

59
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
BIOMATRICES OBTENIDAS DE HIGADOS DE
RATAS NORMALES Y CIRROTICAS, Y SU
EFECTO COMO SUSTRATO EN CULTIVOS
PRIMARIOS DE HEPATOCITOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

DAVID GARCADIEGO CAZARES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LINO DIAZ DE LEON HERNANDEZ



MEXICO, D.F.



1997

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
**"Aislamiento y caracterización de biomatrices obtenidas de hígados de ratas normales
y cirróticas, y su efecto como sustrato para cultivos primarios de hepatocitos"**

realizado por **DAVID GARCADIIEGO CAZARES.**

con número de cuenta **8718348-7**, pasante de la carrera de **BIOLOGIA.**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Lino Díaz de León Hernández.

Propietario

Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz.

Propietario

M en IBB. Saúl Cano Colín.

Suplente

Dra. Genoveva González Morán.

Suplente

Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Consejo Departamental de Biología

COORDINACIÓN GENERAL
DE BIOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Lino Díaz de León Hernández y con el apoyo de una beca por parte de Fundación UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial al Dr. Lino Díaz de León, por la dirección y su apoyo para la realización de esta tesis.

También agradezco la ayuda incondicional de mis compañeros Francisco Miguel Acosta y Felipe Moctezuma, así como su muy grata amistad.

A todos los integrantes del laboratorio de Tejido Conjuntivo, en especial a Saúl, Jesús y Edgar, quienes aclararon en algún momento mis dudas.

Por último agradezco a Doña Chayo su generosidad y sus palabras de ánimo.

A mis hermanos.

Isaac, Abel, Abraham, Sara, Raquel, Jacob y Daniel.

A mis sobrinos: Israel, Ignacio, Ruth, Carlos Abraham, Abigail, Saúl, Rebeca, Rubén, Aréli y Liliana Edith.

A todos mis maestros.

A todos mis amigos (especialmente a los de la Facultad de Ciencias).

A la Universidad.

Al CCH, donde reafirme el gusto por aprender y estudiar.

Especialmente a mi querida hermana SARA.

A Paty, donde sea que te encuentres.

*A la memoria de mi padre:
Gildardo Abraham Garcíadiego Aquino.
Mi primer maestro y base de mi educación.
¡Gracias Papá!*

Sueña Antonio con que la tierra que trabaja le pertenece, sueña que su sudor es pagado con justicia y verdad, sueña que hay escuela para curar la ignorancia y medicina para espantar la muerte, sueña que su casa se ilumina y su mesa se llena, sueña que su tierra es libre y que es razón de su gente gobernar y gobernarse, sueña que está en paz consigo mismo y con el mundo. Sueña que debe luchar para tener ese sueño, sueña que debe haber muerto para que haya vida. **Sueña Antonio y despierta...**
En este país todos sueñan. Ya llega la hora de despertar.

Sc I Marcos. Chiapas: el sureste en dos vientos, una tormenta y una profecía. Selva Lacandona, agosto 1992. (La Jornada, 18 enero 1994).

CONTENIDO

RESUMEN	1	C) Obtención de la biomatriz y homogenados	24
I. INTRODUCCIÓN	2	D) Cuantificación de colágena total.....	25
El hígado	2	E) Cuantificación de proteína total	25
-Funciones	4	F) Cuantificación de DNA	25
-Componentes celulares	6	G) Extracción y cuantificación de glicosaminoglicanos	25
(La matriz extracelular hepática)	6	H) Identificación de proteínas de la biomatriz	26
-El papel de la matriz extracelular.....	12	I) Identificación de glicosaminoglicanos.....	26
-Interacción célula-matriz extracelular.....	12	J) Preparación de las biomatrices como sustrato para cultivo	26
Cirrosis Hepática	13	K) Aislamiento de hepatocitos	27
-Fibrogénesis hepática	14	L) Cultivo de hepatocitos	27
-Alteraciones de la matriz extracelular	14	M) Adhesión de hepatocitos	27
-Alteraciones Celulares	16	N) Morfología de hepatocitos	27
-Terapéutica y fármacos en el tratamiento de la cirrosis	19	O) Integridad celular y duración de los cultivos	27
II. ANTECEDENTES	20	P) Ensayos de secreción de albúmina por los hepatocitos en cultivo	28
-Inducción de la cirrosis por CCl ₄ como modelo experimental en ratas.....	20	Q) Análisis estadístico.....	28
-Aislamiento y cultivos primarios de hepatocitos sembrados sobre diferentes sustratos.....	21	VI. RESULTADOS	28
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23	VII. DISCUSIÓN	45
IV. MATERIALES	24	VIII. CONCLUSIONES	48
V. MÉTODOS	24	IX. PERSPECTIVAS	49
A) Inducción de la cirrosis	24	X. REFERENCIAS	50
B) Obtención del hígado	24		

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP	alfa fetoproteína	NADH	nicotin adenin dinucleótido
AMPc	AMP cíclico	NEM	N-etilmaleimida
ASB	albúmina de suero bovino	OH-Pro	hidroxiprolina
BM-C	biomatriz cirrótica	PBS	solución amortiguadora de fosfatos
BM-N	biomatriz normal	PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
clg	colágena	PG	proteoglicano
DMEM	medio esencial mínimo modificado por Dulbecco-Vögt	PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonil
DMSO	dimetil sulfóxido	Pro	prolina
EDTA	ácido etilendiamintetracético	RGD	arginina-glicina-aspartico.
EHS	tumor Engelbert-Holmes-Swarm	RNAm	RNA mensajero
FGF	factor de crecimiento fibroblástico	SDS	dodecil sulfato de sodio.
Fn	fibronectina	SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
FSC	células almacenadoras de grasa (Fat Storing Cell)	SPARC	proteínas ácidas secretadas y ricas en cisteína
GAG	glicosaminoglicanos	TCA	ácido tricloroacético
gts	gramos de tejido seco	TGF- β	factor de crecimiento transformante beta
IgG	inmunoglobulina G	TIMP	inhibidores de metaloproteasas tisulares
IL-1	interleucina 1	TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
LDH	deshidrogenasa láctica	TSP	trombospondina
Lm	laminina		
MEC	matriz extracelular		
MHD	medio hormonalmente definido		
MYF	miofibroblastos		

Aislamiento y Caracterización de Biomatrices Obtenidas de Hígados de Ratas Normales y Cirróticas, y su Efecto como Sustrato en Cultivos Primarios de Hepatocitos

David Garcadiengo Cázares

RESUMEN

La matriz extracelular se consideraba anteriormente como un "cementante" que mantenía a las células unidas y la cual les confería la capacidad para formar estructuras específicas para las funciones de los tejidos. Sin embargo, ahora se sabe que la importancia de la matriz extracelular va más allá de simples funciones estructurales, ya que participa en procesos como la migración, comunicación, proliferación y diferenciación celular; ya que los componentes de la matriz extracelular o alguno de los productos de su degradación, tienen la capacidad de enviar señales a las células, vía receptores específicos de la membrana plasmática que se relacionan a su vez con proteínas del citoesqueleto y participan en la activación de señales de transducción intracelular. Además, en la matriz extracelular se encuentran interaccionando otras moléculas como son hormonas, enzimas, citocinas y factores de crecimiento.

Por lo anteriormente mencionado, es evidente la importancia de la interacción de las células con la matriz extracelular y su modificación en el desarrollo de patologías tales como la cirrosis hepática, en la cual se alteran las proporciones de los componentes de la matriz extracelular de tal forma, que hay un aumento en la síntesis y depósito de colágenas y una aparente disminución en la degradación de las mismas, además se sabe que hay una mayor producción de glicosaminoglicanos en casos de fibrosis.

En este trabajo se aislaron y caracterizaron bioquímicamente, las biomatrices obtenidas de hígados de ratas normales y cirróticas, dichas biomatrices tienen una gran cantidad de componentes de la matriz extracelular como son: colágenas tipo I y III, principalmente, y tipo IV en menor proporción, las cuales constituyen cerca del

90% de la biomatriz del hígado normal. Además, contienen otras proteínas no colagénicas en menor cantidad. Sin embargo, la concentración de glicosaminoglicanos es muy pequeña en relación a la encontrada en tejido fresco, ya que estos componentes posiblemente se pierden en el proceso de aislamiento de la biomatriz.

Una vez aisladas y caracterizadas bioquímicamente, las biomatrices se utilizaron como sustrato para cultivos primarios de hepatocitos de ratas normales y cirróticas, ya que se tiene el antecedente que en biomatrices de rata normal estos cultivos se mantienen por un largo tiempo y se incrementa la eficiencia de adhesión y sobrevivencia de los hepatocitos (Rojkind et al 1980). Sugerimos que si existen diferencias en las proporciones de los componentes de las biomatrices normales y cirróticas, también serán diferentes las interacciones célula-matriz extracelular y por lo tanto existan diferencias en la adhesión, viabilidad, sobrevivencia y diferenciación celular en los diferentes tipos de cultivo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran que existe una mayor proporción de colágenas tipo I y III en hígados y biomatrices obtenidos de ratas con fibrosis hepática; un aumento en aproximadamente tres veces en glicosaminoglicanos de tejido cirrótico que también se observó en la biomatriz, aunque en cantidades muy por debajo de las esperadas. También se determinó un aumento en la cantidad de DNA total en hígados cirróticos y se observó un cambio en el patrón de proteínas de la biomatriz cirrótica por análisis electroforetico.

Además, se realizaron estudios de viabilidad y adhesión de hepatocitos (de ratas normales y cirróticas) en cultivo, sobre biomatrices

aisladas de ratas normales y cirróticas, generandose cultivos homólogos y heterólogos. En estos cultivos se observaron apreciables diferencias morfológicas en relación a los cultivos tradicionales sobre colágena seca. Sobre la biomatriz, los hepatocitos formaron cordones de células similares a canalículos hepáticos, además presentaron una mayor sobrevivencia y adhesión sobre la biomatriz. También se determinó la cantidad de DNA y el número celular, los cuales no variaron, por lo que no hubo proliferación celular en ningún tipo de cultivo.

Por último, se determinó por inmunotransferencia la secreción de albúmina como un parámetro de diferenciación celular, donde los cultivos tradicionales disminuyeron esta capacidad a los tres días de mantenimiento, mientras que los cultivos de hepatocitos normales o cirróticos sembrados sobre la biomatriz normal, secretaron albúmina en una forma constante durante el tiempo de duración del cultivo (siete días), pero los sembrados sobre la biomatriz cirrótica pasaron por un período de recuperación, llegando entre el día cuatro a cinco en cultivo a los niveles normales de secreción de albúmina.

I. INTRODUCCIÓN

EL HÍGADO

El hígado es un órgano filogenéticamente muy antiguo, apareció por primera vez en los celenterados (ej. anémonas), como un engrosamiento del endodermo en la región del primordio intestinal, el cual sirve para el metabolismo y almacenamiento de nutrientes (Popper, 1981).

Cuando los animales invadieron la tierra, el hígado se desarrolló internamente como un órgano al cual se le llama glándula del intestino medio. La falta de un medio acuático que facilitara el intercambio de nutrientes, provocó el desarrollo de mecanismos para mantener la homeostasis y la biotransformación de los nutrientes esenciales, además de una reacción inmunológica más sofisticada (Popper et al, 1988).

