98	-4.19	-4.04	-4.40 ± 0.50	0.056
FIB-4	0.24	0.28	0.29	0.29	0.45	0.51	0.42 ± 0.11	0.095
HFS	0	0.01	0	0.01	0.01	0.03	0.02 ± 0.01	0.148
ELF	8.22	8.69	8.98	9.10	9.80	9.55	9.49 ± 0.35	0.046

Abbreviations: ALT, alanine transaminase; APRI, AST to platelet ratio index; AST, aspartate aminotransferase; ELF, enhanced liver fibrosis; F, scores, fibrosis scores; FIB-4, fibrosis-4; HFS, hepamet fibrosis score; NAFLD-FS, NAFLD fibrosis score. The significance of the p-values (<0.05) is highlighted in bold.

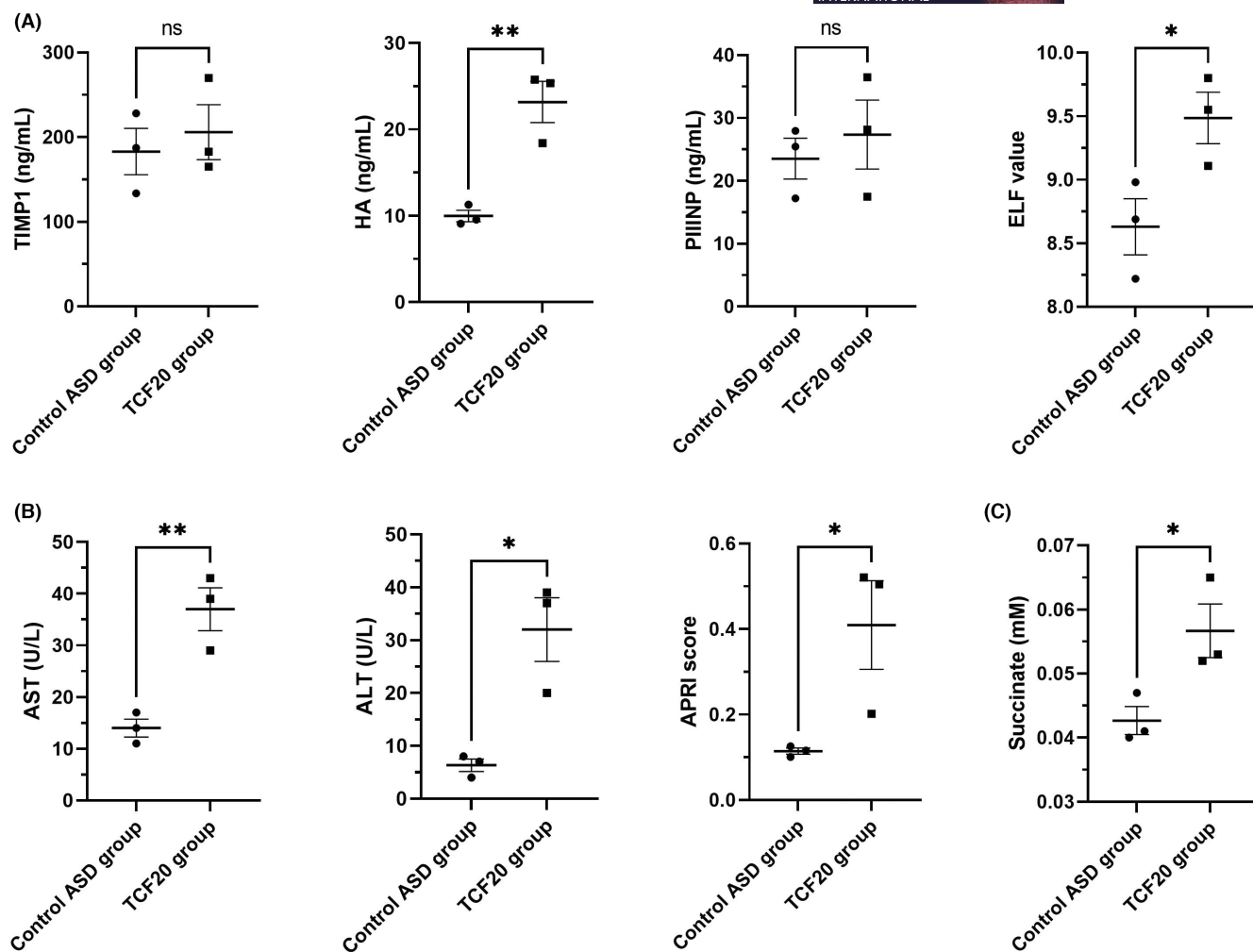


FIGURE 6 Result of biochemical parameters and fibrosis scores in subjects with pathogenic variants of *TCF20*. (A) Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1), hyaluronic acid (HA), procollagen III N-terminal propeptide (PIIINP), and enhanced liver fibrosis (ELF) in blood of individuals with autism spectrum disorder without pathogenic variants in the *TCF20* gene (control ASD group) and with pathogenic variants of the *TCF20* gene (TCF20 group). The graphs display the mean \pm SEM ($n=3$ for each group), and statistical significance is indicated as $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ between groups. (B) Serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and the aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI) results in blood of individuals from the control ASD group and the TCF20 group. The graphs display the mean \pm SEM ($n=3$ for each group), and statistical significance is indicated as $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ between groups. (C) Plasma levels of succinate measured by mass spectrometry in blood of individuals from the control ASD group and the TCF20 group. The graph displays the mean \pm SEM ($n=3$ for each group), and statistical significance is indicated as $*p < 0.05$ between groups.

both involved in collagen synthesis. These observations led us to study the role of *Tcf20* in liver physiology and pathology. In the physiology context, the analysis of the liver proteome in *Tcf20*^{-/-} E17.5 embryos pointed out to changes in the mitochondria energy metabolism. The functional validation of the proteomic results showed that *Tcf20* deficiency was associated with increased mitochondrial size in embryonic livers and increased cellular oxygen consumption rate in primary MEF isolated from *Tcf20*^{-/-} embryos. Thus, changes in mitochondrial metabolic activity represent a new function of *Tcf20*.

In the pathology context, the heterozygous deficiency of *Tcf20* was associated with aggravation of liver fibrosis and hepatic damage after CCl₄ treatment, compared with their wild-type counterparts. We showed that the likely mechanism driving this profibrogenic

effect is related to the upregulation of the *Col1a1* gene mediated by the *Tcf20* gene deficiency in hepatic stellate cells, suggesting that *Tcf20* is acting as a transcriptional repressor of collagen type I.

We also studied whether the haploinsufficiency of *Tcf20* in mice affects the liver expression of genes involved in extracellular matrix (ECM) turnover. We demonstrated a differential expression of certain members of the MMPs and TIMPs families. The observed differences in *Mmp3* hepatic expression in *Tcf20* deficient livers were expected according to what has previously been published.¹⁴ Surprisingly, we also found a differential expression pattern of *Mmp8*, *Mmp12*, and *Timp1* genes that until now have not been related to *Tcf20*. TIMP1 is considered the most important inhibitor of metalloproteinases, inhibiting most interstitial collagenases (MMP1, MMP3) and MMP9.⁴⁰ On the other hand, several studies relate the

presence of MMP8 to beneficial effects in fibrotic livers.⁴¹ In addition, Sato et al. recently reported that inhibition of MMP12 delayed fibrosis regression.⁴² Then, similarly to Mmp8, our results showed a lower expression of this protein in the liver of *Tcf20*^{+/-} mice, suggesting a harder chance of fibrotic regression in the presence of hepatic injury.

In our study, the increased mitochondrial activity in *Tcf20*^{-/-} cells was also associated with higher concentration of succinate levels, which is a critical regulator of hepatic stellate cell activation. Succinate is a metabolite generated in the tricarboxylic acid cycle and several studies have demonstrated that it also plays a major role in tumorigenesis, inflammation, and paracrine signalling in several organs and tissues including the liver through its specific receptor GPR91.^{43,44} Specifically, several studies have demonstrated that succinate is a major regulator of HSCs activation and alpha-SMA production. This conclusion was reached in these studies by perturbing the synthesis of succinate through the regulation of succinate dehydrogenase, inhibiting the GPR91 receptor with an analog of FGF21 or inhibiting GPR91 with metformin.⁴⁵⁻⁴⁷ Our findings in individuals with *TCF20* pathogenic variants further support the notion that loss of *TCF20* function is associated with higher serum succinate levels in humans.

Our results in humans are also consistent with the profibrogenic role of *Tcf20* deficiency that we described for hepatic stellate cells and in our *Tcf20* knockout mice model. We did observe higher transaminase and fibrosis score values in individuals with *TCF20* pathogenic variants compared to the control group. Among all the subjects studied, one individual from the *TCF20* cohort showed an ELF value above the cut-off criterion for the presence of fibrosis and two subjects from the same disease condition showed an APRI value higher than 0.50, which is considered the cut-off criterion for non-fibrosis. However, we did not detect significant differences between groups for the rest of the fibrosis scores that we calculated. One potential explanation for the differences detected by the APRI and ELF scores not being reflected in the other scores is that the NAFLD, FIB-4, and HFS scores, unlike the APRI and ELF scores, include the age as a variable. The age variable contributes positively to the increase in the value obtained in the NAFLD, FIB-4, and HFS scores. Therefore, the value of these scores and their ability to discriminate between groups for the presence of fibrosis may be reduced in a young population such as the one included in our study with a mean age of 14.8 years. Moreover, the association between higher fibrosis scores and liver fibrosis in humans should be interpreted with caution due to the limited sample size of our study. Another limitation to consider is the lack of imaging or histological assessment of fibrosis to evaluate the clinical relevance of the biochemical results and the fibrosis scores observed in the individuals we studied. Therefore, validation of our results with a larger sample size and imaging assessment or liver stiffness measurement is necessary in the future, bearing in mind that pathogenic variants of the *TCF20* gene are rare in the general population.

The severity and type of liver disease have been shown to be associated with different patterns of brain abnormalities. For example, nonalcoholic fatty liver disease is associated with changes

in the white matter.^{48,49} Similar to the link established in our study between *TCF20* deficiency and liver damage, other studies show that rare nonsense mutations are associated with liver disease and intellectual disability.^{50,51} For example, the study by Mancina et al. revealed that the common variant MBOAT7/TMC4 rs641738 is associated with increased liver triglyceride content and increased risk of the full spectrum of NAFLD-related liver damage, including fibrosis progression. Given all the previous evidence, it is plausible to consider that genetic factors affecting both brain and liver function could contribute to the observed associations reported in our study and other publications. However, more research is needed to explore this potential connection and shed light on the underlying biology connecting the two organs to identify potential interventions and improve outcomes in this population.

Strengths of our study include the agreement of the metabolic and profibrotic alterations that we found in the experimental model of *Tcf20* deficiency with the concordant results that we obtained in the cohort of patients with *TCF20* pathogenic variants recruited multicentrically. The strength of this association between our animal model and the results obtained in human samples support the recommendation of performing measurements of serum succinate and direct fibrosis biomarkers in this selected population during follow-ups as a non-invasive biomarker of metabolic alterations and fibrosis. Getting routinely measurements of direct fibrosis biomarkers may be clinically helpful considering that liver fibrosis can develop in asymptomatic individuals.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank all the patients and family members that participated in the study. We thank the CIBERER and Share4Rare networks for their collaboration.

FUNDING INFORMATION

We acknowledge the support from grants PDI2019-105502RB-I00 and PID2022-138243OB-I00 to MM-R, PID2019-111669RB, BES-2017-080823 to IP "ESF Investing in your future", and RTI2018-094734-B-C21 to WJ and PM-L, from MCIN/AEI/10.13039/501100011033. RedFibro (RED2022-134485-T) of the 2022 caLL for aid to «RESEARCH NETWORKS», within the framework of the Programa Estatal del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2021-2023. Consolidated Research Group of the Generalitat de Catalunya AGAUR (2021 SGR 00881 to MM-R) and PM-L financed ESF Investing in your future, support from AGAUR of the Generalitat de Catalunya. Fundación Mutua Madrileña AP171442019, European Cooperation in Science & Technology (COST) ACTION CA17112 Prospective European Drug-Induced Liver Injury Network, and the Project 201916/31 Contribution of mitochondrialoxysterol and bile acid metabolism to liver carcinogenesis 2019 by Fundació Marató TV3. PM-L was additionally supported by a fellowship from the Ramon y Cajal Program (RYC2018-0223971-I) and a grant (PID2021-123426OB-I00) from the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. CIBERehd is financed by the Instituto de Salud Carlos III.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

ETHICS STATEMENT

All animal experiments follow the guidelines of the Investigation and Ethics Committees of Hospital Clinic and the University of Barcelona after study approval.

All the individuals were recruited under research protocols approved by the Ethic Committee of their respective institutions. This study was conducted in accordance with the principles of the Declarations of Helsinki and Istanbul.

PATIENT CONSENT STATEMENT

All patients provided written informed consent prior to enrollment.

ORCID

Wladimiro Jiménez  <https://orcid.org/0000-0002-9376-0214>

Manuel Morales-Ruiz  <https://orcid.org/0000-0002-9074-2272>

REFERENCES

1. Rekdal C, Sjøttem E, Johansen T. The nuclear factor SPBP contains different functional domains and stimulates the activity of various transcriptional activators. *J Biol Chem.* 2000;275:40288-40300.
2. Babbs C, Lloyd D, Pagnamenta AT, et al. De novo and rare inherited mutations implicate the transcriptional coregulator TCF20/SPBP in autism spectrum disorder. *J Med Genet.* 2014;51:737-747.
3. Vetrini F, McKee S, Rosenfeld JA, et al. De novo and inherited TCF20 pathogenic variants are associated with intellectual disability, dysmorphic features, hypotonia, and neurological impairments with similarities to Smith-Magenis syndrome. *Genome Med.* 2019;11:12.
4. Schäfer J, Cremer K, Becker J, et al. De novo nonsense and frameshift variants of TCF20 in individuals with intellectual disability and postnatal overgrowth. *Eur J Hum Genet.* 2016;24:1739-1745.
5. Zhou J, Hamdan H, Yalamançılı HK, et al. Disruption of MeCP2-TCF20 complex underlies distinct neurodevelopmental disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119:e2119078119.
6. Feng C, Zhao J, Ji F, Su L, Chen Y, Jiao J. TCF 20 dysfunction leads to cortical neurogenesis defects and autistic-like behaviors in mice. *EMBO Rep.* 2020;21:e49239.
7. Lyngso C, Bouteiller G, Damgaard CK, et al. Interaction between the transcription factor SPBP and the positive cofactor RNF4. An interplay between protein binding zinc fingers. *J Biol Chem.* 2000;275:26144-26149.
8. Sjøttem E, Rekdal C, Svineng G, et al. The ePHD protein SPBP interacts with TopBP1 and together they co-operate to stimulate Ets1-mediated transcription. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:6648-6662.
9. Elvenes J, Ivan E, Thomassen S, et al. Pax6 represses androgen receptor-mediated transactivation by inhibiting recruitment of the coactivator SPBP. *PLoS ONE.* 2011;6:24659.
10. Darvekar SR, Elvenes J, Brenne HB, Johansen T, Sjøttem E. SPBP is a sulforaphane induced transcriptional coactivator of NRF2 regulating expression of the autophagy receptor p62/SQSTM1. *PLoS ONE.* 2014;9:85262.
11. Sharma U, Carrique L, Vadon-Le Goff S, et al. Structural basis of homo- and heterotrimerization of collagen I. *Nat Commun.* 2017;8:14671.
12. Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Tamaki K. Potential regulatory elements of the constitutive up-regulated $\alpha 2(I)$ collagen gene in scleroderma dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;343:904-909.
13. Yang Y, Kim HJ, Woo KJ, Cho D, Bang SI. Lipo-PGE1 suppresses collagen production in human dermal fibroblasts via the ERK/Ets-1 signaling pathway. *PLoS ONE.* 2017;12:e0179614.
14. Sanz L, Moscat J, Diaz-Meco MT. Molecular characterization of a novel transcription factor that controls stromelysin expression. *Mol Cell Biol.* 1995;15:3164-3170.
15. Park K-S, Kim H, Kim HJ, Lee K-I, Lee S-Y, Kim J. Paeoniflorin alleviates skeletal muscle atrophy in ovariectomized mice through the ER α /NRF1 mitochondrial biogenesis pathway. *Pharmaceuticals.* 2022;15:390.
16. Verschoor ML, Verschoor CP, Singh G. Ets-1 global gene expression profile reveals associations with metabolism and oxidative stress in ovarian and breast cancers. *Cancer Metab.* 2013;1:17.
17. Villavicencio-Tejo F, Olesen MA, Aránguiz A, Quintanilla RA. Activation of the Nrf2 pathway prevents mitochondrial dysfunction induced by Caspase-3 cleaved tau: implications for Alzheimer's disease. *Antioxidants.* 2022;11:515.
18. Lee MY, Luciano AK, Ackah E, et al. Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:12865-12870.
19. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129:1261-1274.
20. Pauta M, Rotllan N, Fernández-Hernando A, et al. Akt-mediated FoxO1 inhibition is required for liver regeneration. *Hepatology.* 2016;63:1660-1674.
21. Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G. Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol.* 2004;469:311-324.
22. Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mörk SJ. Class III β -tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J Child Neurol.* 2003;18:851-866.
23. Jinnin M, Ihn H, Yamane K, Mimura Y, Asano Y, Tamaki K. $\alpha 2(I)$ collagen gene regulation by protein kinase C signaling in human dermal fibroblasts. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:1337-1351.
24. Trojanowska M. Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene.* 2000;19:6464-6471.
25. Cho EH. Succinate as a regulator of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:455.
26. Novo E, Marra F, Zamara E, et al. Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut.* 2006;55:90-97.
27. Okada Y, Nagase H, Harris ED. A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 1986;261:14245-14255.
28. Vali Y, Lee J, Boursier J, et al. Enhanced liver fibrosis test for the non-invasive diagnosis of fibrosis in patients with NAFLD: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2020;73:252-262.
29. Wai CT, Greenon JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2003;38:518-526.
30. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology.* 2007;45:846-854.
31. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology.* 2006;43:1317-1325.

32. Ampuero J, Pais R, Aller R, et al. Development and validation of hepamet fibrosis scoring system—a simple, noninvasive test to identify patients with nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18:216-225.e5.
33. Córdoba-Jover B, Ribera J, Portolés I, et al. THU-070—the nuclear factor TCF20 regulates the severity of liver fibrosis in mice. *J Hepatol*. 2019;70:e190.
34. Lelieveld SH, Reijnders MRF, Pfundt R, et al. Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. *Nat Neurosci*. 2016;19:1194-1196.
35. Ahmed M, Balasubramanian M, Banka S, et al. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders code availability source code for filtering candidate DNMs, testing DNM enrichment, DNM clustering and phenotypic similarity can be found here author contributions patient recruitment and phenotyping: Europe PMC Funders Group. *Nature*. 2017;542:433-438.
36. Lin Y, Afshar S, Rajadhyaksha AM, Potash JB, Han S. A machine learning approach to predicting autism risk genes: validation of known genes and discovery of new candidates. *Front Genet*. 2020;11:500064.
37. Morales-Ruiz M, Cejudo-Martín P, Fernandez-Varo G, et al. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology*. 2003;125:522-531.
38. Tanaka M, Utsumi T, Saruwatari J, Zhang PP, Morales-Ruiz M, Iwakiri YPJ. The sympathetic nervous system is a novel regulator of hepatic lymphangiogenesis in portal hypertension. *Hepatology*. 2018;68:772A.
39. Kirsteinen M, Sanz L, Quiñones S, Mosca J, Diaz-Meco MT, Saus J. Cross-talk between different enhancer elements during mitogenic induction of the human stromelysin-1 gene. *J Biol Chem*. 1996;271:18231-18236.
40. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, La Rosa CCD, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21:1-53.
41. Siller-López F, García-Baueles J, Hasty KA, et al. Truncated active matrix metalloproteinase-8 gene expression in Hepg2 cells is active against native type I collagen. *J Hepatol*. 2000;33:758-763.
42. Sato T, Head KZ, Li J, et al. Fibrosis resolution in the mouse liver: role of Mmp12 and potential role of calpain 1/2. *Matrix Biol Plus*. 2023;17:100127.
43. De Castro FM, Aguiar CJ, Da Rocha Franco JA, Gingold RN, Leite MF. GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. *Cell Commun Signal*. 2016;14:1-9.
44. He W, Miao FJP, Lin DCH, et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2004;429:188-193.
45. Li YH, Choi DH, Lee EH, Seo SR, Lee S, Cho EH. Sirtuin 3 (SIRT3) regulates α -smooth muscle Actin (α -SMA) production through the succinate dehydrogenase-G protein-coupled receptor 91 (GPR91) pathway in hepatic stellate cells. *J Biol Chem*. 2016;291:10277-10292.
46. Le CT, Nguyen G, Park SY, Choi DH, Cho EH. LY2405319, An analog of fibroblast growth factor 21 ameliorates α -smooth muscle Actin production through inhibition of the succinate—G-protein couple receptor 91 (GPR91) pathway in mice. *PLoS ONE*. 2018;13:e0192146.
47. Nguyen G, Park SY, Le CT, Park WS, Choi DH, Cho EH. Metformin ameliorates activation of hepatic stellate cells and hepatic fibrosis by succinate and GPR91 inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495:2649-2656.
48. Petta S, Tuttolomondo A, Gagliardo C, et al. The presence of white matter lesions is associated with the fibrosis severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine*. 2016;95:e3446.
49. Peng Z, Duggan MR, Dark HE, et al. Association of liver disease with brain volume loss, cognitive decline, and plasma neurodegenerative disease biomarkers. *Neurobiol Aging*. 2022;120:34-42.
50. Heidari E, Caddeo A, Zarabadi K, et al. Identification of novel loss of function variants in MBOAT7 resulting in intellectual disability. *Genomics*. 2020;112:4072-4077.
51. Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, et al. The MBOAT7-TMC4 variant rs641738 increases risk of nonalcoholic fatty liver disease in individuals of European descent. *Gastroenterology*. 2016;150:1219-1230.e6.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Córdoba-Jover B, Ribera J, Portolés I, et al. Tcf20 deficiency is associated with increased liver fibrogenesis and alterations in mitochondrial metabolism in mice and humans. *Liver Int*. 2023;43:1822-1836. doi:[10.1111/liv.15640](https://doi.org/10.1111/liv.15640)

Tcf20 deficiency is associated with increased liver fibrogenesis and alterations in mitochondrial metabolism in mice and humans

Bernat Córdoba-Jover¹, Jordi Ribera¹, Irene Portolés¹, Elena Lecue¹, Juan Rodríguez-Vita², Leticia Pérez-Sisqués³, Francesco Mannara⁴, Estel Solsona-Vilarrasa^{5,6}, Carmen García-Ruiz^{5,6,7}, José C. Fernández-Checa^{5,6,7}, Gregori Casals^{1,3}, Laia Rodríguez-Revengea¹, María Isabel Álvarez-Mora^{1,8}, Ana Arteche-López^{8,9}, Aranzazu Diaz de Bustamante¹⁰, Rosa Calvo^{4,11}, Anna Pujol¹², Mikel Azkargorta¹³, Felix Elortza¹³, Cristina Malagelada³, Roser Pinyol¹⁴, Júlia Huguet-Pradellas¹⁴, Pedro Melgar-Lesmes^{1,3}, Wladimiro Jiménez^{1,3}, Manuel Morales-Ruiz^{1,3*}.

*Corresponding author:

Manuel Morales-Ruiz, Ph.D., Biochemistry and Molecular Genetics

Department, Hospital Clinic, 170 Villarroel St. Barcelona, 08036, Spain. Tel:

+34-932275466, Fax: +34-932275697, e-mail: morales@clinic.cat

Table of content:

1. Additional Methods
2. Additional Results
3. Additional Figures and Legends
4. Supplementary tables
5. Additional References

1. Additional Methods

Black and white test. This test measures the conflict between the natural tendency of rodents to explore new environments and the tendency to avoid brightly illuminated areas and it is widely used as a paradigm to measure anxiety-like behavior. The box (Panlab, Barcelona, Spain) consisted of two compartments, one (16x25x24 cm) was painted black and maintained at 10 lux, while the other compartment (25x25x24cm) was painted white and brightly illuminated (500 lux). A door separated the two compartments. The white compartment was ideally subdivided into three sections (distal, medial and proximal), based on the distance from the door. At the start of the session, mice were placed individually in the center of the white compartment, head facing the distal wall. The number of entries and the time spent in the white compartment and in the distal section were recorded over a period of five minutes using the videotracking software Smart 3.0 (Panlab, Barcelona, Spain).

Mouse embryonic fibroblasts isolation. Both mouse embryonic fibroblasts (MEF) cells, *Tcf20* knock-out and wild-type, were obtained from embryos as described in *Durkin ME et al.*¹ Heterozygous pregnant mice were euthanized to obtain embryos (E13.5) that were processed separately in order to be able to differentiate *Tcf20* knock-out MEF from wild-type and heterozygous MEF cells. Embryo's head was used for genotyping. Cells were cultured and maintained in DMEM High Glucose media (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 10% FBS, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ until they reached 75% confluence. After that time, cells were transferred to larger plates, amplified, and

cryopreserved for further experiments. To immortalize this cell line, cells were cultured and maintained during 10 weeks for them to reach the critical phase. After two weeks of quiescence where only medium renovation were performed, MEF cells began to grow again meaning they were immortalized. All experiments were planned with cells reaching 75% of confluence in the culture dish at the end time.

Carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. Liver fibrosis in *Tcf20^{+/+}* and *Tcf20^{+/-}* mice was induced by intraperitoneal administration of carbon tetrachloride (CCl₄) (1mL/kg of body weight (previously diluted 1:8 v/v in corn oil) three times a week for four weeks). *Tcf20^{+/+}* mice served as a control group. At the end of the treatment, mice (n=11 for each group) were euthanized and serum and liver tissue samples were obtained for further studies. Hepatic tissue was fixed in a 4% solution of paraformaldehyde (pH=7.4) and included in paraffin.

Fibrotic area quantification in liver tissue. Collagen deposition was detected by Sirius Red staining. Liver sections (2µm thick) from CCl₄ treated mice were deparaffined and rehydrated before being immersed in 0.1% Sirius red F3B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in saturated picric acid (Sigma-Aldrich) for 1h. Then, slides were rinsed in distilled water, dehydrated and mounted. Images of stained liver sections of each animal were taken with an optical microscope (Olympus Bx 45; Olympus Corporation) at 200x magnification. The relative fibrotic area (% of total liver area) was calculated by analyzing 15 fields of Sirius-red stained sections per animal using the imaging software ImageJ (version 1.52b; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). To determine the relative fibrotic area, the quantified collagen area was divided by the net

field area and then multiplied by 100. Subtraction of vascular luminal area from the total field area provided the final calculation of the net fibrotic area. The measured fibrotic area in each animal was analyzed, and the average value is presented as a percentage.

Brain immunofluorescence staining. Frozen brain sections of 20- μ m from *Tcf20^{+/+}* and *Tcf20^{-/-}* mice embryo E17.5 were rehydrated, blocked with 5% normal goat serum and incubated with mouse anti-nestin (5 μ g/mL, Developmental Studies Hybridoma Bank, Clone rat-401) and rabbit anti-Tubulin- β III (0.5 μ g/mL, BioLegend, TUBB3) antibodies 4°C overnight in a humidified chamber. Then brain sections were washed with PBS (3 times, 5min/each) and incubated with secondary antibodies Goat anti-mouse Alexa 488 (1:250) and Goat anti-rabbit Alexa-568 (1:250) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Controls without primary antibodies were revealed with Alexa-488 goat-anti-rabbit IgG (1:500, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Next, slides were mounted with mounting medium containing DAPI (VECTASHIELD®, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Tissue slides were visualized with a fluorescence microscope (Zeiss Axio Observer Z1, Zeiss, Germany). Relative distance from each brain zone (cortical plate, intermediate zone, sub-ventricular zone and ventricular zone) was measured using Image J (version 1.37, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Biochemistry assays. Serum from CCl₄-induced fibrosis mice was obtained by blood centrifugation and biochemical parameters were assayed using an Atellica automated analyzer (Siemens Healthineers, Tarrytown, NY, USA). The intra-assay and interassay coefficient of variation were lower than 6% and 8%, respectively, in all cases. All the parameters were measured according to the

manufacturer instructions at the Core Laboratory of the Biomedical Diagnostic Centre of the Hospital Clinic of Barcelona. In these serum samples, aspartate aminotransferase (AST) alanine transaminase (ALT) and blood urea nitrogen (BUN) were determined.

Hematoxylin-eosin staining. Lung and heart tissues from *Tcf20^{+/+}* and *Tcf20^{-/-}* mice embryo at stage of development E17.5 were microscopically evaluated by performing hematoxylin-eosin staining (Hematoxylin Solution, Gill No. 3, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) on lung and heart sections included in paraffin. All the histology images were taken using a light microscope coupled with a digital image acquisition system (Nikon Eclipse E600, Kawasaki, Kanagawa, Japan).

GRX cells culture. GRX cells (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil)² derived from normal primary mouse hepatic stellate cells that had been immortalized through viral transduction of the middle T antigen from the SV40 retrovirus. GRX cells were cultured and maintained in Dubelco's modified Eagle medium (DMEM) High Glucose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 10% FBS, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 5mM HEPES (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. *Tcf20* silenced GRX cells were cultured in the same conditions mentioned before adding Puromycin 1µg/mL. For the TGFβ1 stimulation experiments, cells were cultured in the same conditions mentioned before adding 1ng/mL of TGFβ1 24h before the protein extraction protocol for the western blot. All experiments were planned with cells reaching 75% of confluence in the culture dish at the end time.

Mitochondria analysis by transmission electron microscopy. Mitochondria analysis was assessed using Transmission electron microscopy (TEM). *Tcf20^{+/+}*

and *Tcf20^{-/-}* mouse embryo liver tissue samples were fixed in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde. Samples were embedded in Spur's resin to cut sections 50–55nm in size that were placed on copper grids and then stained with uranyl acetate and lead citrate. Digital photomicrographs were acquired with a low electron power microscope to increase contrast in a JEOL-1010 TEM (JEOL, Tokyo, Japan) operated at 80kV and equipped with a BioScan camera (Gatan, CA, USA). Observed mitochondria area (μm^2), mitochondria perimeter (μm), mitochondria roundness (arbitrary units from the roundness calculator of ImageJ) and the number of mitochondria per area (Num. Mito/ μm^2) were measured by analyzing 6 fields of liver sections per animal using ImageJ software. The measured parameters in each animal were analyzed, and the average value is presented in the corresponding units mentioned before.

Proteomic analysis. The proteome of liver samples from wild type and knock-out E17.5 mice embryo was analysed by nano scale liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nLC MS/MS). Liver tissue was incubated with cell lysis buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS and 10mM DTT) and homogenised in Precellys (Bertin Instruments). Extracted protein was digested following the filter aided sample preparation (FASP) protocol described by *Wiśniewski et. al.*³ with minor modifications. Trypsin was added to a trypsin:protein ratio of 1:20, and the mixture was incubated 2h at 37°C. After recovery, peptides were dried out in a RVC2 25 speedvac concentrator and resuspended in 0.1% formic acid (FA). Peptides were desalted and resuspended in 0.1% FA using C18 stage tips (Agilent) prior to acquisition. For proteomic analysis liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-

MS/MS) approach was applied by using a nanoAcquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) on-line coupled to an Orbitrap XL (Thermo Electron, Bremen, Germany). Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics) was used for the label-free differential protein expression analysis. The significance of expression changes was tested at protein level, and proteins identified with at least two peptides and an ANOVA p-value lower than 0.05 were selected for further analyses. Signalling pathways altered by *Tcf20* deficiency were modelled using Ingenuity Pathway Software (Ingenuity® Systems, Inc., Redwood City, USA). The resulting p-values obtained by the Ingenuity Pathways Knowledge Base were adjusted for multiple comparisons using Benjamini and Hochberg's method.

Metabolic analysis. The metabolites analysed were lactate, and fumarate in MEF samples and succinate in both, MEF and human samples. The gas chromatography mass spectrometry analysis was performed on a Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra instrument (Kyoto, Japan). The chromatographic column was a Sapiens-5MS+ capillary column (30m×0.25mm internaldiameter×0.25µm film thickness) from Teknokroma (Barcelona, Spain) with helium as a carrier gas at a constant velocity (50cm/s). The oven temperature conditions were as follows: started at 100°C, maintained at this temperature for 2min, elevated at 15°C/min to 115°C, increased at 80°C/min until 300°C and maintained for 6min at 300°C. The total run time was 11min. The ion source and transfer line temperatures were set to 250°C and 280°C, respectively. The mass detector was operated in synchronous selected ion monitoring (SIM) mode (m/z 117, 118, 245, 247, 249, 251). Identification of the analytes in the sample extracts was achieved via GC retention time and comparison with reference standards. One µL was injected into the chromatographic system and four pre- and

postinjection washes with cyclohexane (Supleco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were performed between injections. For the preparation of the internal standard (IS), the deuterium labelled metabolites were mixed in at concentrations of 0.2mM for fumarate, 0.2mM for succinate, and 11mM for lactate. For the sample preparation, internal standard standards were added to 200µL of serum and protein precipitation was performed by adding zinc sulphate (ZnSO₄) and barium hydroxide (Ba(OH)₂) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After centrifugation at 10000g during 10 minutes, the supernatant was collected and deposited in a glass tube. Then, 120µL of 5M hydrochloric acid (HCl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 4mL of ethyl acetate (Scharlab, Barcelona, Spain) were added. After the extraction, the tubes were centrifuged at 3000g during 10 minutes at room temperature. The organic phase was collected, transferred to a new glass tube, and evaporated under nitrogen flow at 37°C. The extracts were derivatized with 50µL of pyridine (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA) and 50µL of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSFTA+TMCS) (Supleco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Oxygen consumption rate (OCR) in MEF. In vivo real-time mitochondrial respiration was monitored with the Seahorse XFe2 Flux Analyser (Seahorse Bioscience) according to the manufacturer's instructions. Wild type and *Tcf20*^{-/-} MEF cells were seeded at 20000, 30000 and 40000 cells per well in 3–4 replicates for each density in a 24-well plate custom designed for XFe24 analysis and cultured overnight in MEFs culture media. For assessment of the real-time OCR, cells were incubated with unbuffered assay media (XF Media Base with 5.5mM glucose, 2mM L-glutamine and 1mM sodium pyruvate)

followed by sequential injection of oligomycin (final concentration 2 μ M), carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP; final concentration 2 μ M), and rotenone plus antimycin A (final concentration 1 μ M each). The results for the mitochondrial assay were analyzed by the XFe wave software (Seahorse Bioscience INC., MA), and displayed as OCR normalized to μ g of total protein following BCA protein assay (pmol/min per μ g of protein).