La estructura del hígado es variable, así como su composición celular y detalles estructurales que se han encontrado en diferentes especies de animales. En peces teleósteos, el hígado comprende también al páncreas (hepatopáncreas) y está alojado en el tracto portal, con pequeños acinos dentro de los ductos biliares. Esto no ocurre en los vertebrados superiores, donde el hígado y el páncreas son órganos separados de origen embrionario común; bajo ciertas condiciones el hígado tiene capacidad para formar tejido pancreático (Berk et al, 1984) y el

páncreas para dar lugar a hepatocitos (Rao et al, 1989), además de que las glándulas peribiliares del hígado humano comparten con el páncreas la secreción de amilasa y tripsina (Terada y Nakanuma, 1991).

El hígado es la glándula de mayor dimensión del cuerpo y constituye aproximadamente del 2% al 5% del peso corporal en el adulto y el 5% en los neonatos. Anatómicamente se distinguen dos lóbulos principales (izquierdo y derecho) y dos accesorios (cuadrado y caudado), de acuerdo a su adhesión peritoneal y a unas fisuras superficiales debidas a que el hígado está cubierto por una delgada cápsula de tejido conjuntivo (cápsula de Glisson) que penetra a la glándula y la divide en estos lóbulos. Sin embargo, se debe poner especial atención en la anatomía vascular funcional del hígado, ésta se encuentra dividida en sectores y segmentos, con un flujo aferente y eferente de sangre y canales biliares sin circulación colateral entre los segmentos.

La organización estructural del hígado refleja sus funciones, éste se interpone como un "guardián" entre el tracto digestivo y el resto del cuerpo. Debido a esta interposición, el hígado esta provisto de un aporte dual de sangre, ésta ingresa por la vena porta y la arteria hepática. Estos

canales importan una gran variedad de nutrientes internos y externos, así como de sustancias tóxicas provenientes del sistema digestivo. De tal forma que la principal función del hígado es la toma eficiente de aminoácidos, carbohidratos, lípidos y vitaminas, así como su posterior almacenamiento, conversión metabólica y liberación a la corriente sanguínea y bilis (Leeson et al, 1990).

La biotransformación consiste en convertir sustancias hidrofóbicas en detritos hidrosolubles, los cuales pueden excretarse por la bilis y la orina.

El hígado es considerado como una glándula endócrina por sus incontables funciones metabólicas y secreciones al flujo sanguíneo y a la vez como una glándula exócrina productora de bilis.

También, el hígado forma un sistema de defensa contra moléculas ajenas y partículas, así como de bacterias, ya que en los sinusoides ("capilares hepáticos") existen unos tipos celulares que son fagocíticos (Wisse et al, 1988); además, la estructura de esponja y la gran capacidad vascular que tiene el hígado sirven como un almacén y participan en la regulación del volumen de la sangre y su flujo a través del cuerpo.

La unidad estructural del hígado se conoce como lobulillo hepático, que al observarse al microscopio presenta una forma hexagonal en cualquiera que sea la dirección del corte histológico en el tejido, por lo que se deduce que el lobulillo hepático es polihédrico (Leeson, 1990).

Este lobulillo está formado por el parénquima hepático y presenta en el centro una vena central, y en los vértices del hexágono una rama de la vena porta, otra de la arteria hepática, un conducto biliar y uno o más vasos linfáticos incluidos en el tejido conjuntivo, a este conjunto de haces se le llama triada portal.

A través de la vena porta se recibe el 75% de la sangre la cual es rica en azúcares y aminoácidos, pero pobre en oxígeno, ya que éste llega al hígado por la sangre proveniente de la arteria hepática, que representa el 25% del total de la sangre que entra al hígado. Toda la sangre pasa por el parénquima a través de los sinusoides hasta la vena central que drena al hígado. El espacio sinusoidal es de mayor tamaño que el de los capilares (9 a 12 μm) y está rodeado por células endoteliales atípicas, y además no están

recubiertos por una membrana basal continua. En lugar de ello tienen una membrana basal con fenestraciones, a través de la cual hay un intercambio de macromoléculas entre el torrente sanguíneo y los hepatocitos, los cuales están alineados a lo largo del sinusoides en filas de un hepatocito de grosor. Al espacio que hay entre las células endoteliales y los hepatocitos se le conoce como espacio de Disse, en donde se encuentran componentes de la matriz extracelular (MEC) y otros tipos de células, como las células Kupffer, las I¹SC y en menor proporción las células Pit. Hacia el otro extremo de la fila de hepatocitos, se distingue otro espacio entre una fila de hepatocitos y otra, este espacio es el canalículo biliar (fig. 1).

Por lo que se ha mencionado, se pueden distinguir morfológica y funcionalmente tres áreas en la membrana plasmática del hepatocito: i) El dominio sinusoidal en contacto con el espacio de Disse e indirectamente con el flujo sanguíneo (37% de la superficie celular parenquimatosa); ii) El dominio celular o área de contacto hepatocito-hepatocito (50% de la superficie) y iii) El dominio de canalículo biliar o el polo secretor de la bilis (polo "apical") del hepatocito (13% de la superficie) (Weibel et al, 1969).

El dominio sinusoidal forma microvellosidades irregulares, lo cual incrementa el área de superficie de la célula para el intercambio con el fluido sanguíneo. Las microvellosidades están rodeadas por el fluido y componentes de la matriz del espacio de Disse y tienen fácil acceso al fluido sinusoidal debido a las peculiaridades que presentan las células sinusoidales (Kuper et al, 1994). Este dominio representa la frontera con un increíble tráfico de moléculas de la sangre sinusoidal. Es el sitio donde se transportan las moléculas a través de la bomba de sodio y múltiples transportadores. También se encuentran en esta membrana receptores de glicoproteínas, inmunoglobulina A, asialoglucoproteínas, varios péptidos, hormonas y factores de crecimiento, así como receptores de endocitosis (Nathanson y Boyer, 1991) y transmembranales como las integrinas, las cuales reconocen componentes específicos de la MEC como laminina, colágena y fibronectina (Volpes et al, 1991).

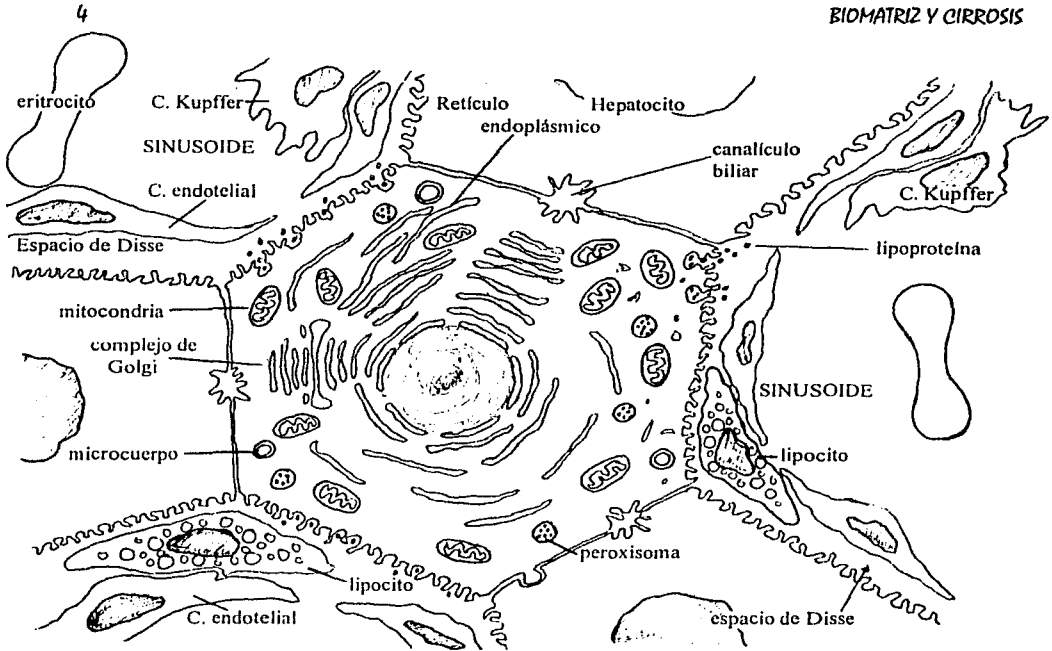


Figura 1. Esquema que muestra la estructura y organización de las células del hígado, se muestra el espacio de Disse y el sinusoides hepático.

Funciones

Las funciones del hígado son numerosas y esenciales para la homeostasis del organismo. Por comodidad se describen en tres principales apartados.

1.- Metabolismo de alimentos absorbidos.

i) Metabolismo de carbohidratos. Los azúcares solubles, principalmente glucosa, son llevados desde el intestino hasta el hígado por la vena porta. Al ingerir una comida rica en carbohidratos, la concentración de glucosa en la sangre que va al hígado es relativamente mayor y cuando la absorción se completa, el nivel de glucosa disminuye. Sin embargo, la concentración de glucosa en la circulación sanguínea permanece muy estable. Esto es debido a que el exceso de glucosa absorbida después de una comida se convierte en los hepatocitos en un polisacárido de almacenamiento llamado glucógeno. Este almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno es controlado por la insulina, la cual es

una hormona producida en los islotes de Lagerhans del páncreas y que facilita la entrada de la glucosa a las células como los hepatocitos, miocitos y adipocitos. Es igualmente importante la acción del glucagón en la regulación de los niveles de glucosa en la sangre, ya que esta hormona participa en el proceso de degradación del glucógeno cuando la concentración de glucosa sanguínea es baja (Alberts et al, 1994).

La glucosa presente en la circulación sanguínea es utilizada por los diferentes tejidos para su respiración, y es reemplazada periódicamente por la glucosa producida en el hígado a partir de la gluconeogénesis y la glucogenólisis. De esa forma es como el hígado regula la concentración de glucosa en la sangre, cada vez que la absorción de ésta varía en el intestino (Voet, 1995).

ii) Metabolismo de proteínas. A diferencia de los carbohidratos, las proteínas no se

almacenan en las células. Algunos aminoácidos provenientes del intestino pasan a través del hígado y entran a la poza de aminoácidos en la circulación sanguínea. Los aminoácidos son absorbidos por las células y usados para la síntesis de proteínas. Las células del hígado son sitios importantes para la síntesis de proteínas, produciendo las proteínas del plasma, de tal forma que una poza de proteínas se establece en la sangre. La síntesis de proteínas del plasma está balanceada por una degradación equitativa de éstas, las cuales tienen una vida media limitada dentro de la circulación. Las proteínas del plasma al final de su vida media, junto con el exceso de aminoácidos absorbidos del intestino, son desaminadas por los hepatocitos. La *desaminación* es la remoción del grupo amino y su conversión al ión amonio. El resto de moléculas ácidas entra al ciclo de Krebs y son usados para producir energía a través de la cadena respiratoria. El ión amonio es muy tóxico y entra a una secuencia de reacciones (ciclo de la urea) que lo convierten a urea la cual es menos tóxica (Voet, 1995). La urea es liberada a la circulación y es excretada por los riñones. Más de la mitad de los 20 aminoácidos utilizados para la síntesis de proteínas son no esenciales, éstos pueden ser producidos a partir de otros aminoácidos en el hígado por medio de una *transaminación*. Los hepatocitos contienen un número de enzimas transaminasas las cuales transfieren grupos amino de aminoácidos a ácidos carboxílicos, y así producen nuevos aminoácidos. Tales enzimas ayudan a los hepatocitos a producir una amplia variedad de aminoácidos, siempre que la dieta esté limitada de ellos.

iii) Metabolismo de lípidos. Las grasas y aceites absorbidos por el intestino pueden también almacenarse en el hígado. El hígado es el sitio principal de la síntesis y degradación de los fosfolípidos, y junto con la dieta, suministra al organismo los fosfolípidos plasmáticos, además el hígado participa en la movilización y excreción de éstos a través de la bilis. Las vitaminas liposolubles, tales como las vitaminas A y D, son almacenadas en el hígado por las células de Ito. El colesterol, un esteroide transportado por la sangre, se sintetiza y degrada en el hígado, y principalmente se utiliza para la síntesis de membranas celulares y en una variedad de hormonas esteroides (Alberts et al, 1994).

2.- Metabolismo de metales.

Algunas de las células del hígado presentes en los sinusoides son parte del sistema reticuloendotelial del hígado. Este sistema remueve partículas de detritus en la sangre. Las células Kupffer son células fagocíticas que remueven eritrocitos viejos de la sangre. Después que han sido endocitados, la hemoglobina se desdobra en dos partes; un complejo metaloglobulina y otro con su grupo hemo sin metal. Este último es entonces convertido a bilirrubina. La bilirrubina se combina con el ácido glucurónico para formar el pigmento biliar, el cual es excretado por la bilis. Cerca de 7-8 g. de hemoglobina son removidos de la sangre de esta forma diariamente.

Cualquier obstrucción física tales como cálculos biliares o un incremento en el rompimiento de las células rojas, resulta en un aumento en la concentración de la bilirrubina en la sangre y la piel toma un color amarillo (a esta condición se le llama ictericia). El complejo metaloglobulina es metabolizado después en el hígado, donde la globulina se degrada en aminoácidos, los cuales se usan para la síntesis de proteínas del plasma. El metal es retenido para la producción de hemoglobina fresca. La síntesis de hemoglobina y la producción de eritrocitos (eritropoiesis) se realiza en el hígado en el estado fetal y en los adultos se restringe a la médula ósea. El metal liberado del rompimiento de la hemoglobina se adhiere a una proteína del plasma llamada transferrina y es transportado en la sangre hasta la médula ósea. El exceso de metal se almacena en las células del hígado como ferritina y hemosiderina.

3.- Desintoxicación.

Muchas de las sustancias químicas que pasan por la sangre a través del hígado, son modificadas por este órgano. Estas sustancias incluyen a una variedad de hormonas; por ejemplo, gran parte de la insulina del páncreas se degrada por enzimas del hígado. Muchas hormonas sexuales son también inactivadas en el hígado y excretadas en la bilis o liberadas a la sangre y excretadas por el riñón. Otras sustancias químicas son destruidas por las células del hígado y otras se combinan con otros compuestos para dar lugar a otra menos tóxica; por ejemplo, el ácido benzocarboxílico, usado comúnmente como

preservador de alimentos, se une a la glicina para formar *N*-benzoilglicina la cual se excreta por la orina. Sin embargo, ciertas sustancias tales como el tetraclorometano, triclorometano, tetracloruro de carbono y el etanol dañan a las células del hígado (Popper, 1991; Lieber, 1994).

Dentro de sus límites, entonces, el hígado actúa como un filtro, removiendo sustancias tóxicas de la sangre, haciendo éstas menos peligrosas y preparándolas para su excreción.

Componentes celulares

El hígado se compone de cinco diferentes tipos celulares que ocupan cerca del 80% de su volumen (Wisse et al, 1988). El 20% restante es ocupado por espacios extracelulares y componentes de la matriz extracelular (MEC). De estos tipos celulares, los hepatocitos son los de mayor tamaño y los más abundantes, y ocupan del 50% al 60% del volumen total del hígado (Phillips et al, 1987) y constituyen las dos terceras partes del total de células del hígado, además el hepatocito es el encargado de realizar las principales funciones metabólicas del órgano.

Las otras cuatro clases de células son referidas como células no parénquimatosas o células sinusoidales. Estas son de menor tamaño y están en menor cantidad que las células parénquimatosas. De éstas, las células almacenadoras de grasa (Fat Storing Cells (FSC)) y de vitamina A, son conocidas también como células de Ito ó estelares (Wake et al, 1991). Se localizan en el espacio de Disse y se adhieren completamente a las células endoteliales, éstas últimas son fenestradas y el número y tamaño de sus fenestraciones varía con su localización en el sinusoides, así como de la composición de la matriz extracelular (McGuire et al, 1992).

Las células Kupffer y Pit son residentes normales del espacio sinusoidal, mientras que las células Kupffer se adhieren fuertemente a las células endoteliales y se necesitan métodos enzimáticos para separarlas. Las células Pit se asocian pobremente con las células endoteliales y no se requieren métodos enzimáticos para poder separarlas. Las células Kupffer (macrófagos residentes) son miembros del sistema retículo endotelial y las células Pit corresponden a una única clase de células "asesinas naturales" (natural

killer o NK) encontradas en el hígado (Kuiper et al, 1994).

El tejido conjuntivo del hígado ocupa un volumen relativamente pequeño del órgano. La concentración de los componentes de la matriz extracelular varía ampliamente en diferentes especies de animales. Mientras que en la rata la concentración de colágena es de 1mg/g de peso húmedo del hígado, en humanos representa 5mg/g del tejido. Muchos de los componentes del tejido se localizan en los espacios vasculares, tales como la triada portal y áreas perivenulares y en la cápsula de Glisson. Sin embargo una pequeña pero significativa cantidad se encuentra en el espacio sinusoidal y particularmente en el espacio de Disse (Martínez-Hernández, 1984; Martínez-Hernández et al, 1991).

Los espacios del hígado están ocupados en buena parte por la matriz extracelular, la que juega un papel importante en la fisiología del hígado, ya que presenta un medio utilizado por las células para obtener sus nutrientes y para liberar sus productos metabólicos, además de hacer posible la comunicación de las células con otras células y/o tejidos. Cuando uno de sus espacios se estrecha o desaparece como ocurre con el alargamiento de los hepatocitos o la capilarización del espacio de Disse respectivamente, la llegada y salida de sustancias, su volumen de distribución y la presión portal se modifican.

Otro componente del hígado que ha sido ignorado por muchos años es su innervación. Así, sus terminaciones adrenérgicas se encuentran en relación estrecha con las FSC, ya que estas células son altamente contráctiles y pueden regular el flujo sanguíneo portal. El papel de las terminaciones y los mediadores liberados necesitan ser más estudiados.

Componentes extracelulares (La matriz extracelular hepática)

La matriz extracelular del hígado se compone de al menos cinco distintos tipos genéticos de colágena, siete clases de proteínas no colagénicas y un número indeterminado de proteoglicanos y glicosaminoglicanos (Biagini y Ballardini, 1989; Bisell, 1992; Rojkind y Greenwel, 1994; tabla 1). La distribución y organización de la matriz extracelular del hígado es única. El

fenotipo de los hepatocitos (y quizá de otros tipos celulares del hígado) a lo largo del acino hepático es variable, debido a la migración y maduración de células primitivas del área porta al área de la vénula terminal (Sigal et al, 1992). Además, existe un patrón de migración de los hepatocitos a través del sinusoides relacionado con la cantidad y naturaleza de los componentes de la MEC depositados en el espacio de Disse (Reid et al, 1992). Otra particularidad es la presencia de una membrana basal no continua sino fenestrada entre los hepatocitos y las células endoteliales. Esta membrana se ha observado por microscopía electrónica dentro del espacio de Disse, como una membrana con pequeños agujeros e interrumpida (Martínez-Hernández, 1984). Estos componentes de la matriz extracelular son importantes para considerar la fisiología hepática y las anomalías que ocurren durante el desarrollo de la cirrosis hepática.

Tabla 1. Componentes de la matriz extracelular del hígado.

Colágenas:
Tipo I
Tipo III
Tipo IV
Tipo V
Tipo VI
Proteínas no colagénicas:
Fibronectina
Laminina
Entactina/nidógeno
Tenascina
Trombospondina
SPARC
Undulina
Proteoglicanos:
Asociados a membrana:
Sindecano
Trombomodulina
Betaglicano
Asociados con la MEC:
Versicano
Biglicano
Decorina
Fibromodulina
Perlecano

Colágenas.

Las colágenas representan una familia de proteínas que evolucionaron a partir de la duplicación de un gen ancestral y se han descrito más de 17 tipos diferentes de colágena (Burgerson y Nimni, 1992), cada una es un homotrímero o heterotrímero que forma una estructura de triple hélice con una gran tendencia a formar agregados supramoleculares (Fig. 2). Algunas colágenas como los tipos I, II, III, V y XI son fibrilares y forman estructuras rígidas. En general, estas colágenas son resistentes a la digestión proteolítica no específica, debido a su conformación de triple hélice. Por ello las colagenasas específicas son necesarias para su degradación y recambio (Birkedal-Hansen, 1995).

Sin embargo, los dominios globulares y no helicoidales localizados en los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminales o en algunos dominios donde la estructura de triple hélice se interrumpe, pueden ser degradados por proteasas. Otras colágenas tales como los tipos IV, VII y X son más sensibles que las colágenas fibrilares. En general éstas son menos abundantes y se localizan en la membrana basal de los grandes vasos sanguíneos del hígado y en menor proporción en el espacio de Disse (tipo IV).

Los tipos genéticos de colágena que se han identificado en el hígado normal son I, III, IV, V y VI. La cantidad y/o proporción de cada tipo de colágena es constante para una especie dada. La localización de cada tipo de colágena en el hígado normal ha sido investigada por microscopía inmunoelectrónica e inmunohistoquímica (Martínez-Hernández, 1984).

Varios tipos de células tienen la capacidad de producir uno o más tipos de colágena, según estudios realizados por hibridación *in situ* de RNAm (Weiner, 1990; Geerts et al, 1993; Milani, 1990).

Fibronectina.