Reactive oxygen species quantification in GRX cells. Reactive oxygen species were measured by fluorescence spectrophotometry using 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF) as a probe. For these experiments, GRX cells with or without *Tcf20* expression silenced were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with 10 μ M DCF-DA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in DMEM High Glucose for 40min at 37 °C in the dark. The supernatant was collected to measure the extracellular production of ROS, and the intensity of fluorescence was immediately read in a fluorescence spectrophotometer (FLUOstar Optima; BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at 485nm for excitation and at 520nm for emission.

***Tcf20* gene silencing in GRX cells.** GRX cells were transfected with *Tcf20* Mouse shRNA Plasmid (Locus ID: 21411; OriGene Technologies, Rockville MD 20850, USA) that express a specific shRNA sequence that allowed silencing of *Tcf20* expression. Scramble Mouse shRNA Plasmid (OriGene) was used as a control. Transfection was performed with GRX cells at 75-80% confluence in 6-well plates, using LipofectamineTM (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) as transfecting agent mixed with silencing plasmid or scramble plasmid, following manufacturer's instructions. 24h after transfection, puromycin (1 μ g/mL) was added to the culture medium to select well-transfected cells. Cells

were maintained in puromycin selection for two weeks to assure stable transfection. After that time, cells were transferred to larger plates, amplified and cryopreserved for further experiments.

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Total RNA was extracted from cultured GRX cells with and without *Tcf20* silenced expression, and from wild-type and *Tcf20*^{+/-} mouse liver tissue, using the Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). One microgram of total RNA was reverse transcribed using First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany). Then, complementary DNA was amplified for 30-35 cycles with the following conditions: 94°C for 30s, 55-60°C for 30s, and 72°C for 1min (LightCycler 480-Roche Diagnostics). To normalize results, *Hprt* gene was used as reference. Specific primers for amplification of the complementary DNA can be found in Supplementary Table 1.

Western blots. Cell lysates were prepared in a lysis buffer (Tris-HCl 20mM pH 7.4 containing 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50mM NaCl, 2.5mM EDTA, 1mM Na₄P₂O₇ 10H₂O, 20mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 2mM Pefabloc and Complete® from Roche, Basel, Switzerland). Proteins were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel (Mini Protean III, BioRad, Richmond, CA, USA) and transferred for 7min, at room temperature to 0.2µm nitrocellulose transfer membranes (BioRad, Richmond, CA, USA) using Trans-blot Turbo Transfer System (BioRad, Richmond, CA, USA). Membranes were incubated at 4°C overnight with the following antibodies; TCF20 (1:1000, ab112089, Abcam, Cambridge, UK), COL1A1 (1:1000, ab34710, Abcam, Cambridge, UK), and rabbit anti β-actin (13E5 HRP conjugate, 1:1000, #4970, Cell Signaling, Danvers MA, USA). Membranes were incubated with a donkey ECL™-anti-

rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at 1:5000 dilution (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) for 1 hour at room temperature. Bands were visualized using Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) and ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Densitometry analysis of membranes was performed using Image J (version 1.37, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Hepatic lipid profiling by mass spectrometry analysis. Liver tissue (50 mg) from wild type and knock-out E17.5 mice embryo was homogenized in chloroform: methanol (2:1, v/v, Scharlab, Barcelona, Spain, 372978 and PanReact AppliChem, Darmstadt, Germany, 1310911611, respectively) containing 0.005 % butylated hydroxytoluene (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA, W218405). Glyceryl trinonadecanoate (TG (19:0/19:0/19:0) Sigma Aldrich, Madrid, Spain), cholesteryl heptadecanoate (CE (17:0)), 1,2- dinonadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PC (19:0/19:0)), and 1,2- dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (PE (15:0/15:0)) were used as internal standards. Separation of triglycerides (TG), cholesterol esters (CE), phosphatidylcholines (PC), and phosphatidylethanolamines (PE) was performed by solid-phase extraction (SPE) using aminopropyl silica columns. First, the CE and TG fractions were eluted with chloroform. Thereafter, PC were eluted with chloroform: methanol (3:2, v/v), and PE were eluted with methanol. In order to isolate CE and TG, the first fraction was evaporated under nitrogen stream, dissolved in hexane (Merck Millipore, Darmstadt, Germany, 104374) and transferred to a fresh preconditioned aminopropyl silica column preconditioned with hexane. Then CE were eluted with hexane, and TG 10 were eluted with hexane: chloroform: ethylacetate (100:5:5, v/v). All solvent fractions containing

isolated lipids were dried under nitrogen stream and transesterified (FAME) with 0.5 M NaOH and boron trifluoride (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA, B1252) in methanol.

Gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) analyses of FAME were performed on a Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra instrument (Kyoto, Japan). Final extracts were injected in splitless mode (valve opened at 1 min) into the gas chromatograph interfaced with a mass selective detector. Chromatographic separation was achieved on a Sapines-5MS+ capillary column (30 m × 0.25 mm internal diameter × 0.25 µm film thickness) from Teknokroma (Barcelona, Spain) with helium as a carrier gas at a constant velocity of 50 cm/s. The temperature program began at 50 °C, was maintained at this temperature for 3 min, then elevated at a 80 °C min⁻¹ rate to 240 °C, followed by an increase at a 2 °C min⁻¹ rate until 290 °C that were maintained for 2 min. The ion source and transfer line temperatures were set at 250 °C and 280 °C, respectively. The mass detector was operated in scan mode. Identification of the FAME in the sample extracts was achieved by mass spectrum and GC retention time comparison with reference standards (Sigma). Results are expressed as nmol of FA/mg of liver tissue.

Food intake measurement. For the food intake study, 13-month-old wild-type and *Tcf20*^{+/-} mice were individually housed in metabolic cages. After one week of acclimatation (point 0), body weight and food intake were monitored for 5 weeks. Body weight was measured weekly, and food intake was recorded daily. After 5 weeks of experimental measurements, blood was collected.

Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping. In order to evaluate the presence of a polygenic risk score for hepatic fibrosis we evaluated the

presence of the SNPs rs1260326 (Glucokinase regulator gene, *GCKR*), rs738409 (Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3, *PNPLA3*), rs58542926 (Transmembrane 6 Superfamily Member 2, *TM6SF2*), and rs641738 (transmembrane channel-like protein 4, *MBOAT/TMC4*) in the individuals enrolled in this study. For the TCF20 patients, the genotypes were extracted from the next generation sequencing (NGS) data previously generated. For the ASD control group, PCR primers were designed using the Primer3 Input version 4.0.0 web tool (<http://primer3.ut.ee/>) target to rs1260326 (*GCKR*: c.1337T>C) (f:5'-CAG CCT TTC GAC TCT GAT GC -3' and r:5'- TGA TGA TGG AGG GAA AGA GCT -3'), rs738409 (*PNPLA3*: c.444C>G) (f:5'- GTT TGT TGC CCT GCT CAC TT -3' and r:5'- AGG CAG GAG ATG TGT GAG C -3'), rs58542926 (*TM6SF2*: c.499C>T) (f:5'- ACA AAC AGA TGT CCA GCA GG -3' and r:5'- ACT GAC ACG GGG AAA GTT CA -3'), rs641738 (*MBOAT/TMC4*: c.50T>C) (f:5'- CAG GAG ACC TTT CGC ATC AG -3' and r:5'- CTG AGC TTC TCC TGG CAT TC -3'). PCR products were directly sequenced by Sanger method using the BigDye® Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction was run in an ABI Prism 3100XL automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the results were analyzed with SEQUENCE® Pilot version 4.0.1 software (JSI medical systems GmbH, USA).

The Polygenic Risk Score for liver fibrosis associated to these SNP was calculated using the Polygenic Risk Score Knowledge Base (PRSKB) web tool (<https://prs.byu.edu>).⁴ We contextualize polygenic risk scores for liver fibrosis using the following GWAS studies included in the knowledge base: GCST008469,⁵ GCST010418,⁶ and GCST010677.⁷ The reported scores were

normalized to the 1000 Genomes European population-specific dataset and the linkage disequilibrium clumping was performed on all the variants present in the sample group. The p-value threshold for GWA variants included in the calculations was 1.0×10^{-5} .

Biochemistry assays and calculation of fibrosis scores. Peripheral blood samples were collected from mice and the recruited subjects. All human samples were taken in fasting condition using appropriate serum and EDTA tubes (Vacutainer® , BD). Serum samples were allowed to coagulate for 15 min after collection, and centrifuged at 500 x g for 10 min. Plasma samples were kept at 4°C/on ice for 15 minutes, and centrifuged for 10 min at 3,000 x g. The biochemical parameters were assayed using an Atellica automated analyzer (Siemens Healthineers, Tarrytown, NY, USA). The intra-assay and interassay coefficient of variation were lower than 6% and 8%, respectively, in all cases. All the parameters were measured according to the reagent manufacturer instructions at the Core Laboratory of the Biomedical Diagnostic Centre of the Hospital Clinic of Barcelona. In these samples, aspartate aminotransferase (AST) alanine transaminase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), albumin, glucose, procollagen type, III N-terminal peptide (PIIINP), hyaluronic acid (HA), tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1), and insulin were measured. We calculated several fibrosis scores using published formulas based on clinical, anthropometric, and laboratory results. The AST to Platelet Ratio Index (APRI) includes AST, and platelet count. The NAFLD fibrosis score (NAFLD-FS) includes age, body mass index, presence of impaired glucose intolerance or diabetes, AST, ALT, platelet count, and albumin. The Fibrosis-4 (FIB-4) includes age, AST, ALT, and platelet count. The Hepamet fibrosis scores (HFS)

includes gender, age, presence of type 2 diabetes, glucose, insulin, HOMA (calculated according to the equation $HOMA = \text{fasting insulin} \times \text{glucose} / 405$), AST, albumin, and platelet count. The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score includes procollagen type III N-terminal peptide (PIIINP), hyaluronic acid (HA), and tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1). We calculated these fibrosis scores using the specific formulas for each algorithm according to the following references: APRI,⁸ NAFLD-FS,⁹ FIB-4,¹⁰ the HFS,¹¹ and ELF.¹²

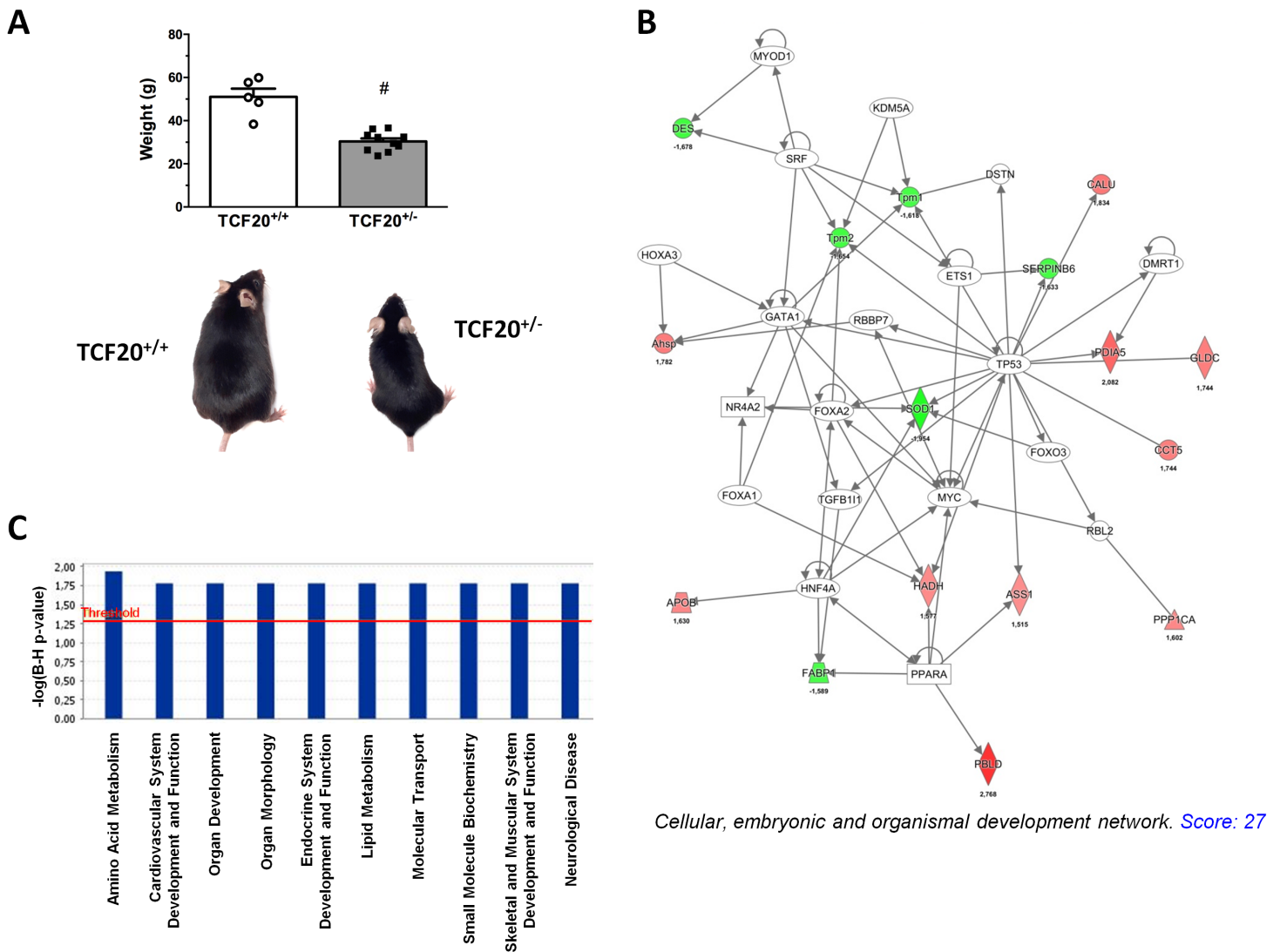
2. Additional Results

Effect of TCF20 deficiency in lipid metabolism and body weight. To confirm whether the hepatic loss of Tcf20 may affect lipid metabolism and mitochondrial activity, we designed further validation experiments. We first characterized the lipidomic profile of livers from wild-type and *Tcf20*^{-/-} embryos by GC-MS. As shown in Supplemental Figure 2A, the hepatic levels of triglycerides, phosphatidylcholine, cholesterol esters, and phosphatidylethanolamine in the *Tcf20*^{-/-} embryos did not differ significantly from wild-type mice, despite the proteomic changes that we observed in the expression of genes associated with the β -oxidation metabolic pathway, such as the short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase (ACADS) and the hydroxy acyl-coenzyme A dehydrogenase (HCDH) enzymes (see Supplementary Data 1). This differential gene regulation is opposite and may compensate for each other resulting in the lack of any net effect on lipid metabolism.

In agreement and to discard the involvement of impaired lipid metabolism in Tcf20-reduced body weight, we daily monitored food intake and body weight was measured weekly for five weeks. *Tcf20*^{+/-} mice showed a small but significant reduction in food intake over the observed period (Supplemental Fig. 2B). Since TCF20 is expressed in the hypothalamus in mice and humans (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000100207-TCF20/tissue>),¹³ one can speculate that this transcriptional activator may be involved in hypothalamic appetite regulation, resulting in the decline in food intake and the consequent impact on the body weight on the *Tcf20*^{+/-} mice.

Association of independent genomic risk variants for liver disease in the context of TCF20 deficiency in patients. To determine whether the association of TCF20 with elevated fibrosis scores is independent of concurrent genomic risk variants for liver disease, we genotyped all individuals included in the study for four well-characterized SNPs: rs1260326, rs738409, rs58542926, and rs641738. These SNPs are known risk variants for non-alcoholic fatty liver disease, hepatic fibrosis, and hepatocellular carcinoma in the presence of environmental factors.^{14,15} Additionally, we evaluated the polygenic risk score for liver fibrosis associated with these SNPs as described in the Supplementary Material and Methods Section. As shown in Table 1, we found no significant differences in the polygenic risk score for liver fibrosis between groups (0.113 ± 0.002 vs. 0.009 ± 0.002 ; $p=0.518$). Therefore, we discarded the contribution of these genomic risk variants to the overall hepatic phenotype observed in subjects with pathogenic variants of *TCF20*.

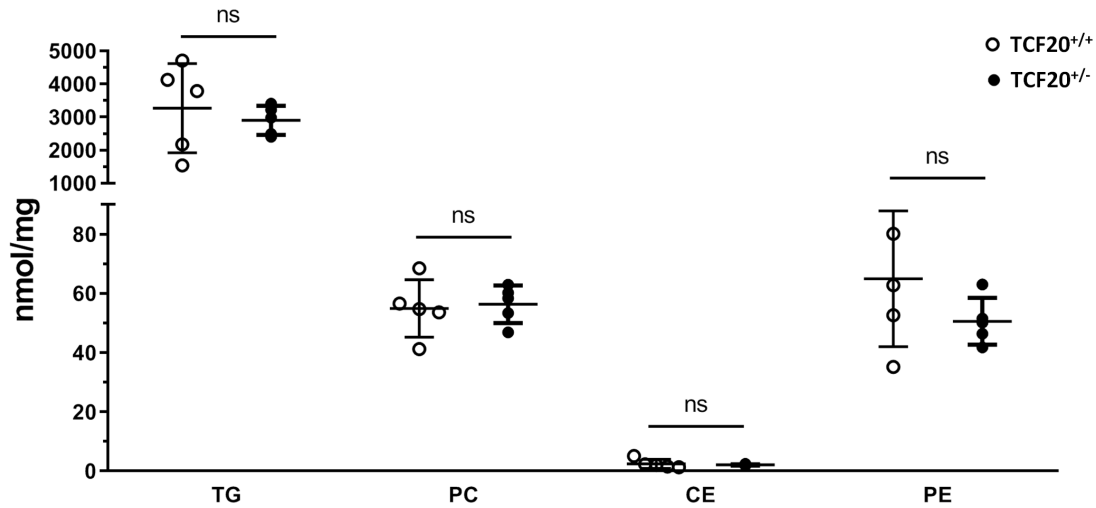
3. Additional Figures and Legends



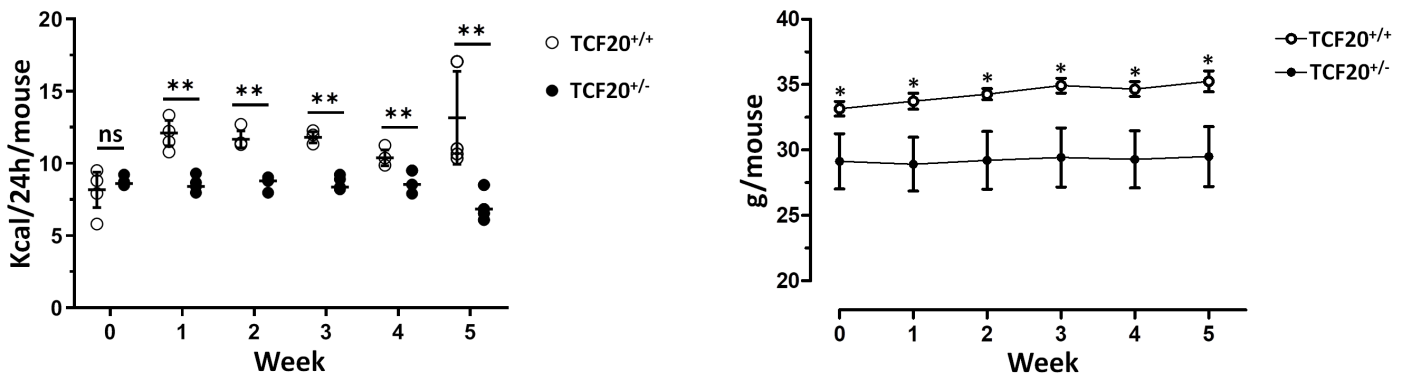
Supplemental Figure 1. The lack of *Tcf20* impairs metabolism in adult and embryo mice. **A.** Representative images and weights of *Tcf20*^{+/+} and *Tcf20*^{+/-} adult mice (mean±SEM; n=5 for *Tcf20*^{+/+} group and n=10 for *Tcf20*^{+/-} group; #*p*<0.0001, versus *Tcf20*^{+/+} genotype). **B.** Networks of pathways obtained from the proteogenomic analysis of wild-type and *Tcf20* knock-out embryo livers were algorithmically generated based on their connectivity. The Network showed is associated with the functional category of Cellular, embryonic, and

organismal development. In this network, the proteins are represented as nodes, and the biological relationship between two nodes is represented as an edge (line). A colored node indicates a protein that was detected by the proteogenomic screening (red: overexpressed and green: reduced expression in *Tcf20*^{-/-} mice embryos). Nodes are displayed using various shapes that represent the functional class of the proteins. **C.** Proteomic analysis of *Tcf20*^{+/+} and *Tcf20*^{-/-} E17.5 mice embryo liver samples (n=4, for each experimental condition) revealed a differential expression of enzymes that participate in different metabolic processes, most of them related to aminoacid metabolism, lipid metabolism and neurological disease. The comparison of diseases and biological functions affected by the knockout of Tcf20 activity in the embryo livers were modeled using the Ingenuity Pathways Knowledge Base (IPA). The results obtained were compared with global molecular networks using the Fisher's Exact Test. The resulting P-values were adjusted for multiple comparisons using the Benjamini and Hochberg's method to control the false discovery rate. After multi-test adjustment, differences were considered as significant at a P value less than 0.05. The red line across the graph indicates the point where the significance value equals 0.05.

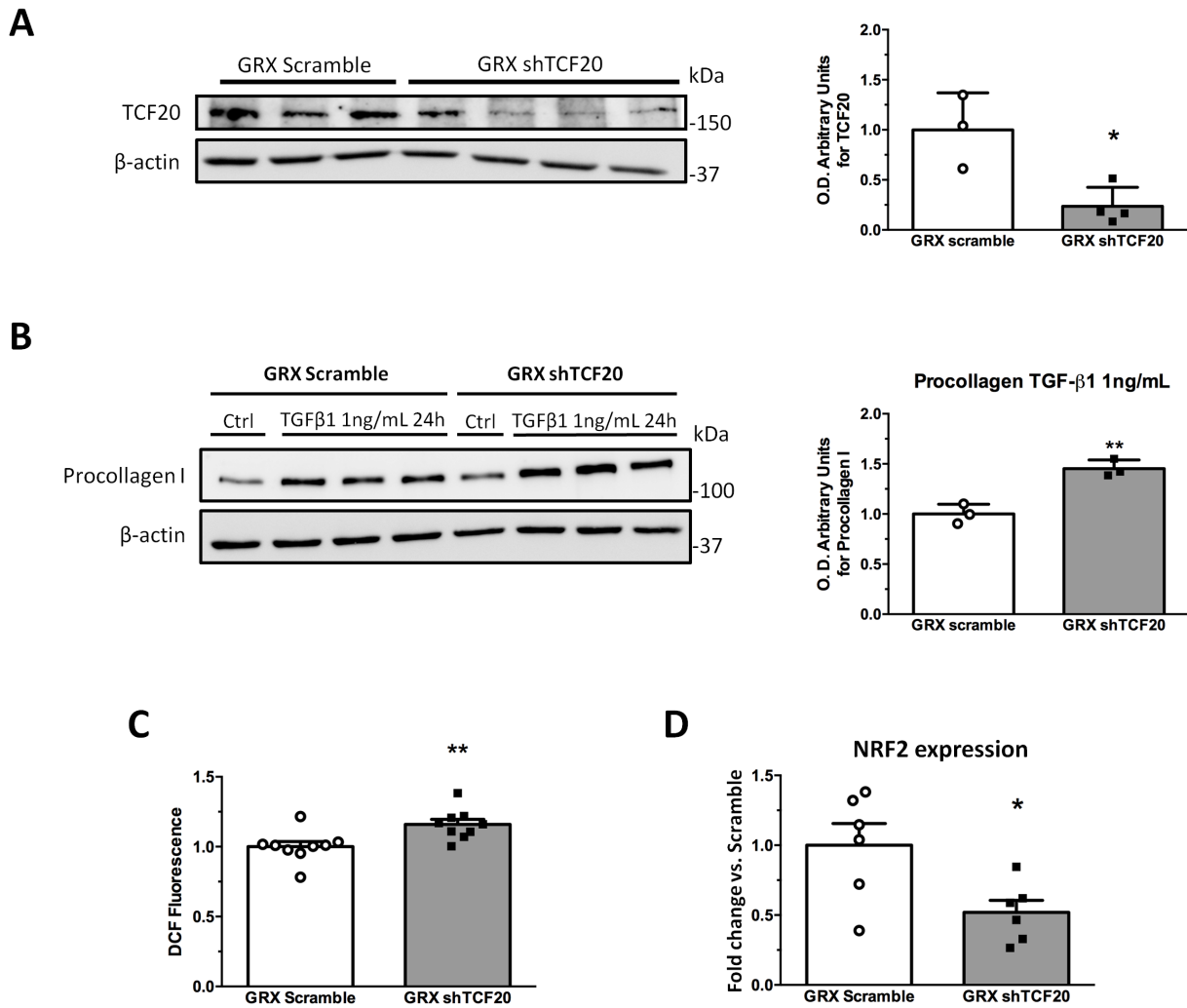
A



B



Supplemental Figure 2. A. Characterization of the hepatic lipidome of wild-type and *Tcf20* deficient mice. The hepatic content of triglycerides, phosphatidylcholine, cholesterol ester, and phosphatidylethanolamine in liver tissue from both groups was quantified by GC-MS, following the methodology described in the Material and Methods section. The results, shown as mean \pm SEM, indicate that there were no statistically significant differences in the levels of these lipid groups between the livers of wild-type and *Tcf20*^{-/-} embryos mice (n=5 for each experimental condition). **B.** Weekly average data for food intake (Kcal in 24 h per mouse) and body weight (grams per mouse) (n=13 for each genotype; mean \pm SEM; **p*<0.05, ***p*<0.01 compared to wild-type mice).



Supplemental Figure 3. *Tcf20* silencing in GRX.

A. Western blot for *Tcf20* abundance from GRX scramble cells and *Tcf20* silenced GRX cells (GRX sh*Tcf20*). β -actin was used as loading control (mean \pm SEM; n=3 for GRX scramble and n=4 for GRX sh*Tcf20*; * p <0.05 compared to scramble GRX cells used as control in the same experimental conditions). O.D.: optical density. In GRX sh*Tcf20* cells, we achieved a decrease of 76.37 \pm 9.5 % in *Tcf20* expression. **B.** Western blot for collagen precursor α 1 (Col1a1) abundance from GRX scramble cells and *Tcf20* silenced GRX cells (GRX sh*Tcf20*) after 24h of TGF β 1 incubation. One sample from

each cell line without TGF β 1 incubation was used as a control. β -actin was used as loading control (mean \pm SEM; n=3; ** p <0.01 compared to scramble GRX cells used as control in the same experimental conditions). O.D.: optical density.

C. Reactive oxygen species levels measured by intensity of fluorescence from 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF). (mean \pm SEM; n=6; ** p <0.01 compared to scramble GRX cells used as control in the same experimental conditions). **D.** *Nrf2* expression in GRX Scramble and in GRX sh*Tcf20* (mean \pm SEM; n=6 for each group; * p <0.05, compared to scramble GRX cells used as control in the same experimental conditions).

4. Supplementary Tables

Supplementary Table 1 . Specific primers for cDNA amplification.

Gene	Species	Forward sequence	Reverse sequence
NRF2	Mouse	3'- TCCTATGCGTGAATCCCAAT -5'	3'- GCGGCTTGAATGTTTGTCTT -5'
HPRT	Mouse	3'-GCCTAAGATGAGCGCAAGTTG-5'	3'-TACTAGGCAGATGGCCACAGG-5'
TIMP1	Mouse	3'-TCTTGTTCCCTGGCGTACTCT-5'	3'-GTGAGTGTCACTCTCCAGTTTGC-5'
TIMP2	Mouse	3'-AGCCAAAGCAGTGAGCGAGAAG-5'	3'-GCCGTGTAGATAAACTCGATGTC-5'
MMP1	Mouse	3'-AGGAAGGCGATATTGTGCTCTCC-5'	3'-TGGCTGGAAAGTGTGAGCAAGC-5'
MMP2	Mouse	3'-AGCCAAAGCAGTGAGCGAGAAG-5'	3'-GCCGTGTAGATAAACTCGATGTC-5'
MMP3	Mouse	3'-CTCTGGAACCTGAGACATCACC-5'	3'-AGGAGTCCTGAGAGATTTGCGC-5'
MMP8	Mouse	3'-GATGCTACTACCACACTCCGTG-5'	3'-TAAGCAGCCTGAAGACCGTTGG-5'
MMP9	Mouse	3'-GCTGACTACGATAAGGACGGCA-5'	3'-TAGTGGTGCAGGCAGAGTAGGA-5'
MMP12	Mouse	3'-CACACTTCCCAGGAATCAAGCC-5'	3'-TTTGGTGACACGACGGAACAGG-5'

Supplementary Table 2. Experimental and commercial details of the antibodies used in the study.

Name	Supplier	Dilution
Anti-SPBP	Abcam (ab112089)	1:1000
Anti-COL1A1	Abcam (ab34710)	1:1000
Anti- β -actin HRP conjugate	Cell Signaling (#4970)	1:1000
Donkey ECL-anti-rabbit peroxidase conjugated	GE Healthcare (NA934V)	1:5000
Anti-nestin	Developmental Studies Hybridoma Bank, Clon rat-401	5 μ g/mL
Anti- β -III-Tubulin	BioLegend (TUBB3)	0.5 μ g/mL
Goat anti-mouse Alexa 488	Thermo Fisher A11001	1:250
Goat anti-rabbit Alexa 568	Thermo Fisher A11011	1:250
Goat anti-rabbit Alexa 488	Thermo Fisher A11008	1:500