La fibronectina es una proteína con múltiples dominios funcionales para unirse a células y proteínas de la MEC. Se compone de dos subunidades de 230 y 250 kDa unidas por enlaces disulfuro en el C terminal de las subunidades. La proteína es un producto de un solo gen y se pueden generar al menos 20 cadenas variantes por medio de un empalme alternativo (Schwarzbauer,

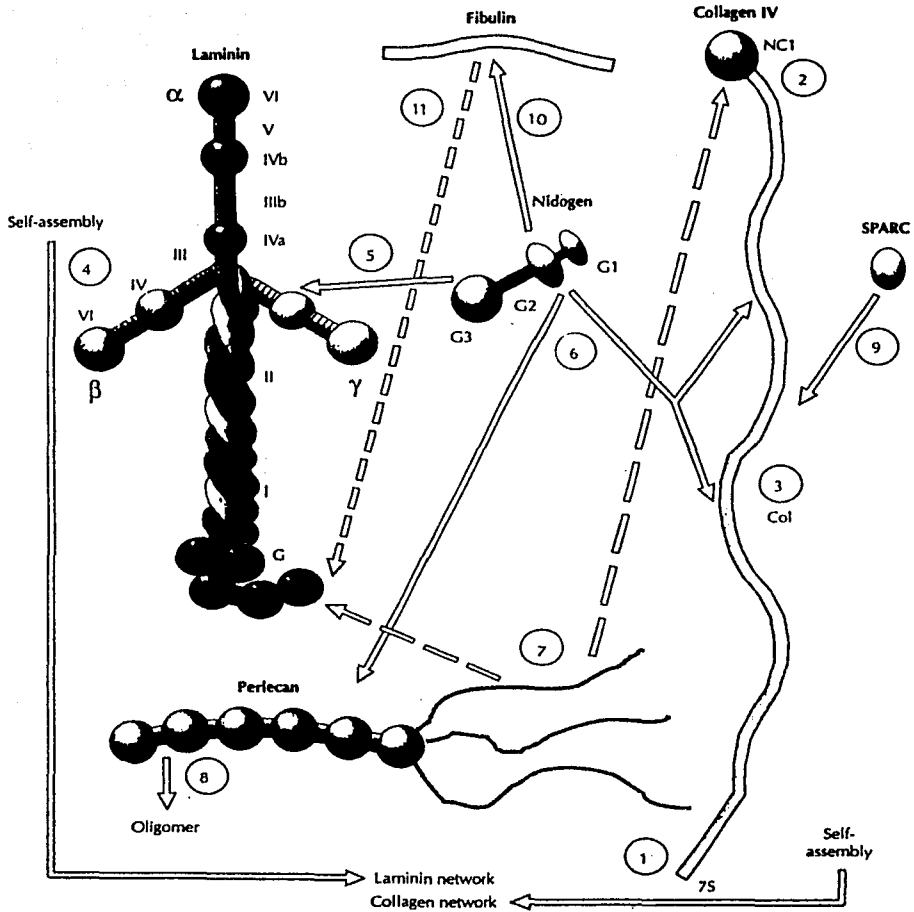


Figura 2. Interacciones que contribuyen en el ensamble y arquitectura de la membrana basal. Se muestra la estructura de algunas proteínas de la MEC así como sus relaciones para formar la membrana basal.

1991). El empalme del gen de la fibronectina se regula durante el desarrollo y el envejecimiento y aunque los mecanismos reguladores no se conocen, se ha sugerido que el TGF- β sea uno de los reguladores del empalme del gen de la fibronectina.

La fibronectina interacciona con múltiples receptores de la superficie celular perteneciente a la familia de las integrinas (Hynes, 1992), y con otros receptores llamados AGP-110, la fibronectina también se une a otros componentes de la MEC, como colágena, y con los proteoglicanos, tales como el sindecano.

Varias células del hígado producen y secretan fibronectina, sin embargo, al parecer los hepatocitos sólo producen fibronectina del plasma, aunque otros autores sugieren que también pueden producir fibronectina celular. El TGF- β aumenta la expresión de la fibronectina celular en las FSC en cultivo, mientras que el interferón γ inhibe su expresión (Ramadori, 1992). En la rata, la fibronectina es una proteína que se expresa después de un daño agudo al hígado, y su expresión en las FSC de este órgano es inducida por la interleucina-6.

Laminina.

La laminina representa una familia de proteínas multifuncionales de alto peso molecular y son las principales glicoproteínas de las membranas basales. La estructura básica de la laminina se derivó de proteínas extraídas del tumor Engelbert-Holmes-Swarm (laminina I) del ratón (Kleinman, 1982). Esta laminina tiene una masa molecular de 900 kDa y se compone de tres subunidades: $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\gamma 1$ de 400, 220 y 210 kDa respectivamente.

Se ha sugerido que algunas de las isoformas de la laminina pueden expresarse selectivamente en algunos tejidos. Los sinusoides contienen dos tipos distintos de laminina, ambos carecen de la cadena $\alpha 1$ (Ponce et al, 1995). Así, se ha determinado que las lamininas de los sinusoides hepáticos se componen de la laminina 2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) y la laminina 4 ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$). La cadena $\beta 2$ es una cadena de la laminina presente en hendiduras sinápticas de uniones neuromusculares y la isoforma de la cadena $\alpha 2$ se llama merosina y se encuentra en el músculo estriado y tiene un 40% de homología con la cadena $\alpha 1$. Sin embargo,

aunque la cadena $\alpha 2$ se encuentra en el hígado en desarrollo y regeneración, ésta no se ha identificado en el hígado de rata adulta.

La cadena $\alpha 1$ en el hígado está restringida a las membranas basales de los grandes vasos.

Por hibridación *in situ*, los transcritos de la cadena β se han detectado en células perisinusoidales, células epiteliales de los ductos biliares y vasculares, y células mesenquimatosas de áreas periportales, pero no se encontraron en hepatocitos (Milani, 1989). La expresión de la cadena β sólo ocurre en hepatocitos cultivados o en hepatocitos de hígados neonatos y en regeneración.

Las FSC recién aisladas expresan el mRNA de la cadena β , pero las FSC recién sembradas solo expresan el mRNA de la cadena γ y a los cinco días de cultivo expresan ambas cadenas y también expresan una variante de la cadena α de la laminina de 385 kDa.

Además, la laminina es una de las proteínas más importantes para la adhesión del hepatocito y se une a otras moléculas de la membrana basal como la colágena tipo IV y el sulfato de heparán.

Entactina/nidógeno.

La entactina es una glicoproteína sulfatada de 158 kDa presente en la membrana basal, su estructura es muy preservada y comparte el 85% de homología entre la entactina humana y de ratón. Es muy sensible a la digestión proteolítica de serina proteasas y por la matrilisina (metaloproteasa de la matriz) (Paulsson et al, 1986).

El nidógeno es una proteína de 80 kDa que se une a la entactina y forma el complejo entactina/nidógeno. En el hígado, la entactina/nidógeno se localiza en el espacio de Disse y muestra una distribución similar a la laminina. Las FSC y las células endoteliales sinusoidales producen la entactina/nidógeno (Clement et al, 1992).

La entactina/nidógeno interacciona estrechamente con la laminina y forman un complejo, la interacción se realiza a través del C terminal del dominio globular de la entactina/nidógeno y el interior de un dominio de uno de los brazos cortos de la laminina.

Tenascina.

Es una proteína de alto peso molecular (≈ 1000 kDa) sintetizada por varias células mesenquimatosas. Se compone de seis subunidades idénticas o muy similares, de 200-280 kDa, unidas por enlaces disulfuro.

Se piensa que la tenascina puede desempeñar un papel importante en la proliferación y migración celular, ya que la tenascina inhibe la adhesión y extensión de las células sobre fibronectina y disminuye los sitios de adhesión focal de células endoteliales (Murphy-Ullrich, 1991).

La tenascina es mitogénica para algunas células, aunque el mecanismo de la inducción de la proliferación se desconoce. La tenascina se une al sindecano, sin embargo, su afinidad varía con el origen celular del proteoglicano, debido a las diferencias en las cadenas de los GAG. Esta interacción puede modificarse cuando se presenta alguna enfermedad, ya que la IL-1 y un vasopresor como la angiotensina II pueden inducir la expresión de la tenascina, la cuál se produce principalmente por las FSC (Van Eyken, 1992).

Trombospondina (TSP).

Esta proteína es codificada por 4 genes diferentes. Tiene múltiples sitios de unión a células, componentes de la MEC y enzimas. La TSP1 interacciona con las colágenas, laminina, fibronectina y proteoglicanos con heparán sulfato y con las integrinas $\alpha_5\beta_1$ de la superficie celular por medio de su región RGDA (Bornstein, 1992).

Los genes de la TSP se expresan diferencialmente en varios tejidos. Mientras que las TSP1 son un componente importante en las plaquetas, las TSP3 se expresan principalmente en el pulmón y las TSP4 en el músculo cardíaco y esquelético. La síntesis de TSP es inducida por el suero, FGF, TGF- β , PDGF, angiotensina II y ácido retinoico, pero su expresión es inhibida por la IL-1.

La TSP tiene propiedades antiadhesivas y reduce la formación de uniones focales en células endoteliales y fibroblastos, y también inhibe la extensión de células. La TSP también se une a citocinas y factores de crecimiento, y además puede servir como sitio de almacenamiento de TGF- β , es un inhibidor de enzimas proteolíticas y promueve el crecimiento de neuritas.

En el hígado, la TSP se encuentra en el espacio de Disse y en el tejido conjuntivo alrededor de los grandes vasos. Se piensa que las células endoteliales sinusoidales y las células Kupffer producen TSP. Los miofibroblastos derivados de cultivos de FSC también producen esta proteína (Rieder et al, 1992).

Proteína Ácida Secretada y Rica en Cisteína (SPARC).

También se le conoce como *osteonectina*, es un componente de la MEC de 33 kDa, se divide en 4 dominios distintos de los cuales el segundo dominio es rico en cisteína, el primero se localiza en el N-terminal y el cuarto en el C-terminal y además en ese dominio se une el calcio (Engel et al, 1987).

In vivo la SPARC se encuentra en hueso y cartilago, pero su expresión es baja en tejidos adultos, sin embargo, la producción de SPARC se incrementa después de algún daño. La SPARC, junto con la tenascina y la TSP forman el grupo de moléculas antiadhesivas. Esta molécula tiene dos sitios relacionados con la inhibición de la extensión de las células, *in vitro* inhiben la adhesión de las células por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} .

La SPARC induce la expresión del activador-inhibidor del plasminógeno, colagenasas tipo I y IV, estromelinas, FGF, TNF- α e inhibe la expresión de componentes de la MEC como fibronectina y TSP1. El TGF- β induce la expresión de SPARC e interesantemente la SPARC inhibe la expresión de TGF- β , como un mecanismo de regulación negativa.

La localización de la SPARC en el hígado no se conoce, pero se ha observado que puede ser producida por las FSC en cultivo (Prizell et al, 1990).

Undulina.

Es una glicoproteína de aproximadamente 1000 kDa con tres subunidades de 270, 190 y 180 kDa. En el hígado se encuentra en el estroma de los espacios porta, en las ramificaciones vasculares y en el espacio de Disse. Se localiza en áreas carentes de tenascina por lo que se piensa que estas proteínas se regulan mutuamente. La undulina puede servir como conector de las fibras de colágena maduras y es producida por las FSC y

las células endoteliales pero no por hepatocitos y células de Kupffer (Knittel et al, 1992).

Proteoglicanos y Glicosaminoglicanos.

Los GAG son polímeros polianiónicos no ramificados, constituidos por unidades de disacáridos repetitivos que se componen de un aminoazúcar y un residuo de ácido urónico. Sus nombres varían dependiendo si el azúcar es galactosamina ó glucosamina y de la naturaleza del ácido urónico. Además varían de acuerdo al grado de sulfatación y a la localización de los enlaces éster sulfatados. El sulfato de heparán es el GAG más abundante del hígado y constituye cerca del 60% del total de los GAG. Excepto por el ácido hialurónico, todos los GAG se unen a proteínas para constituir a los proteoglicanos (PG) y se ha demostrado que la región de unión es similar en la mayoría de los proteoglicanos (Kjellen y Lindahl, 1991).

Los PG son proteínas que contienen una o más cadenas de GAG unidos covalentemente a la proteína núcleo. Existe una gran diversidad de proteínas núcleo, algunas pertenecientes a familias con dominios preservados (ej. sindecano) y otras derivadas del empalme alternativo de un gen (ej. perlecano).