Accession Number	Description	Mean TCF20 KO	Mean TCF20 WT	Fold Change TCF20 KO/TCF20 WT
GT251_MOUSE	Procollagen galactosyltransferase 1 OS=Mus musculus GN=Colgal1 PE=1 SV=2	217199,931	162272,1952	1,34
UBP14_MOUSE	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 OS=Mus musculus GN=Usp14 PE=1 SV=3	320811,3463	189157,6314	1,70
EF1G_MOUSE	Elongation factor 1-gamma OS=Mus musculus GN=Eef1g PE=1 SV=3	2741612,453	1704533,85	1,61
DPP3_MOUSE	Dipeptidyl peptidase 3 OS=Mus musculus GN=Dpp3 PE=1 SV=2	354817,0876	129177,8238	2,75
PP1A_MOUSE	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit OS=Mus musculus GN=Ppp1ca PE=1 SV=1	728233,2066	454482,6689	1,60
SAC1_MOUSE	Phosphatidylinositol phosphatase SAC1 OS=Mus musculus GN=Sacm1 PE=1 SV=1	165839,8931	114846,6496	1,44
SYK_MOUSE	Lysine-tRNA ligase OS=Mus musculus GN=Kars PE=1 SV=1	352919,892	252573,5089	1,40
AMPL_MOUSE	Cytosol aminopeptidase OS=Mus musculus GN=Lap3 PE=1 SV=3	1140795,453	836872,4666	1,36
DLDH_MOUSE	Dihydropyridol dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dld PE=1 SV=2	544519,8862	407695,4957	1,34
AHSP_MOUSE	Alpha-hemoglobin-stabilizing protein OS=Mus musculus GN=Ahspp PE=1 SV=1	589514,6858	330781,1183	1,78
SCLY_MOUSE	Selenocysteine lyase OS=Mus musculus GN=Scl PE=1 SV=1	477062,3134	171481,0754	2,78
DNPEP_MOUSE	Aspartyl aminopeptidase OS=Mus musculus GN=DNpep PE=1 SV=2	635019,8424	381874,7106	1,66
KLH41_MOUSE	Kelch-like protein 41 OS=Mus musculus GN=Klh41 PE=1 SV=1	39208,70966	25989,17884	1,51
LARP1_MOUSE	La-related protein 1 OS=Mus musculus GN=Larp1 PE=1 SV=3	109272,4081	83029,76915	1,32
BLMH_MOUSE	Bleomycin hydrolase OS=Mus musculus GN=Blmh PE=1 SV=1	707068,5152	424021,1512	1,67
ASNS_MOUSE	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] OS=Mus musculus GN=Asns PE=1 SV=3	1054993,828	757453,2092	1,39
EIF3_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 1 OS=Mus musculus GN=EIF3 PE=1 SV=1	495461,951	409708,5763	1,21
PSD13_MOUSE	265 proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 OS=Mus musculus GN=Psm13 PE=1 SV=1	307563,9085	337267,0786	0,91
PIGS_MOUSE	GPI transamidase component PIG-5 OS=Mus musculus GN=Pigs PE=1 SV=3	90808,99665	57234,0899	1,59
ABCE1_MOUSE	ATP-binding cassette sub-family E member 1 OS=Mus musculus GN=Abce1 PE=1 SV=1	201602,3836	129919,516	1,55
ATPD_MOUSE	ATP synthase subunit delta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atpd PE=1 SV=1	304917,9687	467698,0067	0,65
1433F_MOUSE	14-3-3 protein eta OS=Mus musculus GN=Ywhah PE=1 SV=2	608984,7468	911322,979	0,67
DESM_MOUSE	Desmin OS=Mus musculus GN=Des PE=1 SV=3	347920,3518	583937,0277	0,60
ANXA5_MOUSE	Annexin A5 OS=Mus musculus GN=Anxa5 PE=1 SV=1	1560381,652	801100,5908	1,95
PDL1_MOUSE	PDZ and LIM domain protein 5 OS=Mus musculus GN=Pdlim5 PE=1 SV=4	65507,0225	84042,2044	0,78
PDIAS_MOUSE	Protein disulfide-isomerase A5 OS=Mus musculus GN=Pdias PE=1 SV=1	1257877,458	60420,2559	2,08
QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Uqcrc1 PE=1 SV=2	394357,6622	500592,7399	0,79
VATA_MOUSE	V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Mus musculus GN=Vatp6v1a PE=1 SV=2	165139,1188	206000,5932	0,80
SYLC_MOUSE	Leucine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Lars PE=1 SV=2	244397,8879	150829,6116	1,62
MCM7_MOUSE	DNA replication licensing factor MCM7 OS=Mus musculus GN=Mcm7 PE=1 SV=1	549664,7086	356124,0356	1,54
HPRT_MOUSE	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase OS=Mus musculus GN=Hprt1 PE=1 SV=3	506655,6703	388793,1067	1,30
TPM1_MOUSE	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Mus musculus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	577775,005	935103,6983	0,62
US51_MOUSE	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component OS=Mus musculus GN=U5t22 PE=1 SV=1	365393,9068	241134,4691	1,52
RL22L_MOUSE	60S ribosomal protein L22-like 1 OS=Mus musculus GN=Rpl22l1 PE=1 SV=1	497735,074	228968,1196	2,17
NDKB_MOUSE	Nucleoside diphosphate kinase B OS=Mus musculus GN=Nme2 PE=1 SV=1	3130592,333	2460116,064	1,27
HS90A_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Mus musculus GN=Hsp90aa1 PE=1 SV=4	301132,611	236297,868	1,27
ASPH_MOUSE	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase OS=Mus musculus GN=Asph PE=1 SV=1	290736,3129	197131,3061	1,47
3HAO_MOUSE	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase OS=Mus musculus GN=Haoa PE=1 SV=1	584166,8448	324373,9791	1,80
DHB2_MOUSE	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 2 OS=Mus musculus GN=Hsd17b2 PE=1 SV=2	267049,4425	367369,9053	0,73
SYIC_MOUSE	Isoleucine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Iars PE=1 SV=2	385014,061	329745,914	1,17
NCLN_MOUSE	Nocalin OS=Mus musculus GN=Ncln PE=1 SV=2	134139,8829	94322,15178	1,42
DIAP1_MOUSE	Protein diaphanous homolog 1 OS=Mus musculus GN=Diaph1 PE=1 SV=1	76246,2884	55211,83158	1,38
DEOC_MOUSE	Deoxyribose-phosphate aldolase OS=Mus musculus GN=Dera PE=1 SV=1	215850,8547	163907,3313	1,32
CALU_MOUSE	Calumenin OS=Mus musculus GN=Calu PE=1 SV=1	734001,907	400170,4823	1,83
PSB5_MOUSE	Proteasome subunit beta type-5 OS=Mus musculus GN=Psb5 PE=1 SV=3	199319,6414	274316,0334	0,73
HOGA1_MOUSE	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hoga1 PE=1 SV=1	810839,814	386278,5554	2,10
TPM2_MOUSE	Tropomyosin beta chain OS=Mus musculus GN=Tpm2 PE=1 SV=1	378155,6555	625341,0693	0,60
SPB6_MOUSE	Serpin B6 OS=Mus musculus GN=Serpnb6 PE=1 SV=1	103394,0643	168836,3858	0,61
HBE_MOUSE	Hemoglobin subunit epsilon-Y2 OS=Mus musculus GN=Hbb-y PE=1 SV=2	27565440,79	20906341,42	1,32
ACAD5_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acad5 PE=1 SV=2	131969,747	175448,3762	0,75
CAZ2_MOUSE	F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Mus musculus GN=Capza2 PE=1 SV=3	361529,7702	305793,9677	1,18
PR56A_MOUSE	26S protease regulatory subunit 6A OS=Mus musculus GN=Psmc3 PE=1 SV=2	328550,7673	239252,7485	1,37
ATP6_MOUSE	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp6c1 PE=1 SV=1	1424891,498	1898371,744	0,75
EBP_MOUSE	3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase OS=Mus musculus GN=Ebp PE=1 SV=3	341206,9695	470165,0011	0,73
UBP5_MOUSE	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 OS=Mus musculus GN=Usp5 PE=1 SV=1	286071,6029	224218,4394	1,28
IDHC_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Idh1 PE=1 SV=2	1169979,958	840727,323	1,39
ASSY_MOUSE	Argininosuccinate synthase OS=Mus musculus GN=Ass1 PE=1 SV=1	11499308,63	7589804,448	1,52
C17M_MOUSE	Monofunctional C1-tetrahydrofolate dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mthfd1l1 PE=1 SV=2	269721,0229	189759,509	1,36
HEM3_MOUSE	Porphobilinogen deaminase OS=Mus musculus GN=Hmbs PE=1 SV=2	1308511,266	854045,4861	1,53
TCPE_MOUSE	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Mus musculus GN=Cct5 PE=1 SV=1	589750,5408	338076,6131	1,74
COX1_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cox4i1 PE=1 SV=2	505357,2833	609610,1367	0,83
EIF3M_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Mus musculus GN=EIF3m PE=1 SV=1	601019,7409	451979,8681	1,33
FERM2_MOUSE	Fermitin family homolog 2 OS=Mus musculus GN=Ferm2 PE=1 SV=1	341388,4442	259617,2026	1,31
GCSF_MOUSE	Glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial OS=Mus musculus GN=Gldc PE=1 SV=1	441334,306	253096,5695	1,74
EIF3K_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K OS=Mus musculus GN=EIF3k PE=1 SV=1	298182,5473	235872,2054	1,26
M2GD_MOUSE	Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dmgdh PE=1 SV=1	766182,2365	497558,7659	1,54
RS14_MOUSE	40S ribosomal protein S14 OS=Mus musculus GN=Rps14 PE=1 SV=3	407699,9813	594694,937	0,69
HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Mus musculus GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=3	8245457,787	6341243,125	1,30
TCPD_MOUSE	T-complex protein 1 subunit delta OS=Mus musculus GN=Cct4 PE=1 SV=3	1821060,216	1475205,378	1,23
SODC_MOUSE	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Mus musculus GN=Sod1 PE=1 SV=2	499101,456	975375,1131	0,51
SYC_MOUSE	Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Yars PE=1 SV=3	364079,6151	313426,1658	1,16
ARF4_MOUSE	ADP-ribosylation factor 4 OS=Mus musculus GN=Arf4 PE=1 SV=2	918847,852	654598,4001	1,40
PDI41_MOUSE	Protein disulfide-isomerase OS=Mus musculus GN=P4hb PE=1 SV=2	12699872,92	8746869,692	1,45
HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hadh PE=1 SV=2	3313774,298	2100899,011	1,58
PYR1_MOUSE	CAD protein OS=Mus musculus GN=Cad PE=1 SV=1	274772,1793	211073,1077	1,30
SEPT7_MOUSE	Septin-7 OS=Mus musculus GN=Sept7 PE=1 SV=1	562214,5458	375850,5163	1,50
RDH11_MOUSE	Retinol dehydrogenase 11 OS=Mus musculus GN=Rdh11 PE=1 SV=2	377687,353	279091,9915	1,35
APOB_MOUSE	Apolipoprotein B-100 OS=Mus musculus GN=ApoB PE=1 SV=1	376502,7187	231031,911	1,63
NSUN2_MOUSE	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase OS=Mus musculus GN=Nsun2 PE=1 SV=2	239454,5892	201515,1049	1,19
RS10_MOUSE	40S ribosomal protein S10 OS=Mus musculus GN=Rps10 PE=1 SV=1	2129072,32	1655884,542	1,29
VM5A_MOUSE	von Willebrand factor A domain-containing protein 5A OS=Mus musculus GN=Vwa5a PE=1 SV=2	266818,2773	201508,9975	1,32
HMCS1_MOUSE	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Hmgcs1 PE=1 SV=1	862642,7129	1028609,628	0,84
PBLD1_MOUSE	Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Pblid1 PE=1 SV=2	253807,9824	91678,34256	2,77
MLRS_MOUSE	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform OS=Mus musculus GN=Myrlf PE=1 SV=3	342404,8426	305011,1795	1,12
FABPL_MOUSE	Fatty acid-binding protein, liver OS=Mus musculus GN=Fabp1 PE=1 SV=2	1002132,891	1592713,995	0,63
AT1A1_MOUSE	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=Atp1a1 PE=1 SV=1	517323,4871	674033,0451	0,77
MOGS_MOUSE	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase OS=Mus musculus GN=Mogs PE=1 SV=1	267388,4302	218635,419	1,22
EF2_MOUSE	Elongation factor 2 OS=Mus musculus GN=Eef2 PE=1 SV=2	7223711,59	5614413,367	1,29
EHD1_MOUSE	EH domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Ehd1 PE=1 SV=1	356353,1566	301013,9237	1,18
LONM_MOUSE	Lon protease homolog, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Lonp1 PE=1 SV=2	906231,0333	621560,222	1,46

5. Additional References

1. Durkin ME, Qian X, Popescu NC, Lowy DR. Isolation of Mouse Embryo Fibroblasts. *Bio Protoc.* 2013;3.
2. Schröder SK, Schüler HM, Petersen K V., et al. Genetic and Molecular Characterization of the Immortalized Murine Hepatic Stellate Cell Line GRX. *Cells* 2022, Vol 11, Page 1504. 2022;11:1504.
3. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009;6:359–362.
4. Page ML, Vance EL, Cloward ME, et al. The Polygenic Risk Score Knowledge Base offers a centralized online repository for calculating and contextualizing polygenic risk scores. *Communications Biology* 2022 5:1. 2022;5:1–15.
5. Namjou B, Lingren T, Huang Y, et al. GWAS and enrichment analyses of non-alcoholic fatty liver disease identify new trait-associated genes and pathways across eMERGE Network. *BMC Med.* 2019;17:1–19.
6. Parisinos CA, Wilman HR, Thomas EL, et al. Genome-wide and Mendelian randomisation studies of liver MRI yield insights into the pathogenesis of steatohepatitis. *J Hepatol.* 2020;73:241–251.
7. Liu Z, Chalasani N, Lin J, et al. Integrative omics analysis identifies macrophage migration inhibitory factor signaling pathways underlying human hepatic fibrogenesis and fibrosis. *J BioX Res.* 2019;2:16–24.
8. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2003;38:518–526.
9. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology.* 2007;45:846–854.

10. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43:1317–1325.
11. Ampuero J, Pais R, Aller R, et al. Development and Validation of Hepamet Fibrosis Scoring System-A Simple, Noninvasive Test to Identify Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease With Advanced Fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18:216-225.e5.
12. Vali Y, Lee J, Boursier J, et al. Enhanced liver fibrosis test for the non-invasive diagnosis of fibrosis in patients with NAFLD: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2020;73:252–262.
13. Gray PA, Fu H, Luo P, et al. Mouse brain organization revealed through direct genome-scale TF expression analysis. *Science (1979)*. 2004;306:2255–2257.
14. Romeo S, Sanyal A, Valenti L. Leveraging Human Genetics to Identify Potential New Treatments for Fatty Liver Disease. *Cell Metab*. 2020;31:35–45.
15. Bianco C, Jamialahmadi O, Pelusi S, et al. Non-invasive stratification of hepatocellular carcinoma risk in non-alcoholic fatty liver using polygenic risk scores. *J Hepatol*. 2021;74:775–782.

DISCUSSIÓ

1. Discussió

En aquesta tesi hem volgut investigar noves estratègies per avançar en el tractament de la lesió hepàtica i la malaltia crònica hepàtica estudiant, per una banda, l'efecte de les nanopartícules d'òxid de ceri en la regeneració del fetge com a forma d'optimitzar tractaments per a la recuperació després d'una lesió hepàtica, i per l'altra, la funció del factor de transcripció TCF20 en el fetge.

Sobre les nanopartícules d'òxid de ceri, el nostre grup ja havia descrit anteriorment propietats hepatoprotectores de les CeO₂NPs contra la progressió de la fibrosi (168) i el carcinoma hepatocel·lular (169) en models experimentals en animals. A més, altres investigacions, incloses les del propi grup, també han definit efectes beneficiosos d'aquestes nanopartícules contra el dany hepàtic produït per l'estrès oxidatiu (170,171). Per tant, tenint en compte aquestes funcions protectores, investigar l'efecte de les CeO₂NPs en la regeneració hepàtica pot aportar informació addicional a l'utilitat terapèutica d'aquestes nanopartícules tal i com ha estat un dels objectius d'aquesta tesi doctoral.

Està descrit a la literatura que un excés d'estrès oxidatiu inhibeix la correcta regeneració del fetge després d'una PHx o un DILI. Per exemple, la deficiència de Nrf2 (un regulador cel·lular de la resposta antioxidant) i de UCP2 (una proteïna de la cadena de transport d'electrons) impliquen una regeneració hepàtica deficient en ratolins després d'una PHx (172). A més, el dany oxidatiu en els mitocondris i en l'ADN està associat a una mala regeneració hepàtica després d'una sobredosi d'APAP (173).

Una de les estratègies estudiades per reduir l'estrès oxidatiu en el context de la regeneració hepàtica en models animals és, per exemple, l'ús de thymoquinona que ha demostrat tenir un efecte protector en el fetge de les rates contra el dany causat per isquèmia-reperfusió (174) i mitiga el dany hepàtic en ratolins amb PHx gràcies a la

reducció de diferents factors com l'estrès oxidatiu, el dany mitocondrial, l'estrès del reticle endoplasmàtic i l'apoptosis (175). Una altra estratègia consisteix en l'administració de GSH o resveratrol que disminueixen l'estrès oxidatiu i protegeixen el fetge contra el dany induït per APAP (176,177). També, mitjançant la inhibició farmacològica de la via JNK, responsable d'incrementar la producció de ROS durant la toxicitat causada per sobredosi d'APAP, s'aconsegueix mitigar el dany hepàtic (178). Aquesta reducció de ROS per controlar o minimitzar el dany hepàtic també pot ser induïda per altres productes aprovats per ús clínic com el blau de metilè (30) o la metmorfina (179).

El nostre estudi té limitacions en quant a la toxicitat induïda per APAP en el model animal emprat ja que s'ha demostrat que les rates són més resistents al dany per APAP que els ratolins (180). Tot i això, la presència d'estrès oxidatiu degut a la intoxicació per APAP en rates s'ha demostrat independentment de la severitat de la intoxicació (181–183). Per tant aquest model animal és vàlid per comprovar l'efecte antioxidant de les CeO₂NPs en la regeneració hepàtica en rates.

Respecte el metabolisme de l'APAP en el fetge de les rates, els nostres resultats indiquen que els nivells de transaminases s'incrementen al cap de dos dies de la sobredosi tant en el grup tractat amb vehicle com amb el tractat amb nanopartícules, confirmant la toxicitat induïda per aquest fàrmac. També hem demostrat que el pretractament amb nanopartícules no modifica el metabolisme de l'APAP al fetge. De totes maneres, per donar més suport a aquesta conclusió, la identificació d'un metabòlit intermig de l'APAP com la N-acetil-p-benzoquinona imina (34) seria una bona opció per confirmar el mecanisme d'acció proposat.

La via NFκB té un rol molt important en la homeòstasis hepàtica i la regeneració del fetge tal i com demostren diversos estudis com per exemple el de *Beg A et al.* (184) on ratolins deficientes per NFκB(p65) presenten letalitat embrionària i apoptosi en hepatòcits. En l'estudi del grup de *limur Y et al.* (185) s'observa com l'administració de diferents formes

de I κ B (inhibidor de NF κ B) en el fetge de rates s'associa a una regeneració hepàtica disfuncional després d'una PHx i a Maeda *S et al.* (186) on van veure que la inactivació de NF κ B en cèl·lules de Kupffer i hepatòcits també afecta negativament al procés de regeneració hepàtica. Tenint en compte aquestes observacions, en aquesta tesi hem investigat si un dels mecanismes involucrats en l'efecte beneficiós de les CeO₂NPs en el context de la regeneració hepàtica és la modificació de membres de la via NF κ B.

En el nostre estudi hem demostrat que la presència de CeO₂NPs al fetge s'associa a l'activació de NF κ B tant *in vitro* com *in vivo*. Tot i que els nostres resultats no aprofundeixen en el mecanisme d'activació de NF κ B i els efectes positius de les nanopartícules en la regeneració hepàtica, sí que estan en la mateixa línia que els estudis mencionats anteriorment.

De fet, varis estudis han descrit que l'estrès oxidatiu pot inhibir la via NF κ B per diferents mecanismes, incloent la interacció directa amb NF κ B o de manera indirecta mitjançant la inactivació de la I κ B-quinasa (IKK), un repressor de I κ B (187). Quan IKK està inactivada, I κ B inhibeix NF κ B. Els nostres resultats demostren com el tractament amb nanopartícules està associat a una reducció dels nivells de I κ B tant *in vitro* com *in vivo* que es tradueix en l'activació de NF κ B. Per tant, una hipòtesi plausible seria que les nanopartícules, gràcies a les seves propietats antioxidants, fossin les responsables de l'activació de NF κ B ja que en absència d'estrès oxidatiu, IKK fosforilaria a I κ B, la qual seria ubiquitinada i degradada pel proteasoma, permetent així un increment de la proliferació cel·lular mitjançant la via de NF κ B. També s'ha de tenir en compte que els resultats obtinguts i el mecanisme proposat discrepen amb altres estudis on es mostra com les CeO₂NPs inhibeixen NF κ B en el context de la sepsis (188–190), però existeixen diferents raons que podrien explicar aquesta discrepància. Possibles diferències en l'estabilitat de les nanopartícules utilitzades podrien ser una de les causes d'aquests resultats diferents ja que l'estabilitat és un punt clau per l'ús de les nanopartícules en medicina (163). Per altra banda, la dosi utilitzada també és una variable a tenir en compte ja que en aquests estudis previs s'han administrat dosis superiors (entre

0.5mg/kg i 3.5mg/kg) a la utilitzada per nosaltres. En el nostre cas, en els estudis previs per establir la dosi òptima (0.1mg/kg) (168), vam veure com a dosis més altes l'efecte antioxidant disminuïa i per tant d'aquí es podria inferir que també tindria un efecte diferent en l'activació de la via NFκB. Una manera d'estudiar-ho seria mitjançant una bateria de proves a diferents concentracions de nanopartícules i comprovar l'activació de la via NFκB.

Les dues principals condicions que afecten la funcionalitat hepàtica davant d'un dany agut o crònic són la capacitat regenerativa del fetge i els processos fibrogènics. En el primer estudi hem abordat estratègies terapèutiques per incrementar la regeneració hepàtica mentre que en el segon estudi hem avaluat potencials dianes que participen en els processos fibrogènics.

En l'estudi de TCF20, hem desenvolupat un model animal murí amb deficiència pel gen *Tcf20* mitjançant recombinació homòloga. La gestió de les colònies d'aquest model animal ens va permetre reportar al 2019 l'associació de la manca d'aquest factor de transcripció en ratolins amb la mortalitat de cries recent nascudes (191), la qual cosa ens va portar a continuar la nostra investigació utilitzant animals adults heterozigots i embrions homozigots per aquesta deficiència genètica.

Aquesta connexió entre la manca de TCF20 i la mortalitat en ratolins nounats també ha estat descrita en els estudis recentment publicats de *Feng et al.* (81) i *Zhou et al.* (80) on han treballat amb models animals amb deficiència de TCF20 obtinguts per mitjà d'altres tecnologies d'edició del genoma com CRISPR/Cas9. Els resultats de Feng i Zhou demostren que *Tcf20* és essencial per a la neurogènesi durant el desenvolupament embrionari del cervell en ratolins, tot alineant-se amb la literatura existent sobre TCF20 que relaciona variants patològiques d'aquest gen en humans amb trastorns neurològics com el trastorn de l'espectre autista (TEA), la discapacitat intel·lectual (DI) i el retard del desenvolupament neurològic (RDN) (74–79). En la nostra investigació, hem observat un deteriorament del neurodesenvolupament cerebral que es troba en línia amb les

investigacions existents abans esmentades. Per fer-ho, hem utilitzat marcadors específics per diferenciar regions corticals cerebrals en embrions; nestina per a les cèl·lules progenitores neuronals a la zona ventricular i tubulina- β -III per a neurones diferenciades a la placa cortical.

En estudis anteriors del grup, havíem identificat Tcf20 com a diana d'Akt (26). Aquesta relació entre les dues proteïnes és interessant ja que, també en estudis anteriors del grup, havíem demostrat que Akt participa en l'hepatoprotecció i la regeneració hepàtica (28,39,40). Tenint en compte que a més Tcf20 actua com a regulador transcripcional de Sp1 i Ets (1,10,13), tots dos implicats en la síntesi de col·lagen, aquestes observacions ens han portat a estudiar el paper de Tcf20 en la fisiologia i patologia del fetge.

En el context fisiològic, l'anàlisi del proteoma hepàtic d'embrions murins amb genotip *Tcf20*^{-/-} en estadi E17.5 indica canvis en el metabolisme energètic dels mitocondris. La validació funcional dels resultats de proteòmica demostra que la deficiència de *Tcf20* està associada a un augment de la mida mitocondrial en els fetges dels embrions i a un augment de la taxa de consum d'oxigen cel·lular en cèl·lules MEFs aïllades d'embrions *Tcf20*^{-/-}, suggerint per tant una nova funció de Tcf20 relacionada amb el metabolisme mitocondrial.

Un altre aspecte que dona suport al paper de Tcf20 com a regulador del metabolisme és que els ratolins adults *Tcf20*^{+/-} no desenvolupen el sobrepès associat a l'envelliment com sí passa en els ratolins *Tcf20*^{+/+}. En el nostre estudi, els primers presentaven una mida i pes més reduïts en comparació amb el grup control, com també han reportat altres estudis amb models animals amb deficiència de *Tcf20* obtinguts mitjançant CRISPR/Cas9 (80,81). Aquest resultat, sumat a l'estudi de proteòmica que revela canvis en l'expressió d'enzims associats a la via metabòlica de la β -oxidació, com ara l'acil-CoA deshidrogenasa específica de cadena curta (ACADS) i l'hidroxi acil-coenzim A deshidrogenasa (HCDH) (veure dades proteòmica en el material suplementari de la publicació corresponent), feia pensar que també observariem un efecte en el

metabolisme de lípids. Tot i això, no es va trobar cap diferència en el contingut lipídic del fetge dels embrions de ratolins *Tcf20*^{-/-} al comparar-los amb el grup control. Segurament, aquest resultat és degut a que la regulació gènica diferencial observada és oposada i pot compensar-se mútuament, donant lloc a la manca d'efecte net sobre el metabolisme dels lípids.

L'estudi de l'obesitat relacionada amb l'edat es va realitzar amb una dieta *ad libitum* en comptes de la que s'utilitza habitualment per modelar l'obesitat i la resistència a la insulina que és alta en greixos. Per tant, el nostre disseny experimental és limitat per poder extreure conclusions sobre el paper protector de TCF20 en el desenvolupament de la síndrome metabòlica. Serien necessaris estudis addicionals per confirmar aquesta hipòtesi. Addicionalment, hem observat una menor ingesta d'aliments per part dels ratolins *Tcf20*^{+/-}. En aquest sentit és important destacar que *Tcf20* s'expressa a l'hipotàlem tant en ratolins com en humans (192) (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000100207-TCF20/tissue>), i per tant, es podria especular que aquest activador transcripcional podria estar implicat en la regulació de la gana hipotalàmica, donant lloc a la disminució de la gana i la ingesta d'aliments amb el consegüent impacte en el pes corporal dels ratolins *Tcf20*^{+/-}.

En el context patològic, hem pogut relacionar la deficiència de *Tcf20* en heterozigosi amb l'agreujament de la fibrosi hepàtica i el dany hepàtic després d'induir la fibrosi mitjançant l'administració de CCl₄. També hem demostrat que el mecanisme més probable que impulsa aquest efecte profibrogènic està relacionat amb la regulació positiva del gen del precursor del col·lagen tipus I, el gen *Col1a1*, en les cèl·lules estrellades hepàtiques quan el gen de *Tcf20* es troba silenciada. Aquest fet suggereix que TCF20 actua com a repressor transcripcional del precursor de col·lagen tipus I.

MMP3 és una metal·loproteïna que participa en la descomposició de diversos components de la matriu extracel·lular, com ara certs tipus de col·làgens, elastines, proteoglicans i laminines (193), a més, anteriorment ja s'havia descrit la interacció entre

TCF20 i MMP3 (194). A partir d'aquestes observacions, vam voler investigar si l'haploinsuficiència de *Tcf20* en ratolins afectava l'expressió de *Mmp3* i també vam decidir ampliar aquest estudi a altres membres de la família de les metaloproteïnases (MMPs) i dels inhibidors d'aquestes (TIMPs), tots implicats en la renovació de la ECM.

Com indiquen els nostres resultats, hem observat una expressió diferencial de certs gens de les famílies MMPs i TIMPs. Les diferències observades en l'expressió hepàtica de *Mmp3* en fetges deficients en *Tcf20* ja s'esperaven segons el que s'havia publicat en la literatura (194). De fet, s'ha descrit que MMP3 està involucrada en la invasió de la matriu extracel·lular per part de cèl·lules tumorals del fetge en l'hepatocarcinoma cel·lular (195) i nivells elevats d'aquesta metal·loproteïna s'han associat a fibrosi hepàtica avançada i colangitis biliar primària (196), suggerint que la presència d'aquesta proteïna en el fetge podria ser perjudicial quan s'esdevé una lesió hepàtica. Sorprenentment però, també hem trobat un patró d'expressió diferencial dels gens *Mmp8*, *Mmp12* i *Timp1* que fins ara no s'havien relacionat amb *Tcf20*.

TIMP1 es considera l'inhibidor més important de les metal·loproteïnases, inhibint la majoria de col·lagenases intersticials (MMP1, MMP3) i MMP9 (197). D'altra banda, diversos estudis relacionen la presència de MMP8, una col·lagenasa que alliberen els neutròfils i pot degradar diversos tipus de col·làgens (198), amb efectes beneficiosos en fetges fibròtics gràcies a l'activitat fibrolítica d'aquesta metal·loproteïna (199). També s'ha reportat que l'administració d'ADNc humà per a MMP8 en models experimentals de cirrosi hepàtica va reduir significativament l'índex fibròtic i la proliferació de cèl·lules estrellades hepàtiques (200). Finalment, MMP12 és una elastasa alliberada pels macròfags en la ubicació de la lesió hepàtica que pot degradar elastina, una molècula clau per l'estabilitat de la ECM (201,202). Sobre aquesta metal·loproteïna, el grup de *Sato et al.* ha reportat recentment que la inhibició de MMP12 retarda la regressió de la fibrosi (203). Els nostres resultats indiquen una menor expressió d'aquests gens (*Timp1*, *Mmp8* i *Mmp12*) al fetge dels ratolins adults *Tcf20^{+/-}*, cosa que suggereix una difícil regressió de la fibrosi en una situació de lesió hepàtica. Així doncs, els canvis en

l'expressió de reguladors de la reposició de la matriu extracel·lular es postula com un altre mecanisme pel qual la deficiència de *Tcf20* altera la resposta als estímuls profibròtics en ratolins.

En el nostre estudi, l'augment de l'activitat mitocondrial a les cèl·lules *Tcf20*^{-/-} també s'ha associat amb nivells de succinat elevats en sèrum, que és un regulador important de l'activació de cèl·lules estrellades hepàtiques. El succinat és un metabòlit generat en el cicle de l'àcid tricarboxílic i diversos estudis han demostrat que també té un paper important en la tumorigènesi, la inflamació i la senyalització paracrina en diversos òrgans i teixits, inclòs el fetge, a través del seu receptor específic GPR91 (204,205). Concretament, diversos estudis han demostrat que el succinat és un regulador important de l'activació de HSC i la producció d' α -sma. Aquesta conclusió es va obtenir aplicant diferents aproximacions com per exemple pertorbant la síntesi de succinat mitjançant la regulació de la succinat deshidrogenasa, inhibint el receptor GPR91 amb un anàleg de FGF21 o inhibint GPR91 amb metformina (206–208).

Els resultats obtinguts en humans amb variants patogèniques de *Tcf20* recolzen encara més el fet que la pèrdua de la funció de TCF20 vagi associada a nivells de succinat sèric elevats en humans. A més, també són coherents amb el paper profibrogènic de la deficiència de *Tcf20* que hem descrit en cèl·lules estrellades hepàtiques i en el nostre model de ratolí deficient pel gen *Tcf20*. Hem observat nivells més alts de transaminases i fibrosi en els individus humans amb variants patogèniques de *Tcf20* en comparació amb el grup control. Entre tots els individus estudiats, un individu del grup de TCF20 va presentar un valor ELF (ELF>9,8) per sobre del qual es defineix la presència de fibrosi (100) i dos subjectes amb la mateixa variant van mostrar un valor APRI superior a 0,50, que és considerat el punt de tall per la presència de fibrosi (209). Tanmateix, no vam detectar diferències significatives entre grups per a la resta d'indicadors de fibrosi que vam calcular.

Una possible explicació sobre perquè les diferències detectades en els indicadors APRI i ELF no es reflecteixin en els altres és que els indicadors NAFLD, FIB-4 i HFS, a diferència de APRI i ELF, inclouen l'edat com a variable. Aquesta contribueix positivament a l'augment del valor obtingut en els indicadors NAFLD, FIB-4 i HFS. Per tant, el valor d'aquests indicadors i la seva capacitat per discriminar entre grups segons la presència de fibrosi es pot veure limitada en una població jove com la inclosa en el nostre estudi amb una edat mitjana de 14,8 anys.

També s'ha de tenir en compte que l'associació entre valors més alts d'indicadors de fibrosi i la presència de fibrosi hepàtica en humans s'ha d'interpretar amb precaució ja que la mida de la mostra del nostre estudi és limitada. Una altra limitació a considerar és la manca de diagnòstic no invasiu per imatge o valoració histològica de la fibrosi per avaluar la rellevància clínica dels resultats bioquímics i els valors dels indicadors de fibrosi observats en els individus que hem estudiat. Per tant, una mida de mostra més gran i l'avaluació d'imatge o mesura de rigidesa hepàtica són necessàries per la validació dels nostres resultats en el futur, sempre tenint en compte que les variants patogèniques del gen *Tcf20* són rares en la població general.

Altres investigacions han demostrat que la gravetat i el tipus de malaltia hepàtica estan associades a diferents patrons d'anomalies cerebrals. Per exemple, la cirrosi s'associa a alteracions de la substància blanca del cervell, mentre que la malaltia del fetge gras no-alcohòlic s'associa a canvis en la substància grisa (210,211). De manera semblant al vincle establert en el nostre estudi entre la deficiència de *Tcf20* i el dany hepàtic, altres estudis mostren que les mutacions rares *no sense* s'associen amb la malaltia hepàtica i la discapacitat intel·lectual (212,213). Per exemple, l'estudi de *Mancina et al* va revelar que la variant comuna MBOAT7/TMC4 rs641738 s'associa amb un augment del contingut de triglicèrids en el fetge i un augment del risc de patir NAFLD i per tant d'increment del dany hepàtic, inclosa la progressió de la fibrosi.

Tenint en compte les evidències anteriors, és plausible considerar que els factors genètics que afecten tant la funció cerebral com hepàtica podrien contribuir a les associacions observades que hem reportat en el nostre estudi i també en altres publicacions. Tanmateix, calen més investigacions per explorar aquesta connexió potencial i donar llum a la biologia subjacent que connecta els dos òrgans per identificar possibles intervencions i millorar els resultats en aquesta població.

Els punts forts d'aquesta tesi inclouen la interrelació entre les alteracions metabòliques i l'efecte profibròtic que hem trobat en el model animal de ratolí deficient pel gen *Tcf20* i que a la vegada concorden amb els resultats obtinguts en pacients amb variants patogèniques de *Tcf20*. Aquesta concordança entre el nostre model animal i els resultats obtinguts en mostres humanes donen suport a la recomanació de mesurar els nivells de succinat sèric i altres indicadors de fibrosi en aquesta població durant les visites de seguiment com a biomarcadors no invasius d'alteracions metabòliques i fibrosi. Aconseguir un seguiment al llarg del temps de biomarcadors de fibrosi pot ser de gran ajuda en la gestió de pacients amb variants patogèniques de *Tcf20* si es té en compte que la fibrosi hepàtica pot desenvolupar-se de forma asimptomàtica.

Aquest estudi també presenta una proposta de tractament innovadora per disminuir la presència de ROS en el context de la regeneració hepàtica utilitzant nanopartícules on s'observa un millor efecte terapèutic respecte el fàrmac estàndard, el NAC, per contrarestar la toxicitat per APAP. Les nanopartícules són igual d'efectives en la reducció de ROS i del dany tissular, i a més, mentre el NAC no té cap efecte en la proliferació hepatocel·lular dels fetges danyats, les CeO₂NPs sí que la incrementen significativament tant *in vitro* com *in vivo*. Per tant, aquestes nanopartícules poden oferir vies per superar una regeneració hepàtica deficient en pacients on aquesta sigui clau per a la seva recuperació.

Aquesta tesi, per tant, ofereix noves propostes terapèutiques i obre noves vies per a la recerca d'eines tant per a la millora del diagnòstic com per al tractament de la lesió i la malaltia hepàtica crònica.

CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquesta tesi doctoral a partir dels resultats obtinguts són les següents:

- 1) Les nanopartícules d'òxid de ceri són retingudes principalment al fetge i a la melsa.
- 2) El pretractament amb CeO₂NPs és segur i no s'associa a cap efecte secundari al fetge a curt termini.
- 3) Les CeO₂NPs tenen un efecte antioxidant tant *in vitro* com *in vivo*.
- 4) Les CeO₂NPs milloren la regeneració hepàtica mitjançant la inducció de la proliferació hepatocel·lular i la reducció de l'apoptosi.
- 5) Les CeO₂NPs disminueixen el dany hepàtic després d'una sobredosi d'APAP i a diferència del NAC, també indueixen la proliferació d'hepatòcits.
- 6) Les CeO₂NPs activen la via de senyalització NFκB.
- 7) La deficiència de Tcf20 està associada a la mortalitat post-natal en ratolins.
- 8) La deficiència de Tcf20 està associada a un comportament aberrant en ratolins que és equiparable al trastorn de l'espectre autista humà.
- 9) La deficiència de Tcf20 està associada a l'increment de l'expressió de col·lagen en les cèl·lules hepàtiques estrellades de ratolí.
- 10) La deficiència de Tcf20 està associada a un increment de l'estrès oxidatiu *in vitro*.
- 11) El factor de transcripció Tcf20 té un paper en el metabolisme mitocondrial en ratolins.
- 12) L'haploinsuficiència de Tcf20 està associada a un increment de la fibrogènesi en ratolins quan aquesta és induïda.

13) La deficiència de Tcf20 està associada a una alteració metabòlica i a l'increment del risc associat als índexs de càlcul de fibrosis en humans.