Algunos de los PG son componentes integrales de la membrana plasmática, otros están asociados a la superficie celular y otros son parte de la MEC. Algunos PG se encuentran almacenados intracelularmente en gránulos de secreción (ej. seriglicina). Los PG juegan un papel importante en la comunicación célula-célula y célula-matriz y sirven como una vasta área de almacenamiento para algunas citocinas y factores de crecimiento (Ruoslahti y Yamaguchi, 1991). Cuando se unen estos factores de crecimiento y citocinas, se modifican sus tasas de síntesis y/o degradación, así como se inhiben o estimulan sus actividades biológicas. Algunos PG de la superficie celular son moléculas receptoras y participan en la internalización de lipoproteínas como lipasa o agentes infecciosos como el virus del *Herpes simplex*. En otros casos son correceptores necesarios para la interacción estable de factores de crecimiento con sus receptores de superficie celular específicos. También, pueden estabilizar la unión de componentes de la MEC tales como la fibronectina con integrina, y debido

a su carácter polianiónico, los PG son altamente hidratados y pueden crear espacios en los cuales, algunas moléculas puedan concentrarse o diluirse. El cierre o creación de espacios hidratados, puede ser un sistema excelente para la entrega o exclusión eficiente de citocinas a las células.

Los PG están ampliamente distribuidos en muchos tejidos, son polimórficos debido a las diferencias de los tejidos y células específicas, en el número y longitud de cadenas, grado de sulfatación y tipo de cadenas de GAG que se unen a la proteína núcleo.

Proteoglicanos asociados a membrana.

Los principales PG de esta clase son miembros de la familia del sindecano, como la trombomodulina, betaglicano (receptor de TGF- β III) y CD-44. Todos ellos tienen un dominio transmembranal en su proteína núcleo. Sin embargo, algunos de estos PG se unen a los fosfolípidos de la membrana, y se requiere de la digestión con fosfolipasa C (específica para el fosfatidilinositol) para su liberación. En algunas ocasiones los PG se asocian a componentes de la membrana por medio de sus cadenas de GAG (Bernfield et al, 1992).

El GAG más común de este tipo de PG es el heparán sulfato, que es el más negativamente cargado de todos los GAG. Sin embargo, estos tipos de PG también contienen cantidades variables de condroitín sulfato. La cantidad de GAG determina, en parte, el tipo de ligando de unión. Así, una de las propiedades más importantes del heparán sulfato es la de unirse a diversos componentes de la MEC, factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular e inhibidores de proteasas. La unión ocurre por medio de interacciones electrostáticas entre el SO_4^- (cargado negativamente) del GAG y los aminoácidos básicos en las proteínas. Las proteínas unidas al heparán sulfato sufren un cambio conformacional importante que puede disminuir o aumentar su actividad biológica.

Proteoglicanos asociados a la MEC.

Pertencen a varias clases que incluyen PG de alto peso molecular como el agregano y el versicano, a los PG de bajo peso molecular como el biglicano, decorina y fibromodulina y el proteoglicano asociado a membrana basal de alto

peso molecular y gran contenido de heparán sulfato llamado *perlecano* (Rescan et al, 1993). Mientras que el agregano se expresa predominantemente en cartilago, el versicano es producido por fibroblastos y tiene una distribución más amplia en los tejidos. Sin embargo, se ha propuesto recientemente que las células del hígado pueden producir una molécula parecida al agregano (Krull y Gressner, 1992).

El papel de la matriz extracelular

El concepto clásico que se tenía de la MEC, proponía que era una especie de "cementante" inerte que le servía a las células como andamio para sostenerlas mientras éstas desempeñaban sus funciones. Pero recientemente se ha demostrado que la MEC tiene funciones más importantes que la mera función estructural y que tampoco se trata de un sistema inerte.

Así, la MEC participa en procesos como la migración, comunicación, proliferación y diferenciación celular. Además, la MEC es un sistema dinámico, donde sus componentes están en continuo recambio, dicho recambio está determinado por la velocidad de síntesis y degradación de sus componentes, y se ha observado que diferentes células producen uno o varios tipos particulares de componentes de la MEC (tabla 2). Las enzimas que remodelan la estructura de la matriz son las metaloproteasas, estas enzimas pueden regularse a nivel de transcripción o bien controlando su actividad proteolítica. En los tejidos existen inhibidores de esta actividad como son los inhibidores tisulares específicos de metaloproteasas (TIMPs) (Matrisian, 1990).

Por otro lado, las moléculas de la MEC y algunos de los productos de su degradación, tienen la capacidad de enviar señales a las células. También, en la MEC, se encuentran interaccionando otras moléculas como hormonas, enzimas y citocinas. De esta forma, se puede decir que la MEC también participa en la modulación del fenotipo celular, ya que algunos de sus componentes pueden inducir la síntesis de proteínas

de funciones específicas ó inducen la proliferación celular (Bucher et al, 1990).

Tabla 2. Componentes de la MEC sintetizados por células del hígado normal.

Hepatocitos:

Colágenas tipo I^a y III.
Fibronectina (plasmática y celular)
Laminina (mRNA de la cadena $\beta 2$)

Células almacenadoras de grasa (FSC):

Colágenas tipo I (sólo miofibroblastos), III y IV.
Laminina (mRNA de las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$).

Tenascina (sólo miofibroblastos)
Fibronectina (sólo miofibroblastos)
Entactina
Undulina

Células endoteliales:

Colágena tipo IV
Entactina
Trombospondina

*Aunque los hepatocitos expresan el mRNA de la procolágena $\alpha 1(I)$, existe la controversia de que éstos jueguen un papel importante en el depósito de colágena en hígado normal.

Interacción célula-matriz extracelular

Las células se relacionan con la MEC y por medio de ésta pueden comunicarse con otras células y percibir señales del medio que les rodea. Con esto podemos retomar lo dicho por Alexis Carrel en 1931, acerca de que "las células están en una continuidad fisiológica con su entorno". "Una célula depende estrictamente de su medio, tanto como el núcleo depende del citoplasma para su existencia". De tal forma, las células obtienen de la matriz extracelular la tracción necesaria para migrar, soporte y mantenimiento estructural, recibir señales a partir de ella y de los factores de crecimiento y hormonas unidas a la matriz, de las que obtienen la información del estado en que se encuentra el medio que les rodea, manteniéndose la homeostasis del organismo.

La unión de las células a la MEC, está mediada por receptores presentes en la superficie de la membrana plasmática. La principal clase de estos receptores es una familia de proteínas transmembranales conocidas como *integrinas*.

Las integrinas se componen de una subunidad α y otra subunidad β . Las subunidades α y β se unen entre sí no covalentemente, y esta asociación es promovida por cationes divalentes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} (Ruoslahti, 1991; Fig. 6).

Existen 13 subunidades α y 8 subunidades β conocidas, las cuales se combinan para formar al menos 19 tipos de integrinas, las cuales se agrupan en tres subfamilias, las que comparten la subunidad β_1 , α_V y β_2 (Ruoslahti et al, 1994; Fig. 6). Las integrinas que comparten la subunidad β_1 incluyen a mucho receptores de la MEC y la segunda subfamilia comparte la subunidad α_V . Los receptores de la tercer subfamilia comparten la subunidad β_2 que principalmente son moléculas de adhesión célula-célula en leucocitos. Debido a su diversidad, las integrinas reconocen diferentes sitios de unión en las proteínas de la MEC, de los cuales el mejor estudiado es el sitio RGD (Ruoslahti y Pierschbacher, 1987).

Los hepatocitos son el tipo celular del hígado mayormente estudiado con respecto a sus propiedades adhesivas. Se adhieren a fibronectina, colágenas y laminina, mientras que las integrinas identificadas en el hepatocito incluyen al menos a las $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$, las cuales tienen especificidad por ligandos de la MEC.

Los efectos generados por la MEC y por los factores de crecimiento unidos a ella, son seguramente regulados por las integrinas. Se sabe que el dominio citoplásmico de la subunidad β de las integrinas interacciona con componentes del citoesqueleto. Así, una vez que la integrina se une a su ligando (ej. Fn), estas se agregan rápidamente y se produce una interacción con varias proteínas asociadas al citoesqueleto como la talina, α actinina, tensina, y una o más cinasas que inician la fosforilación de tirosinas que da como resultado la acumulación de otras proteínas asociadas al citoesqueleto (F-actina, paxilina) y disparan una cascada de señales complejas (ej. ERK, señales extracelulares reguladas por cinasas; FAK, cinasas de adhesiones focales y JNK, Jun cinasas) (Yamada y Miyamoto, 1995).

Unas de las moléculas de la membrana celular y de la MEC a las que se unen los factores de crecimiento, son los proteoglicanos. Las cargas negativas de los PG, les confiere la capacidad de unir muchas sustancias, incluyendo algunos

factores de crecimiento, sin embargo, la carga no es el único mecanismo de unión.

La unión del IGF a heparina o a cadenas de heparán sulfato de los PG parece que protege al IGF de su degradación. Estas interacciones del factor de crecimiento-PG, comúnmente son mediados por los GAG de los PG. Sin embargo, se sabe que al menos el TGF- β se une a la proteína núcleo del PG, como en el caso de la decorina y el biglicano, así la decorina puede neutralizar el efecto del TGF- β . De esa forma, el TGF- β estimula la síntesis de la decorina y ésta regula la actividad del TGF- β . Por otro lado el betaglicano puede unir TGF- β y almacenarlo en la MEC.

El TGF- β puede jugar un papel muy importante en el desarrollo de enfermedades fibrosantes, ya que el estimula la síntesis de la MEC, y se ha mostrado que la actividad del TGF- β puede ser la responsable de importantes enfermedades fibrosantes como la cirrosis (Matsuoka y Tsukamoto, 1990; Czaja et al, 1989). El TGF- β inicia un complejo proceso de reparación, incluyendo el depósito de la MEC, la disminución de la degradación de la matriz y un incremento de la expresión de las integrinas. Sin embargo, esta actividad puede ser crucial para el desarrollo de cicatrización y fibrosis en condiciones crónicas y progresivas que llevan a su vez a la destrucción de la estructura del tejido. Además, evidencias correlativas sugieren que la sobreproducción del TGF- β es un factor patológico tanto en cirrosis hepática como en fibrosis pulmonar, fibrosis cardíaca después de infartos, cicatrización desordenada y fibrosis en ojo y piel, mielofibrosis, entre otras. Recientemente las nefropatías de diabéticos ha sido añadida a esta lista de enfermedades.

CIRROSIS HEPÁTICA

La cirrosis hepática es una enfermedad crónica caracterizada por un daño general, formación de nódulos de regeneración y fibrosis que distorsiona la arquitectura del hígado. Aunado a las alteraciones anatómicas están los trastornos funcionales y hemodinámicos

(Greenwel et al, 1994). La cirrosis es el resultado de la incapacidad del sistema ecológico del hígado para restaurar la homeostasis que ha sido alterada por alguno(s) de los principales agentes biológicos o químicos, conocidos por inducir un daño hepático. Los agentes causantes de este desequilibrio pueden ser biológicos; como son las infecciones virales (hepatitis) o parasitarias (esquistosomiasis). También puede ser ocasionada por agentes químicos, como es el abuso en el consumo de alcohol. Estas son las principales causas, aunque existen una gran diversidad de ellas, entre las que se encuentran factores hereditarios.

El alcoholismo es la principal causa de cirrosis en México y otros países, está dentro de las 10 primeras causas de muerte en personas mayores de 15 años. El abuso en su consumo afecta principalmente al hígado (Díaz de León et al, 1986), el cual es responsable de su oxidación a través de tres sistemas enzimáticos presentes en los hepatocitos (Lieber, 1994.). En estos sistemas el etanol se oxida a acetaldehído, el cual es de 10 a 30 veces más tóxico, además de que activa al promotor del gen de la cadena $\alpha_2(I)$ de la colágena (Moshage et al, 1990; Parés et al, 1994).

Como es característico en un sistema, dentro de ciertos límites, la distribución y cantidad de todos sus elementos parece permanecer constante y en un equilibrio dinámico. Para mantener la homeostasis, los factores producidos en el hígado y quizá otros de origen endócrino retenidos por componentes de la MEC del hígado, regulan la proliferación celular y la producción de la MEC. Sin embargo, el fino mecanismo regulador necesario para mantener el sistema, se produce dentro del órgano. Esto es el resultado de las múltiples interacciones establecidas entre varios tipos de células del hígado y también por las interacciones de las células con componentes de la MEC. Cuando alguno de estos mecanismos reguladores se altera, el organismo intenta recuperar la homeostasis y produce una serie de factores de crecimiento y citocinas. Estos pueden ser los mismos que se producen normalmente en el hígado, y/o pueden incluir una serie de mediadores que son producidos solo en respuesta a un daño y los cuales aumentan las actividades biológicas del proceso reparativo (Burt, 1993; Friedman, 1993).

Fibrogénesis Hepática

El proceso de la fibrogénesis puede dividirse en varios pasos (Greenwel, 1994). El primero corresponde a la respuesta muy temprana del tejido a un agente dañino que trae como consecuencia la degradación de la MEC por enzimas lisosomales liberadas por células dañadas o por el mismo agente causal. El siguiente paso se conoce como la respuesta del huésped al daño que resulta en la activación de las células Kupffer y, el posterior reclutamiento de las células inflamatorias. El tercer paso corresponde a un proceso intermediario caracterizado por la producción de citocinas y factores de crecimiento por células Kupffer activadas y células inflamatorias, por la activación de las FSC y su transformación a MYF (Friedman, 1993), y por la producción excesiva de componentes de la MEC. El paso final corresponde a la maduración de la cicatriz, de tal forma que las cicatrices viejas contienen únicamente fibras de colágena y son acelulares.

Alteraciones de la MEC

La matriz extracelular está bajo constante remodelación, sin embargo, en la cirrosis el grado de biosíntesis de la matriz puede sobrepasar a la degradación, llevando a un depósito en exceso de la MEC. Una aparente falta de la actividad colagenolítica solo se observa en los últimos estados de la enfermedad, cuando las bandas de las fibras son acelulares y las células que producen y degradan la matriz han involucionado o desaparecido. La composición de la MEC en la cirrosis ha sido objeto de numerosos estudios bioquímicos. Estos estudios han demostrado que en el hígado humano normal, el 4% de la proteína total es colágena; el 53% de la colágena intersticial es colágena tipo I y el 47% es tipo III. Los cambios de estas proporciones en la cirrosis resultan en el incremento del contenido de la colágena total a 10% del total de proteína, con el 75% de colágena tipo I y solo 25% de colágena III. El hígado normal de rata contiene menos colágena que el hígado humano, con solo 0.5% del total de esta proteína, pero en la cirrosis inducida con CCl_4 , se incrementa a 2% del total de la proteína (Martínez-Hernández, 1985). La colágena intersticial en el hígado de rata normal es 60% tipo I y 40% tipo III, sin embargo en la cirrosis inducida con CCl_4 no se

han apreciado cambios de esta relación. En los últimos estados de la enfermedad, cuando el hígado contiene más de 15 mg de colágena por gramo de tejido la colágena predominante es tipo I.

Varios datos cualitativos indican que la fibronectina, laminina, undulina y tenascina se incrementan en el hígado cirrótico. Sin embargo, no existe información de que la trombospondina que se expresa en el hígado normal se exprese en hígado cirrótico. Además, estudios recientes han demostrado que durante la cirrosis existe un aumento en la expresión del mRNA de proteoglicanos como decorina, biglicano, lumicano y agrecano (Krull, 1992).

En la tabla 3 se resumen de los cambios de la colágena en la cirrosis, mientras que en la tabla 4 se presentan los cambios cualitativos de otros componentes de la MEC.

En resumen, tanto los datos cualitativos y cuantitativos indican, con pocas excepciones, que todos los componentes de la MEC se incrementan en la cirrosis hepática.

Se sabe que la fibronectina puede actuar como un organizador de la MEC, y al parecer, en un daño agudo los hepatocitos incrementan su síntesis y secreción, y parte de ésta se deposita en el espacio de Disse. Si el daño es crónico, los hepatocitos continúan depositando fibronectina y posteriormente colágena tipo I (Martínez-Hernández, 1985).

Los hepatocitos normales son células epiteliales que no se separan del plasma por una membrana basal continua; ellos se separan del plasma solo por una pobre y discontinua MEC. Al parecer, esta falta de una barrera de filtración facilita el rápido intercambio de macromoléculas entre el plasma y los hepatocitos, la cual es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis normal. Durante el desarrollo de la cirrosis

Tabla 3. Distribución y fuentes celulares de varios tipos de colágena en el hígado cirrótico.¹

Localización	Fuente celular	
Colágena tipo I	Principal componente extracelular del hígado cirrótico; abundante en los espacios de Disse y septos fibrosos que rodean nódulos de regeneración de hepatocitos.	FSC, células endoteliales.
Colágena tipo III	Como en colágena tipo I.	FSC, hepatocitos, células endoteliales.
Colágena tipo IV	Incremento del depósito en el espacio de Disse, formando una verdadera membrana basal conteniendo también laminina; los sinusoides se transforman en capilares.	FSC, células endoteliales, células estromáticas del tracto portal y alrededor de la vena central.
Colágena tipo V	Incremento en hígados que contienen más de 20 mg/g tej. de colágena; presente en septos fibrosos, tractos portales y barrera sinusoidal.	Células endoteliales? ^a
Colágena tipo VI	Asociada con otras colágenas en tractos portales y septos fibrosos.	FSC y células endoteliales ^a

^a datos obtenidos por métodos inmunohistoquímicos.

¹ Tomada de: Greenwel P, et al. *Liver fibrosis*. En: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. *The Liver: biology and pathobiology*, 3th ed. New York: Raven Press, 1994; pag 1369.

ocurren profundos cambios en la estructura del espacio de Disse. En los últimos estadios del hígado graso, el depósito de la colágena tipo IV se incrementa y, ocasionalmente, el depósito continuo de la laminina aparece en el espacio de Disse. El depósito de varios componentes de la membrana basal a lo largo de la pared sinusoidal culmina con la formación de una membrana basal vascular completa (Martínez-Hernández, 1985) la cual contiene, al menos, colágena IV, laminina y perlecano. Este depósito de la membrana basal puede tener la función de proteger a los hepatocitos del agente dañino (el cual se encuentra en el flujo sanguíneo), pero con la valiosa pérdida del intercambio de macromoléculas presentes en la sangre a las cuales el hepatocito metaboliza para transformarlas, almacenarlas, exportarlas, secretarlas, degradarlas etc, dando como resultado

que el hepatocito no pueda cumplir sus funciones y no tenga un medio adecuado para sobrevivir (figura 3).

Alteraciones Celulares

El depósito excesivo de la colágena en el hígado es el resultado de la síntesis activa por varios tipos de células (fig.4). Evidencias de muchos laboratorios indican que en condiciones normales todos los tipos de células del hígado producen uno o varios componentes de la MEC, excepto las células Pit (tabla 2). Además, las células Kupffer y la FSC producen colagenasas, estromelisin y TIMP's. Sin embargo, la principal célula que interviene en la producción de la colágena tipo I ante una alteración es la FSC (Weiner et al, 1992).

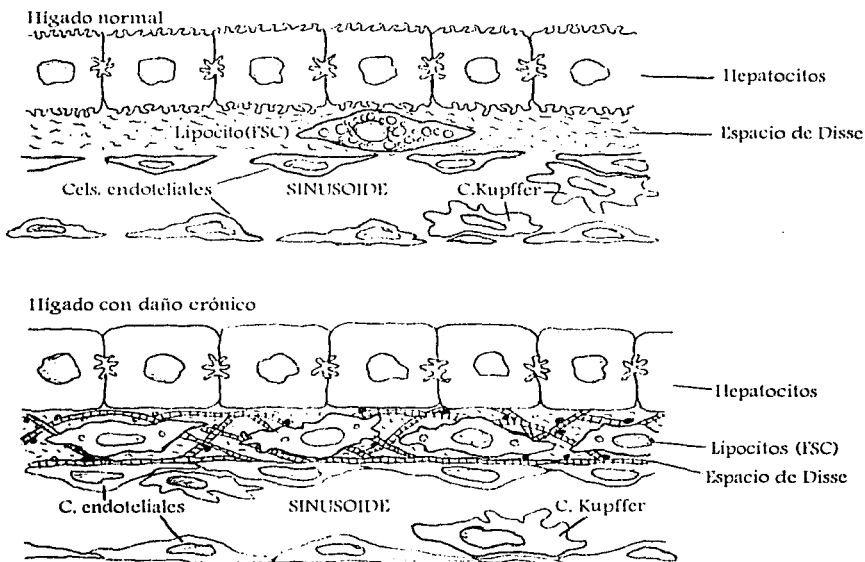


Figura 3. Cambios en el espacio de Disse durante un daño fibrosante.

Las alteraciones celulares y de la matriz extracelular en el espacio de Disse son puntos claves en la patogénesis de la fibrosis hepática. La activación de los lipocitos, caracterizada por la pérdida de vitamina A, proliferación y fibrogénesis, está asociada con el reemplazo de una matriz normal de baja densidad, por una matriz de alta densidad. Con ello se pierden las fenestraciones de la membrana basal y las microvellosidades de los hepatocitos.

Tabla 4. Distribución y fuentes celulares de varios componentes no colagénicos de la MEC en hígados cirróticos.*

	Localización	Fuente celular
Fibronectina	Abundante en la interfase entre septos fibrosos y hepatocitos; presente en el espacio de Disse.	FSC, hepatocitos y células endoteliales.
Laminina	La misma distribución que la colágena tipo IV dentro del lóbulo hepático; abundante en el espacio de Disse y membrana basal sinusoidal.	FSC, células endoteliales y del ducto biliar.
Tenascina	Se acumula preferencialmente en interfases parenquimatosas del tejido conjuntivo tales como los septos fibrosos, ausente en septos maduros; presente en áreas de necrosis.	FSC y células endoteliales.
Undulina	Presente en áreas dañadas, cicatrices y sinusoides; patrón similar al de la fibronectina.	FSC y células endoteliales.
Agrecano	Su producción se incrementa en hígado cirrótico, particularmente entre los septos y nódulos de regeneración.	células Kupffer.
Biglicano	Presente en septos fibrosos.	FSC.
Decorina	Detectada solo después de la transición al estado de inflamación crónica en células no parenquimatosas de los campos periportales y en los septos en formación; en hígado cirrótico, su expresión sólo es detectada en campos periportales con un aumento en los ductos biliares.	FSC.

* Esta información se resumió de diferentes artículos, en los cuales fueron utilizadas técnicas inmunohistoquímicas e hibridación *in situ*.

El resumen de los componentes de la MEC producidos por diversas fuentes celulares se presentan en la tabla 3 y 4; y de las células que producen enzimas que degradan la MEC y/o sus inhibidores se presentan en la tabla 5.