BIBLIOGRAFIA

1. Arias IM, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Shafritz DA, Thorgeirsson SS, et al. 2020. The liver: Biology and pathobiology. Hoboken, NJ, USA. Wiley-Blackwell; 1-1144.
2. Sanynal AJ, Lindor KD, Boyer TD, Terault NA. 2018. Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease 7th Edition. Philadelphia, PA, USA. Elsevier Inc; 1-1052.
3. Abdel-Misih SRZ, Bloomston M. Liver Anatomy. Surg Clin North Am. 2010;90(4):643-53.
4. Gong J, Tu W, Liu J, Tian D. Hepatocytes: A key role in liver inflammation. Front Immunol. 2022;13(1083780):01-09.
5. Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. J Hepatol. 2017;66(1):212-27.
6. Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. Comp Hepatol. 2002;1(1):1.
7. Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. Gut. 2002;50(4):571-81.
8. Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DYR. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. J Clin Invest. 2013;123(5):1902-10.
9. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer Cells in the Liver. Compr Physiol. 2013;3(2):785-97.
10. Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. Cell Mol Immuno. 2016;13(3):316-27.
11. Tanaka M, Iwakiri Y. Lymphatics in the liver. Curr Opin Immunol. 2018(1);53:137-42.
12. Cheung AC, Lorenzo Pisarello MJ, LaRusso NF. Pathobiology of biliary epithelia. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018;1864(4 Pt B):1220.
13. Kruepunga N, Hakvoort TBM, Hikspoors JPJM, Köhler SE, Lamers WH. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2019;1865(5):869-78.
14. Qin L, Crawford JM. 2018. Anatomy and Cellular Functions of the Liver. In *Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease 7th Edition* (ed. Arias IM, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Shafritz DA, Thorgeirsson SS, et al). Philadelphia, PA, USA, Elsevier Inc; 2-22.

15. Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, Manou D, Passi A, Skandalis SS, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J.* 2021;288(24):6850-912.
16. Luangmonkong T, Parichatikanond W, Olinga P. Targeting collagen homeostasis for the treatment of liver fibrosis: Opportunities and challenges. *Biochem Pharmacol.* 2023;215(115740):1-14.
17. Karsdal MA, Daniels SJ, Holm Nielsen S, Bager C, Rasmussen DGK, Loomba R, et al. Collagen biology and non-invasive biomarkers of liver fibrosis. *Liver Int.* 2020;40(4):736-50.
18. Brocker CN, Vasiliou V, Nebert DW. Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. *Hum Genomics.* 2009;4(1):43-55.
19. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147(1):1-73.
20. Geervliet E, Bansal R. Matrix metalloproteinases as potential biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Cells.* 2020;9(5):1212-32.
21. Shan L, Wang F, Zhai D, Meng X, Liu J, Lv X. Matrix metalloproteinases induce extracellular matrix degradation through various pathways to alleviate hepatic fibrosis. *Biomed Pharmacother.* 2023;161(114472):1-13.
22. Du Y, Li N, Long M. Liver sinusoid on a chip. *Methods Cell Biol.* 2018;146(1):105-34.
23. Ben-Moshe S, Itzkovitz S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(7):395-410.
24. Gibert-Ramos A, Sanfeliu-Redondo D, Aristu-Zabalza P, Martínez-Alcocer A, Gracia-Sancho J, Guixé-Muntet S, et al. The hepatic sinusoid in chronic liver disease: The optimal milieu for cancer. *Cancers* 2021;13(22):5719-56.
25. Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R. Drug metabolism in the liver. *Clin Liver Dis.* 2017;21(1):1-20.
26. Fisher ES, Curry SC. Evaluation and treatment of acetaminophen toxicity. *Adv Pharmacol.* 2019;85(1):263-72.
27. Lin LY, Tong YL, Lu YQ. The characteristics of liver injury induced by Amanita and clinical value of α -amanitin detection. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2022;21(3):257-66.
28. Fontana RJ. Pathogenesis of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury and Clinical Perspectives. *Gastroenterology.* 2014;146(4):914-28.
29. Chowdhury A, Nabila J, Adelusi Temitope I, Wang S. Current etiological comprehension and therapeutic targets of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Pharmacol Res.* 2020;161(10102):1-8.

30. Lee KK, Imaizumi N, Chamberland SR, Alder NN, Boelsterli UA. Targeting mitochondria with methylene blue protects mice against acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology*. 2015;61(1):326-36.
31. Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*. 2012;44(1):88-106.
32. Bruderer R, Bernhardt OM, Gandhi T, Miladinović SM, Cheng LY, Messner S, et al. Extending the limits of quantitative proteome profiling with data-independent acquisition and application to acetaminophen-treated three-dimensional liver microtissues. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(5):1400-10.
33. Bhushan B, Apte U. Liver regeneration after acetaminophen hepatotoxicity: mechanisms and therapeutic opportunities. *Am J Pathol*. 2019;189(4):719-29.
34. Jaeschke H, Williams CD, Ramachandran A, Bajt ML. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver Int*. 2012;32(1):8-20.
35. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol*. 2019;70(1):151-71.
36. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells*. 2020;9(4):875-918.
37. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2014;383(9930):1749-61.
38. Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;18(3):151-66.
39. Elpek GÖ. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7260-76.
40. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7312-24.
41. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2(16018):1-23.
42. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):181-94.
43. Zhan SS, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, et al. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology*. 2006;43(3):435-43.

44. Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, et al. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine Expression. *Hepatology*. 2003;38(5):1188-98.
45. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001;21(3):311-35.
46. Senoo H, Kojima N, Sato M. Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitam Horm*. 2007;75(1):131-59.
47. Kocabayoglu P, Friedman SL. Cellular basis of hepatic fibrosis and its role in inflammation and cancer. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2013;5(1):217-30.
48. Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(11):1728-34.
49. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*. 2000;275(4):2247-50.
50. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun*. 2013;4(2823):1-11.
51. Affo S, Yu LX, Schwabe RF. The role of cancer-associated fibroblasts and fibrosis in liver cancer. *Annu Rev Pathol*. 2017;12(1):153-86.
52. Xu F, Liu C, Zhou D, Zhang L. TGF- β /SMAD Pathway and its regulation in hepatic fibrosis. *J Histochem Cytochem*. 2016;64(3):157-67.
53. Ying HZ, Chen Q, Zhang WY, Zhang HH, Ma Y, Zhang SZ, et al. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics. *Mol Med Rep*. 2017;16(6):7879-89.
54. Kocabayoglu P, Lade A, Lee YA, Dragomir AC, Sun X, Fiel MI, et al. β -PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis. *J Hepatol*. 2015;63(1):141-7.
55. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(7):397-411.
56. Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ, et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(32):3291-05.
57. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655-69.
58. Kendall TJ, Henedige S, Aucott RL, Hartland SN, Vernon MA, Benyon RC, et al. p75 Neurotrophin receptor signaling regulates hepatic myofibroblast proliferation and apoptosis in recovery from rodent liver fibrosis. *Hepatology*. 2009;49(3):901-10.

59. Kisseleva T, Cong M, Paik YH, Scholten D, Jiang C, Benner C, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(24):9448-53.
60. Benyon RC, Arthur MJP. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001;21(3):373-84.
61. Sharma U, Carrique L, Vadon-Le Goff S, Mariano N, Georges RN, Delolme F, et al. Structural basis of homo- and heterotrimerization of collagen I. *Nat Commun*. 2017;8(14671):1-10.
62. Jinnin M, Ihn H, Yamane K, Mimura Y, Asano Y, Tamaki K. $\alpha 2(I)$ collagen gene regulation by protein kinase C signaling in human dermal fibroblasts. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(4):1337-51.
63. Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Tamaki K. Potential regulatory elements of the constitutive up-regulated $\alpha 2(I)$ collagen gene in scleroderma dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(3):904-9.
64. Yang Y, Kim HJ, Woo KJ, Cho D, Bang SI. Lipo-PGE1 suppresses collagen production in human dermal fibroblasts via the ERK/Ets-1 signaling pathway. *PLoS One*. 2017;12(6):1-12.
65. Trojanowska M. Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene*. 2001;19(55):6464-71.
66. Manka P, Zeller A, Syn WK. Fibrosis in chronic liver disease: an update on diagnostic and treatment modalities. *Drugs*. 2019;79(9):903-27.
67. Rekdal C, Sjøttem E, Johansen T. The nuclear factor SPBP contains different functional domains and stimulates the activity of various transcriptional activators. *J Biol Chem*. 2000;275(51):40288-300.
68. Sjøttem E, Rekdal C, Svineng G, Johnsen SS, Klenow H, Uglehus RD, et al. The ePHD protein SPBP interacts with TopBP1 and together they co-operate to stimulate Ets1-mediated transcription. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(19):6648-62.
69. Lyngso C, Bouteiller G, Damgaard CK, Ryom D, Sanchez-Munoz S, Norby PL, et al. Interaction between the transcription factor SPBP and the positive cofactor RNF4. An interplay between protein binding zinc fingers. *J Biol Chem*. 2000;275(34):26144-9.
70. Gburcik V, Bot N, Maggolini M, Picard D. SPBP is a phosphoserine-specific repressor of estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol*. 2005;25(9):3421-30.
71. Darvekar SR, Elvenes J, Brenne HB, Johansen T, Sjøttem E. SPBP is a sulforaphane induced transcriptional coactivator of NRF2 regulating expression of the autophagy receptor p62/SQSTM1. *PLoS One*. 2014;9(1):1-12.

72. Elvenes J, Ivan E, Thomassen S, Johnsen SS, Kaino K, Sjøttem E, et al. Pax6 represses androgen receptor-mediated transactivation by inhibiting recruitment of the coactivator SPBP. *PLoS One*. 2011;6(9):1-12.
73. Lee MY, Luciano AK, Ackah E, Rodriguez-Vitad J, Bancroft TA, Eichmann A, et al. Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(35):12865-70.
74. Babbs C, Lloyd D, Pagnamenta AT, Twigg SRF, Green J, McGowan SJ, et al. De novo and rare inherited mutations implicate the transcriptional coregulator TCF20/SPBP in autism spectrum disorder. *J Med Genet*. 2014;51(11):737-47.
75. Vetrini F, McKee S, Rosenfeld JA, Suri M, Lewis AM, Nugent KM, et al. De novo and inherited TCF20 pathogenic variants are associated with intellectual disability, dysmorphic features, hypotonia, and neurological impairments with similarities to Smith-Magenis syndrome. *Genome Med*. 2019;11(12):1-17.
76. Schäffgen J, Cremer K, Becker J, Wieland T, Zink AM, Kim S, et al. De novo nonsense and frameshift variants of TCF20 in individuals with intellectual disability and postnatal overgrowth. *Eur J of Hum Genet*. 2016;24(12):1739-45.
77. Lelieveld SH, Reijnders MRF, Pfundt R, Yntema HG, Kamsteeg EJ, De Vries P, et al. Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. *Nat Neurosci*. 2016;19(9):1194-6.
78. Ahmed M, Balasubramanian M, Banka S, Baralle D, Barnicoat A, Baty D, et al. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders Code availability Source code for filtering candidate DNMs, testing DNM enrichment, DNM clustering and phenotypic similarity can be found here Author contributions Patient recruitment and phenotyping: Europe PMC Funders Group. *Nature*. 2017;542(7642):433-8.
79. Lin Y, Afshar S, Rajadhyaksha AM, Potash JB, Han S. A machine learning approach to predicting autism risk genes: validation of known genes and discovery of new candidates. *Front Genet*. 2020;11(500064):1-11.
80. Zhou J, Hamdan H, Yalamanchili HK, Pang K, Pohodich AE, Lopez J, et al. Disruption of MeCP2-TCF20 complex underlies distinct neurodevelopmental disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(4):1-12.
81. Feng C, Zhao J, Ji F, Su L, Chen Y, Jiao J. TCF 20 dysfunction leads to cortical neurogenesis defects and autistic-like behaviors in mice. *EMBO Rep*. 2020;21(8):1-17.
82. Guilliams M, Scott CL. Liver macrophages in health and disease. *Immunity*. 2022;55(9):1515-29.
83. Gao CC, Bai J, Han H, Qin HY. The versatility of macrophage heterogeneity in liver fibrosis. *Front Immunol*. 2022;13(968879):1-12.

84. Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology*. 2014;147(4):765-783.
85. Leroux A, Ferrere G, Godie V, Cailleux F, Renoud ML, Gaudin F, et al. Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *J Hepatol*. 2012;57(1):141-9.
86. Wang C, Ma C, Gong L, Guo Y, Fu K, Zhang Y, et al. Macrophage polarization and its role in liver disease. *Front Immunol*. 2021;12(803037):1-25.
87. Wang Z, Du K, Jin N, Tang B, Zhang W. Macrophage in liver Fibrosis: Identities and mechanisms. *Int Immunopharmacol*. 2023;120(110357):1-8.
88. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*. 2014;147(3):577-94.
89. DeLeve LD, Wang X, Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology*. 2008;48(3):920-30.
90. Xie G, Wang X, Wang L, Wang L, Atkinson RD, Kanel GC, et al. Role of differentiation of liver sinusoidal endothelial cells in progression and regression of hepatic fibrosis in rats. *Gastroenterology*. 2012;142(4):918-27.
91. Wang Y, Zhang C. The roles of liver-resident lymphocytes in liver diseases. *Front Immunol*. 2019;10(1582):1-13.
92. Kisseleva T, Cong M, Paik YH, Scholten D, Jiang C, Benner C, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(24):9448-53.
93. Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, Dapito DH, Mu X, Hsu CC, et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology*. 2012;143(4):1073-83.
94. Lo RC, Kim H. Histopathological evaluation of liver fibrosis and cirrhosis regression. *Clin Mol Hepatol*. 2017;23(4):302-7.
95. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;102(3):538-49.
96. Lai M, Afdhal NH. Liver fibrosis determination. *Gastroenterol Clin North Am*. 2019;48(2):281-9.
97. Rigor J, Diegues A, Presa J, Barata P, Martins-Mendes D. Noninvasive fibrosis tools in NAFLD: validation of APRI, BARD, FIB-4, NAFLD fibrosis score, and Hepamet fibrosis score in a Portuguese population. *Postgrad Med*. 2022;134(4):435-40.

98. Rigor J, Diegues A, Presa J, Barata P, Martins-Mendes D. Noninvasive fibrosis tools in NAFLD: validation of APRI, BARD, FIB-4, NAFLD fibrosis score, and Hepamet fibrosis score in a Portuguese population. *Postgrad Med.* 2022;134(4):435-40.
99. Lurie Y, Webb M, Cytter-Kuint R, Shteingart S, Lederkremer GZ. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2015;21(41):11567-83.
100. Vali Y, Lee J, Boursier J, Spijker R, Löffler J, Verheij J, et al. Enhanced liver fibrosis test for the non-invasive diagnosis of fibrosis in patients with NAFLD: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2020;73(2):252-62.
101. Apte U, Gkretsi V, Bowen WC, Mars WM, Luo JH, Donthamsetty S, et al. Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase. *Hepatology.* 2009;50(3):844-51.
102. Ampuero J, Pais R, Aller R, Gallego-Durán R, Crespo J, García-Monzón C, et al. Development and validation of Hepamet Fibrosis Scoring System-A simple, noninvasive test to identify patients with nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;18(1):216-25.
103. Loomba R, Adams LA. Advances in non-invasive assessment of hepatic fibrosis. *Gut.* 2020;69(7):1343-52.
104. Chong SE, Chang F, Chuah KH, Sthaneshwar P, Nik Mustapha NR, Mahadeva S, et al. Validation of the Hepamet fibrosis score in a multi-ethnic Asian population. *Ann Hepatol.* 2023;28(2):1-8.
105. Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. *N Engl J Med.* 2013;369(26):2525-34.
106. Patten DA, Shetty S. Chronic liver disease: scavenger hunt for novel therapies. *Lancet.* 2018;391(10116):104-5.
107. Doyle JS, Thompson AJ, Higgs P, Stoope M, Dietze PM, Hellard ME. New hepatitis C antiviral treatments eliminate the virus. *Lancet.* 2017;390(10092):358-9.
108. Chen Z, Jain A, Liu H, Zhao Z, Cheng K. Targeted drug delivery to hepatic stellate cells for the treatment of liver fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;370(3):695-702.
109. Michalopoulos GK. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology.* 2017;65(4):1384-92.
110. Huang R, Zhang X, Gracia-Sancho J, Xie WF. Liver regeneration: Cellular origin and molecular mechanisms. *Liver Int.* 2022;42(7):1486-95.
111. Gilgenkrantz H, Collin de l'Hortet A. Understanding liver regeneration: from mechanisms to regenerative medicine. *Am J Pathol.* 2018;188(6):1316-27.
112. Yagi S, Hirata M, Miyachi Y, Uemoto S. Liver regeneration after hepatectomy and partial liver transplantation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):1-23.

113. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 1931;12(1):186-202.
114. Mars WM, Liu ML, Kitson RP, Goldfarb RH, Gabauer MK, Michalopoulos GK. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. *Hepatology.* 1995;21(6):1695-701.
115. Sokabe T, Yamamoto K, Ohura N, Nakatsuka H, Qin K, Obi S, et al. Differential regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by fluid shear stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(5):2027-34.
116. Schuppan D, Schmid M, Somasundaram R, Ackermann R, Ruehl M, Nakamura T, et al. Collagens in the liver extracellular matrix bind hepatocyte growth factor. *Gastroenterology.* 1998;114(1):139-52.
117. Block GD, Locker J, Bowen WC, Petersen BE, Katyal S, Strom SC, et al. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol.* 1996;132(6):1133-49.
118. Monga SPS, Padiaditakis P, Mule K, Stolz DB, Michalopoulos GK. Changes in WNT/beta-catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration. *Hepatology.* 2001;33(5):1098-109.
119. Nejak-Bowen K, Moghe A, Cornuet P, Preziosi M, Nagarajan S, Monga SP. Role and regulation of p65/ β -Catenin association during liver injury and regeneration: A "Complex" relationship. *Gene Expr.* 2017;17(3):219-35.
120. Thompson MD, Monga SPS. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology.* 2007;45(5):1298-305.
121. Carver RS, Stevenson MC, Scheving LA, Russell WE. Diverse expression of ErbB receptor proteins during rat liver development and regeneration. *Gastroenterology.* 2002;123(6):2017-27.
122. Tan X, Apte U, Micsenyi A, Kotsagrelis E, Luo JH, Ranganathan S, et al. Epidermal growth factor receptor: A novel target of the Wnt/ β -catenin pathway in liver. *Gastroenterology.* 2005;129(1):285-302.
123. Paranjpe S, Bowen WC, Mars WM, Orr A, Haynes MM, DeFrances MC, et al. Combined systemic elimination of MET and epidermal growth factor receptor signaling completely abolishes liver regeneration and leads to liver decompensation. *Hepatology.* 2016;64(5):1711-24.