Existe la controversia acerca de que los hepatocitos juegan un papel importante en el depósito de la colágena tipo I. Así, existen reportes de estudios en cultivo e *in vivo* que sugieren que los hepatocitos producen colágena, tanto en hígados normales como cirróticos (Diegelmann et al, 1983; Chojkier, 1986 y 1988). Pero, por otro

lado, estudios realizados en cultivos muestran que la síntesis de la colágena se debe principalmente a los lipocitos (FSC) (Maher, Bissell, Friedman y Roll 1988). Existen datos más recientes obtenidos por hibridación *in situ* que muestran la poca contribución de los hepatocitos a la producción de colágena en hígados normales y cirróticos (Geerts et al, 1993). Sin embargo, no se puede negar una cooperación entre los hepatocitos y las células de Ito (FSC) en el depósito de la MEC (Loréal et al, 1993).

Tabla 5. Enzimas proteolíticas producidas por células del hígado.

Colagenasa tipo I
Colagenasa tipo IV (72 kDa)
Colagenasa tipo IV (95 kDa)
Estromelisin
Colagenasa tipo I
Colagenasa tipo IV (95 kDa)
Estromelisin
Colagenasa tipo I ?

* Estas células producen el TIMP-1 y la α_2 macroglobulina, dos inhibidores de colagenasas.

Otros estudios muestran que las FSC son el tipo celular más importante en el desarrollo de la fibrosis. Con ello se ha planteado un modelo que explica la activación de las FSC, el cuál ha sido caracterizado y se muestra en la figura 5. Esta activación ocurre en, al menos, dos estadios (Friedman, 1993).

La iniciación se caracteriza por un alargamiento celular, la expresión de la α -actina de músculo liso y la inducción de receptores de citocinas, el estímulo inicial puede incluir factores (no caracterizados) parácrinos de células Kupffer, hepatocitos o ambos. En la iniciación puede ocurrir la destrucción temprana de la matriz extracelular por medio de la secreción de colagenasa tipo IV por las células FSC, llevando a un reemplazo eventual con fibrillas de colágena.

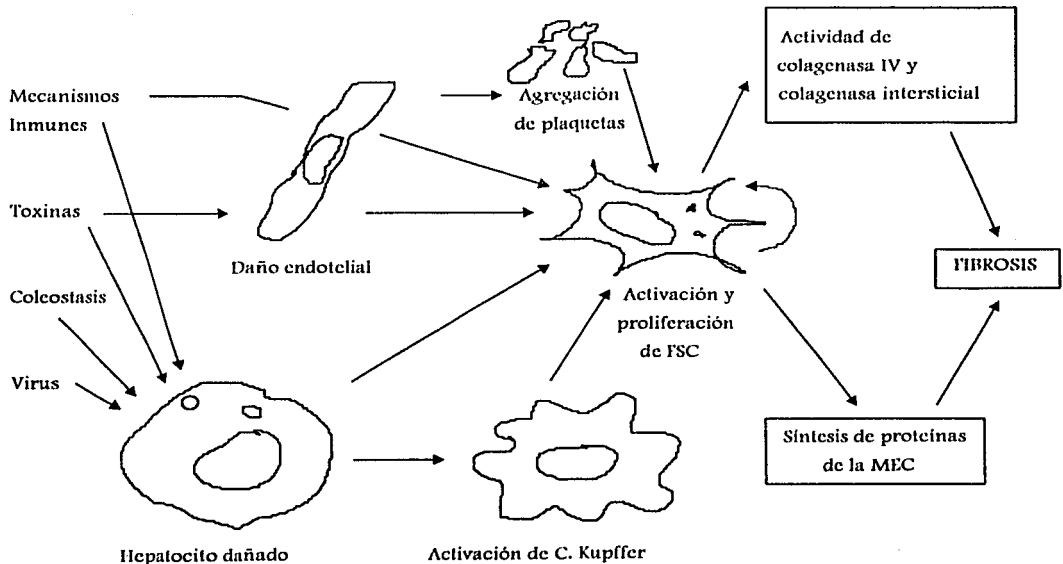


Figura 4. Diagrama de las interacciones celulares propuestas en la fibrogenesis hepática.

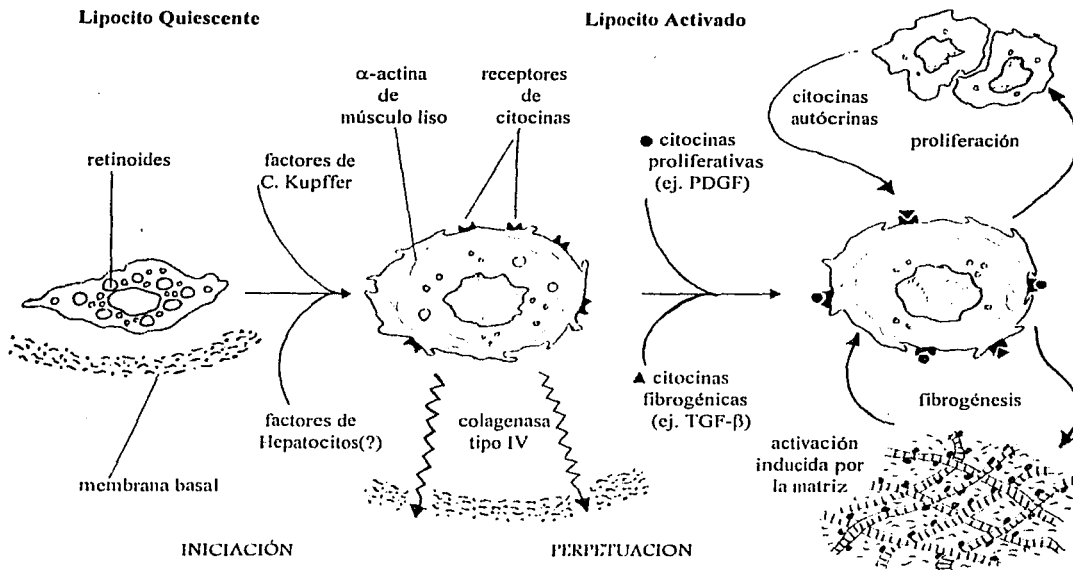


Figura 5. Modelo de la activación del lipocito (FSC).

Como se ha visto, cuando ocurre un daño al hígado suceden cambios en el medio extracelular y en los componentes celulares (estos cambios pueden observarse en la figura 3). Se observan alteraciones celulares y de la matriz en el espacio de Disse los cuales son puntos críticos en la patogénesis de la fibrosis hepática. La activación de la FSC, caracterizada por su proliferación y un incremento de la fibrogénesis se asocia con el reemplazo de la matriz de baja densidad por una matriz de alta densidad. Estas alteraciones, aparentemente, conducen a la pérdida de las fenestraciones endoteliales y de las microvellosidades de los hepatocitos a causa de un daño crónico al hígado.

Terapéuticas y fármacos en el tratamiento de la cirrosis

Las terapias diseñadas para disminuir la fibrosis hepática tienen que interferir

específicamente con la producción y acumulación de proteínas del tejido conjuntivo hepático, por lo que se han desarrollado terapias que incluyen fármacos que intervienen inhibiendo la síntesis o secreción de colágena, hasta las propuestas de la utilización de terapias génicas (Chojkier y Brenner, 1988).

Dentro de los fármacos que inhiben la síntesis de colágena se incluyen los corticoesteroides, péptidos de procolágena, ésteres de forbol, TNF- α , ácido retinoico, interferón- γ , agonistas β -adrenérgicos, prostaglandinas, AMPc e ionóforos de calcio. Los mecanismos de acción de algunos de estos agentes se desconocen, pero de otros se piensa que actúan a través de segundos mensajeros como el AMPc, proteínas cinasas C activadas y la movilización de calcio citoplasmático.

Se han diseñado estrategias para interferir con las modificaciones postraduccionales de la

cadena α de la colágena. Así, se sabe que el 2-oxoglutarato es un costrato de las prolil y lisil hidroxilasas. También, en la interferencia con el entrecruzamiento de la colágena se ha ensayado con el uso de inhibidores de la carboxipeptidasa, de tal forma que se induce la acumulación de moléculas de procarboxicolágenas, las cuales forman fibrillas que son más susceptibles a la degradación por colagenasas tisulares.

La secreción de colágena requiere de la integridad y funcionalidad del sistema de microtubulos, este proceso puede inhibirse con el uso de la colchicina, que resulta en una disminución en el depósito de colágena (Rojkind y Kershenobich, 1975). Sin embargo, se ha encontrado que las dosis terapéuticas de la colchicina coinciden con las dosis tóxicas; además, se ha observado que se acumula en diferentes órganos y tejidos corporales. Estos problemas, al parecer, son superados por el Mebendazol, un fármaco antimicrotubular con 10^3 veces mayor afinidad por la tubulina que la colchicina (Soto et al, 1996), el cual es metabolizado principalmente en el hígado y no se acumula en otros tejidos. Además, se ha probado que el mebendazol interfiere en la movilización intracelular de proteínas, resultando en una disminución de la secreción y depósito de proteínas de la MEC por los fibroblastos, que son los principales productores de la MEC.

Otro mecanismo para regular el depósito excesivo de colágena es induciendo un aumento de la actividad colagenolítica. La síntesis de

colagenasas es inducida por ésteres de forbol, PDGF, TNF- α e IL-1.

Se ha propuesto que la introducción y expresión de DNA exógeno puede inhibir la síntesis de colágena hepática. Tanto los propéptidos amino-terminal y carboxilo-terminal de la colágena, disminuyen los niveles del mRNA de procolágena y la traducción de éste a proteínas (Paglia et al, 1979; Wu et al, 1986). Como se mencionó, se ha propuesto la inactivación funcional del mRNA de procolágena por medio de la hibridación con un RNA "antisentido" del mensajero, esta cadena doble posteriormente se degrada en la célula y se reduce la síntesis de colágena. Estas últimas propuestas sólo son teóricas, y se desconoce qué efectos secundarios puedan generar, además no se ha establecido en que forma se pudieran desarrollar.

Por último, se conoce que la sobreproducción del TGF- β es un factor patológico en muchas enfermedades fibróticas como la cirrosis hepática. Por ello, recientemente se ha tomado ventaja de la capacidad de la decorina para bloquear la acción del TGF- β al interaccionar este factor de crecimiento con la proteína núcleo del PG (Yamaguchi et al, 1990), esto se ha demostrado en patologías como la glomerulonefritis. Como una proteína natural que forma parte de la MEC, la decorina es más confiable en terapéuticas que el uso de anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β .

II. ANTECEDENTES.

Inducción de cirrosis en ratas por CCl_4 , como modelo experimental

Este es el método más usado para la inducción de la cirrosis en ratas. Se ha demostrado que el CCl_4 es un hepatotóxico fuerte y es metabólicamente reducido por el citocromo P-450 a radicales triclorometilo como un intermediario reactivo (Murray 1984). También los niveles de citocromo P-450 (principal componente del sistema de oxidación) se ven disminuidos por la

acción de este compuesto. Por otro lado, provoca la peroxidación de lípidos que trae como consecuencia el daño de la membrana lisosomal con la consecuente liberación de enzimas hidrolíticas, originando finalmente un daño celular.

En ratas tratadas con CCl_4 y BrCCl_3 , se generan aldehídos que se unen a proteínas microsomales reduciendo su actividad catalítica. Además, como ya se mencionó, se ha determinado que el acetaldehído (que es un metabolito del

etanol), induce la transcripción del mRNA de la cadena $\alpha 2(I)$ y $\alpha 1(III)$ de la colágena.