124. Mitchell C, Nivison M, Jackson LF, Fox R, Lee DC, Campbell JS, et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem*. 2005;280(4):2562-8.
125. Khai NC, Takahashi T, Ushikoshi H, Nagano S, Yuge K, Esaki M, et al. In vivo hepatic HB-EGF gene transduction inhibits Fas-induced liver injury and induces liver regeneration in mice: a comparative study to HGF. *J Hepatol*. 2006;44(6):1046-54.
126. Berasain C, García-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Lee DC, Prieto J, et al. Amphiregulin: An early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology*. 2005;128(2):424-32.
127. Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(5):1558-62.
128. Mullany LK, White P, Hanse EA, Nelsen CJ, Goggin MM, Mullany JE, et al. Distinct proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo. *Cell Cycle*. 2008;7(14):2215-24.
129. Shteyer E, Liao Y, Muglia LJ, Hruz PW, Rudnick DA. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology*. 2004;40(6):1322-32.
130. Rabes HM. Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver. *Ciba Found Symp*. 1977;(55):31-53.
131. Módis L, Martínez-Hernández A. Hepatocytes modulate the hepatic microvascular phenotype. *Lab Invest*. 1991;65(6):661-70.
132. Ross MA, Sander CM, Kleeb TB, Watkins SC, Stolz DB. Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology*. 2001;34(6):1135-48.
133. Ding B, Sen DJ, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z, et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature*. 2010;468(7321):310-5.
134. Wang L, Wang X, Xie G, Wang L, Hill CK, DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells promote liver regeneration in rats. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1567-73.
135. Wack KE, Ross MA, Zegarra V, Sysko LR, Watkins SC, Stolz DB. Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology*. 2001;33(2):363-78.

136. Grappone C, Pinzani M, Parola M, Pellegrini G, Caligiuri A, Defranco R, et al. Expression of platelet-derived growth factor in newly formed cholangiocytes during experimental biliary fibrosis in rats. *J Hepatol.* 1999;31(1):100-9.
137. Gandhi CR. Hepatic stellate cell activation and pro-fibrogenic signals. *J Hepatol.* 2017;67(5):1104-5.
138. Widmann JJ, Fahimi HD. Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver. A light and electron microscopic cytochemical study. *Am J Pathol.* 1975;80(3):349-66.
139. Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, et al. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol.* 2002;36(5):653-9.
140. Lenhard Rudolph K, Trautwein C, Kubicka S, Rakemann T, Bahr MJ, Sedlacek N, et al. Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology.* 1999;30(5):1159-66.
141. Zhao B, Tumaneng K, Guan KL. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol.* 2011;13(8):877-83.
142. Yimlamai D, Christodoulou C, Galli GG, Yanger K, Pepe-Mooney B, Gurung B, et al. Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell.* 2014;157(6):1324-38.
143. Wang C, Zhang L, He Q, Feng X, Zhu J, Xu Z, et al. Differences in Yes-associated protein and mRNA levels in regenerating liver and hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* 2012;5(2):410-4.
144. Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development.* 2011;138(1):9-22.
145. Morales-Ruiz M, Santel A, Ribera J, Jiménez W. The role of Akt in chronic liver disease and liver regeneration. *Semin Liver Dis.* 2017;37(1):11-16.
146. Pauta M, Rotllan N, Fernández-Hernando A, Langhi C, Ribera J, Lu M, et al. Akt-mediated FoxO1 inhibition is required for liver regeneration. *Hepatology.* 2016;63(5):1660-74.
147. Wendon J, Cordoba J, Dhawan A, Larsen FS, Manns M, Nevens F, et al. EASL Clinical Practical Guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure. *J Hepatol.* 2017;66(5):1047-81.
148. Cho Lam Wong T, Mau Lo C. Resection strategies for hepatocellular carcinoma preoperative evaluation of liver function clinical and biochemical tests. *Semin Liver Dis.* 2013;33(3):273-81.
149. di Bello G, Vendemiale G, Bellanti F. Redox cell signaling and hepatic progenitor cells. *Eur J Cell Biol.* 2018;97(8):546-56.

150. Ben Mosbah I, Duval H, Mbatchi SF, Ribault C, Grandadam S, Pajaud J, et al. Intermittent selective clamping improves rat liver regeneration by attenuating oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis.* 2014;5(3):1-11.
151. Dayoub R, Vogel A, Schuett J, Lupke M, Spieker SM, Kettern N, et al. Nrf2 activates augments liver regeneration (ALR) via antioxidant response element and links oxidative stress to liver regeneration. *Mol Med.* 2013;19(1):237-44.
152. Murakami S, Motohashi H. Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation. *Free Radic Biol Med.* 2015;88(Pt B):168-78.
153. Sun S, Xie F, Xu X, Cai Q, Zhang Q, Cui Z, et al. Advanced oxidation protein products induce S-phase arrest of hepatocytes via the ROS-dependent, β -catenin-CDK2-mediated pathway. *Redox Biol.* 2018;14(1):338-53.
154. Barnouin K, Dubuisson ML, Child ES, Fernandez de Mattos S, Glassford J, Medema RH, et al. H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J Biol Chem.* 2002;277(16):13761-70.
155. Ramos AP, Cruz MAE, Tovani CB, Ciancaglini P. Biomedical applications of nanotechnology. *Biophys Rev.* 2017;9(2):79-89.
156. Nikzamir M, Akbarzadeh A, Panahi Y. An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2021;61(102316):1-12.
157. Singh KRB, Nayak V, Sarkar T, Singh RP. Cerium oxide nanoparticles: properties, biosynthesis and biomedical application. *RSC Adv.* 2020;10(45):27194-214.
158. Casals G, Perramón M, Casals E, Portolés I, Fernández-Varo G, Morales-Ruiz M, et al. Cerium Oxide Nanoparticles: A new therapeutic tool in liver diseases. *Antioxidants.* 2021;10(5):660-83.
159. Esch F, Fabris S, Zhou L, Montini T, Africh C, Fornasiero P, et al. Electron localization determines defect formation on ceria substrates. *Science.* 2005;309(5735):752-5.
160. Campbell CT, Peden CHF. Oxygen vacancies and catalysis on ceria surfaces. *Science.* 2005;309(5735):713-4.
161. Wang Z, Shen X, Gao X, Zhao Y. Simultaneous enzyme mimicking and chemical reduction mechanisms for nanoceria as a bio-antioxidant: A catalytic model bridging computations and experiments for nanozymes. *Nanoscale.* 2019;11(28):13289-99.
162. Montini T, Melchionna M, Monai M, Fornasiero P. Fundamentals and catalytic applications of CeO₂-based materials. *Chem Rev.* 2016;116(10):5987-6041.

163. Heckert EG, Karakoti AS, Seal S, Self WT. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials*. 2008;29(18):2705-9.
164. Pirmohamed T, Dowding JM, Singh S, Wasserman B, Heckert E, Karakoti AS, et al. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem Commun (Camb)*. 2010;46(16):2736-8.
165. Casals E, Zeng M, Parra-Robert M, Fernández-Varo G, Morales-Ruiz M, Jiménez W, et al. Cerium Oxide Nanoparticles: Advances in biodistribution, toxicity, and preclinical exploration. *Small*. 2020;16(20):1-22.
166. Muhammad F, Wang A, Qi W, Zhang S, Zhu G. Intracellular antioxidants dissolve man-made antioxidant nanoparticles: Using redox vulnerability of nanoceria to develop a responsive drug delivery system. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(21):19424-33.
167. Xu C, Qu X. Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications. *NPG Asia Mater*. 2014;6(3):1-16.
168. Oró D, Yudina T, Fernández-Varo G, Casals E, Reichenbach V, Casals G, et al. Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal hypertension and display anti-inflammatory properties in rats with liver fibrosis. *J Hepatol*. 2016;64(3):691-8.
169. Fernández-Varo G, Perramón M, Carvajal S, Oró D, Casals E, Boix L, et al. Bespoke nanoceria: A new effective treatment in experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2020;72(4):1267-82.
170. Carvajal S, Perramón M, Casals G, Oró D, Ribera J, Morales-Ruiz M, et al. Cerium oxide nanoparticles protect against oxidant injury and interfere with oxidative mediated kinase signaling in human-derived hepatocytes. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):1-22.
171. Amin KA, Hassan MS, Awad EST, Hashem KS. The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline. *Int J Nanomedicine*. 2011;6(1):143-9.
172. Horimoto M, Fülöp P, Derdák Z, Wands JR, Baffy G. Uncoupling protein-2 deficiency promotes oxidant stress and delays liver regeneration in mice. *Hepatology*. 2004;39(2):386-92.
173. Viswanathan P, Sharma Y, Gupta P, Gupta S. Replicative stress and alterations in cell cycle checkpoint controls following acetaminophen hepatotoxicity restrict liver regeneration. *Cell Prolif*. 2018;51(3):1-14.
174. Bouhlef A, Ben Mosbah I, Hadj Abdallah N, Ribault C, Viel R, Mannaï S, et al. Thymoquinone prevents endoplasmic reticulum stress and mitochondria-induced apoptosis in a rat model of partial hepatic warm ischemia reperfusion. *Biomed Pharmacother*. 2017;94(1):964-73.

175. Bouhlel A, Bejaoui M, Ben Mosbah I, Hadj Abdallah N, Ribault C, Viel R, et al. Thymoquinone protects rat liver after partial hepatectomy under ischaemia/reperfusion through oxidative stress and endoplasmic reticulum stress prevention. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018;45(1):943-51.
176. Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology*. 2010;51(1):246-54.
177. Du K, McGill MR, Xie Y, Bajt ML, Jaeschke H. Resveratrol prevents protein nitration and release of endonucleases from mitochondria during acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 2015;81(1):62-70.
178. Han D, Dara L, Win S, Than TA, Yuan L, Abbasi SQ, et al. Regulation of drug-induced liver injury by signal transduction pathways: critical role of mitochondria. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(4):243-53.
179. Du K, Ramachandran A, Weemhoff JL, Chavan H, Xie Y, Krishnamurthy P, et al. Editor's Highlight: Metformin protects against acetaminophen hepatotoxicity by attenuation of mitochondrial oxidant stress and dysfunction. *Toxicol Sci*. 2016;154(2):214-26.
180. Davis D, Potter W, Jollow D, Mitchell J. Species differences in hepatic glutathione depletion, covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. *Life Sci*. 1974;14(11):2099-109.
181. Lakshmi T, Sri Renukadevi B, Senthilkumar S, Haribalan P, Parameshwari R, Vijayaraghavan R, et al. Seed and bark extracts of *Acacia catechu* protects liver from acetaminophen induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress, antioxidant enzymes and liver function enzymes in Wistar rat model. *Biomed Pharmacother*. 2018;108(1):838-44.
182. Al-Brakati AY, Fouda MS, Tharwat AM, Elmahallawy EK, Kassab RB, Abdel Moneim AE. The protective efficacy of soursop fruit extract against hepatic injury associated with acetaminophen exposure is mediated through antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(13):13539-50.
183. Porto HKP, Grando MD, Ramalho LNZ, Valadares MC, Bendhack LM, Batista AC, et al. Exposure to acetaminophen impairs vasodilation, increases oxidative stress and changes arterial morphology of rats. *Arch Toxicol*. 2019;93(7):1955-64.
184. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature*. 1995;376(6536):167-70.
185. Iimuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, Behrens KE, Schoonhoven R, Grisham JW, et al. NF κ B prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest*. 1998;101(4):802-11.

186. Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*. 2005;121(7):977-90.
187. Morgan MJ, Liu Z gang. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*. 2011;21(1):103-15.
188. Chen G, Xu Y. Biosynthesis of cerium oxide nanoparticles and their effect on lipopolysaccharide (LPS) induced sepsis mortality and associated hepatic dysfunction in male Sprague Dawley rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;83(1):148-53.
189. Selvaraj V, Manne ND, Arvapalli R, Rice KM, Nandyala G, Fankenhanel E, et al. Effect of cerium oxide nanoparticles on sepsis induced mortality and NF- κ B signaling in cultured macrophages. *Nanomedicine*. 2015;10(8):1275-88.
190. Selvaraj V, Nepal N, Rogers S, Manne NDPK, Arvapalli R, Rice KM, et al. Inhibition of MAP kinase/NF- κ B mediated signaling and attenuation of lipopolysaccharide induced severe sepsis by cerium oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2015;59(1):160-71.
191. Cordoba-Jover B, Ribera J, Portoles I, Sandalinas S, Elortza F, Pujol A, et al. THU-070-The nuclear factor TCF20 regulates the severity of liver fibrosis in mice. *J Hepatol*. 2019;70(1):1.
192. Gray PA, Fu H, Luo P, Zhao Q, Yu J, Ferrari A, et al. Mouse brain organization revealed through direct genome-scale TF expression analysis. *Science*. 2004;306(5705):2255-7.
193. Okada Y, Nagase H, Harris ED. A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. *J of Biol Chem*. 1986;261(30):14245-55.
194. Sanz L, Moscat J, Mari' M, Diaz-Meco MT. Molecular characterization of a novel transcription factor that controls stromelysin expression. *Mol Cell Biol*. 1995;15(6):3164-70.
195. Monvoisin A, Bisson C, Si-Tayeb K, Balabaud C, Desmoulière A, Rosenbaum J. Involvement of matrix metalloproteinase type-3 in hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2002;97(2):157-62.
196. Bauer A, Habior A. Concentration of serum matrix metalloproteinase-3 in patients with primary biliary cholangitis. *Front Immunol*. 2022;13(885229):1-9.
197. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Rosa CCD La, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):1-53.

198. Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(9):649-65.
199. Saijou E, Enomoto Y, Matsuda M, Yuet-Yin Kok C, Akira S, Tanaka M, et al. Neutrophils alleviate fibrosis in the CCl₄-induced mouse chronic liver injury model. *Hepatol Commun*. 2018;2(6):703-17.
200. Siller-López F, García-Bauelos J, Hasty KA, Segura J, Ramos-Márquez M, Qoronfleh MW, et al. Truncated active matrix metalloproteinase-8 gene expression in Hepg2 cells is active against native type I collagen. *J Hepatol*. 2000;33(5):758-63.
201. Pellicoro A, Aucott RL, Ramachandran P, Robson AJ, Fallowfield JA, Snowdon VK, et al. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. *Hepatology*. 2012;55(6):1965-75.
202. Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(46):3186-95.
203. Sato T, Head KZ, Li J, Dolin CE, Wilkey D, Skirtich N, et al. Fibrosis resolution in the mouse liver: Role of Mmp12 and potential role of calpain 1/2. *Matrix Biol Plus*. 2022;17(100127):1-18.
204. De Castro Fonseca M, Aguiar CJ, Da Rocha Franco JA, Gingold RN, Leite MF. GPR91: Expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. *Cell Commun Signal*. 2016;14(1):1-9.
205. He W, Miao FJP, Lin DCH, Schwandner RT, Wang Z, Gao J, et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2004;429(6988):188-93.
206. Li YH, Choi DH, Lee EH, Seo SR, Lee S, Cho EH. Sirtuin 3 (SIRT3) regulates α -smooth muscle actin (α -SMA) production through the succinate dehydrogenase-G protein-coupled receptor 91 (GPR91) pathway in hepatic stellate cells. *J Biol Chem*. 2016;291(19):10277-92.
207. Le CT, Nguyen G, Park SY, Choi DH, Cho EH. LY2405319, an analog of fibroblast growth factor 21 ameliorates α -smooth muscle actin production through inhibition of the succinate—G-protein couple receptor 91 (GPR91) pathway in mice. *PLoS One*. 2018;13(2):1-13.
208. Nguyen G, Park SY, Le CT, Park WS, Choi DH, Cho EH. Metformin ameliorates activation of hepatic stellate cells and hepatic fibrosis by succinate and GPR91 inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(4):2649-56.

209. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518-26.
210. Petta S, Tuttolomondo A, Gagliardo C, Zafonte R, Brancatelli G, Cabibi D, et al. The presence of white matter lesions is associated with the fibrosis severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine*. 2016;95(16):1-8.
211. Peng Z, Duggan MR, Dark HE, Daya GN, An Y, Davatzikos C, et al. Association of liver disease with brain volume loss, cognitive decline, and plasma neurodegenerative disease biomarkers. *Neurobiol Aging*. 2022;120(1):34-42.
212. Heidari E, Caddeo A, Zarabadi K, Masoudi M, Tavasoli AR, Romeo S, et al. Identification of novel loss of function variants in MBOAT7 resulting in intellectual disability. *Genomics*. 2020;112(6):4072-7.
213. Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, Pingitore P, Meroni M, Rametta R, et al. The MBOAT7-TMC4 variant rs641738 increases risk of nonalcoholic fatty liver disease in individuals of european descent. *Gastroenterology*. 2016;150(5):1219-30.