Panduro et al (1988) analizaron la transcripción de los genes para albúmina, α -fetoproteína (AFP) y colágena en ratas cirróticas a diferentes tiempos, durante el desarrollo de la fibrosis. Ellos realizaron mediciones basales de los coeficientes de transcripción de albúmina/AFP en ratas normales y observaron una disminución de éste con un estímulo agudo con el CCl₄. Esto indica una capacidad regenerativa del hígado. Sin embargo, al final del tratamiento con este compuesto, los niveles de transcripción de AFP fueron poco detectables. Esto sugiere que la posibilidad de una respuesta molecular a un estímulo regenerativo en el hígado cirrótico es poco probable cuando el daño ya es avanzado.

Aislamiento y cultivos primarios de hepatocitos sobre diferentes sustratos

Gran parte de las evidencias experimentales de los efectos de la MEC sobre el crecimiento del hígado y la expresión genética de los tejidos, se han desarrollado a partir de los estudios de células en cultivo, distinguiéndose diversas respuestas celulares cuando las células se cultivan en matrices de órganos quiescentes, regenerantes o de hígado fetal.

El uso de cultivos celulares permite controlar el número de variables que pueden interferir en los procesos específicos que se pretenden investigar (Berry et al, 1991). Anteriormente, las células en cultivo sembradas sobre plástico y alimentadas con medio con suero se comportaban similarmente a como se comportan ante un daño, pero recientemente se ha podido librar este problema con la aparición de los medios hormonalmente definidos (MHD), que asemejan el ambiente y el metabolismo celular que normalmente se presentan *in vivo*.

Se asume que los hepatocitos en cultivo deben ser alimentados con medio (mezcla de sales, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, etc.) complementado con suero, ya que las células parenquimáticas están rodeadas de un endotelio fenestrado y, además se exponen directamente a la sangre. Asumir esto puede ser falso, ya que la única vez que las células del hígado tendrían contacto con el suero es en casos de un daño

agudo o crónico, resultado de la modificación del flujo de la sangre y liberación de varios factores de crecimiento. De tal forma, cultivar células en medio con suero nos daría una respuesta muy similar a un daño como lo es una fibrosis ó cirrosis (Brill et al, 1994).

Cuando los tejidos se disgregan y las células son sembradas por primera vez *in vitro*, los cultivos se conocen como *cultivos primarios* (Freshney, 1987), éstos retienen funciones específicas por más de cinco días cuando las células recién aisladas son sembradas en sustratos como plástico, que consiste de cajas de poliestireno expuestas a radiaciones para generar una superficie cargada negativamente que permite a las células adherirse por interacción de cargas.

El desarrollo de cultivos por largos periodos, depende del tipo de matriz que se use, en combinación con el medio definido (Enat et al, 1984).

Para utilizar una matriz como sustrato uno puede: i) Presentar las condiciones que induzcan la síntesis de componentes apropiados de la matriz, ii) presentar componentes purificados de la matriz, iii) el uso de extractos de tejidos enriquecidos en matriz extracelular y iv) se han probado cocultivos de hepatocitos con fibroblastos, células endoteliales y ESC.

Bajo condiciones estándares, los cultivos de hepatocitos sobre plástico tienden a formar una estructura escamosa y parecen ser más traslúcidos y granulares, y rápidamente pierden su retículo endoplásmico rugoso. La alteración morfológica es acompañada por una disminución de sus funciones bioquímicas y pierden la capacidad de expresar varios genes específicos del hígado, por ejemplo la transcripción del gen de la albúmina se reduce (DiPersio et al, 1991). Esto resulta en una pérdida de todas las funciones específicas del tejido entre los 3-5 días y a la semana empiezan a perder la viabilidad. Por otro lado, los cultivos de hepatocitos de rata recién nacida sembrados sobre plástico, sí retienen sus funciones diferenciadas, se reorganizan y depositan biomatriz (Landry et al, 1985).

Sin embargo, los primeros esfuerzos de Michalopoulos, Pitot y otros al sembrar hepatocitos sobre un gel de colágena I, resultó en una prolongada viabilidad (más de un mes) y con la expresión de células diferenciadas por 2 a 3

semanas, pero estos cultivos sufrían un proceso de fetalización (Sirica et al, 1979). Cuando los hepatocitos se siembran en cajas cubiertas con colágena seca, éstos presentan una forma cuboidal, no proliferan y tienen un patrón de expresión genética muy similar a un hígado quiescente (Acosta, 1994). La utilización de un sustrato de colágena IV resulta en un cultivo muy escamoso, las células proliferan rápidamente y tienen un patrón de expresión genética muy similar a un hígado en regeneración (Sawada et al, 1986). Por otro lado, cuando se siembran sobre un sustrato de fibronectina ó laminina se ayuda a una mejor adhesión y un período de vida en cultivo más grande, además estas proteínas facilitan la proliferación (Carlsson et al, 1981).

Los GAG y los PG pueden promover o inhibir la proliferación celular, dependiendo del tipo de célula y el tipo de GAG. Además, cuando alguno de estos componentes de la MEC, como el heparán sulfato se agregan a hepatocitos cultivados sobre plástico, éstos recuperan parcialmente su capacidad para transcribir algunos genes específicos del hígado (Fujita et al, 1987).

Otro modelo de cultivo se ha establecido con un gel (matrigel) que es extraído del tumor EHS, este gel contiene principalmente componentes de la MEC, laminina ($\approx 90\%$) con algo de colágena IV, entactina y heparán sulfato (Kleinman et al, 1982). Además, también se encuentran factores no propios de la MEC, como ácidos nucleicos, muchas proteínas del citoesqueleto y varios factores de crecimiento como el TGF- β .

En estudios realizados por varios investigadores se ha mostrado que las rutas de transcripción y la abundancia de los mRNA para muchos de los genes específicos del hígado en células cultivadas en matrigel son muy cercanos a los niveles expresados en células de hígado normal (Bissell, 1987). Esto parece deberse a que las matrices inducen la agregación celular en altas densidades en cuales las células forman pequeños agregados esféricos y parecen producir una matriz químicamente similar a la de un hígado quiescente. Clayton et al (1985) postulan que algunos tipos de contacto célula-célula son esenciales para la transcripción, ya que han encontrado que la disociación de las células del

hígado en suspensión resulta en la pérdida de la síntesis de los mRNA para todos los genes específicos del tejido.

Cuando los hepatocitos se cultivan sobre un extracto de matriz extracelular ("Biomatriz") del hígado y se alimentan con un MHD, se ha observado que sobreviven por más de seis meses (Rojkind et al, 1980). Estos cultivos mantenidos en la biomatriz tienen un grado inicial de diferenciación similar al de los cultivos sobre colágena I. Sin embargo, después de 6-7 días presentan una diferenciación casi reestablecida de un hígado normal y permanecen así en todo el período del cultivo. Este reestablecimiento se asume que se debe a la producción de los componentes de la matriz por las células y su estabilización adjunta a las células por la biomatriz. Por otro lado, se ha encontrado que la adhesión de los hepatocitos a la biomatriz es principalmente a través de la laminina y dicha unión es dependiente de Mg^{++} y Mn^{++} e independiente de insulina y Ca^{++} (Ponce et al, 1995).

Como se ha mencionado, al sembrar las células sobre un tipo particular de colágena puede determinar su respuesta a algún tipo de hormona específico. Así, los cultivos primarios sembrados sobre colágena I o III muestran una proliferación muy limitada siempre que se les suministre un MHD que ayude a la proliferación celular en cultivos de plástico o sobre colágena tipo IV (Sawada et al, 1986). Los mecanismos por los cuales un tipo específico de colágena permite o no la respuesta a una hormona en particular se desconoce, pero se asume que influye, al menos en parte, la estabilización de esta matriz de colágena por otras moléculas de la matriz (ej. PGs), que se piensa son las señales de regulación críticas. Además, diferentes tipos de colágena son sintetizados y ensamblados con distintos componentes de la matriz.

Se han desarrollado procedimientos alternativos para tratar de mantener la expresión genética específica del hígado utilizando hepatocitos en cultivo. Estas consisten en preparar cocultivos con otro tipo de células epiteliales, posiblemente derivadas del canal de Hering, o el uso de capas alimentadoras de fibroblastos irradiados en las cuales los hepatocitos son sembrados (Kuri y Mendoza, 1989). A pesar de

ello, las funciones específicas del hígado son parcialmente restablecidas mediante estos procedimientos, ya que no se reconstruye la organización celular normal ni ocurren las interacciones célula-matriz observadas en el tejido intacto. Otro tipo de cocultivo es el desarrollado con FSC, los cuales retienen algunas funciones particulares del hígado por al menos dos semanas (Greenwel, 1993). Estos cocultivos se han utilizado para el estudio en la expresión de componentes de

la matriz extracelular y el papel del daño de los hepatocitos en la producción de colágena por las FSC (Loreal et al, 1993). Los hepatocitos en este tipo de cultivo están polarizados, son más pequeños que los hepatocitos sembrados sobre plástico, mantienen una forma cuboidal y tienen una tendencia a formar cordones. Además, las FSC en las cuales se sembraron inicialmente, se retraen y dejan espacios que asemejan sinusoides (Rojkind et al, 1995).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La biomatriz hepática se compone principalmente de proteínas y otras moléculas de la matriz extracelular, por lo que los componentes de una biomatriz obtenida de un hígado normal y de uno cirrótico, pueden reflejar, en parte, el estado del entorno en el que se encuentran los hepatocitos en condiciones normales y como respuesta ante un daño. A su vez, al cultivarse los hepatocitos obtenidos de ratas normales y cirróticas sobre los dos tipos de biomatrices, pueden responder de manera diferencial en cuanto a su sobrevivencia y funciones diferenciadas.

Para realizar este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

*Identificar cuantitativa y cualitativamente algunos de los componentes de las biomatrices obtenidas de hígados de ratas normales y cirróticas, tales como proteínas colagénicas, no colagénicas y glicosaminoglicanos, con el fin de caracterizar dichas biomatrices y comparar estos resultados con los obtenidos del tejido fresco.

*Conocer el comportamiento de los hepatocitos (de ratas normales y cirróticas) en cultivos primarios, sembrados sobre las biomatrices (de ratas normales y cirróticas) para poder establecer cuál es el efecto que tienen estas biomatrices sobre el metabolismo de los hepatocitos en cultivo.

Objetivos particulares:

-Cuantificar la proteína total y colagénica, así como los glicosaminoglicanos del tejido fresco y de las biomatrices obtenidas de ratas normales y cirróticas.

-Cuantificar el DNA de los tejidos normales y cirróticos.

-Determinar el cambio en las proporciones de los componentes de la biomatriz (colágena tipo I y III, laminina y fibronectina) en las biomatrices obtenidas de ratas normales y cirróticas.

-Identificar los tipos de glicosaminoglicanos presentes en los tejidos y biomatrices normales y cirróticas.

-Comparar la morfología de biomatrices (de hígados normales y cirróticos), que sirven como sustrato para los cultivos.

-Establecer los cultivos primarios de hepatocitos sobre las biomatrices (de hígados normales y cirróticos) realizando cultivos homólogos y heterólogos.

-De los cultivos establecidos, determinar la adhesión y viabilidad de los hepatocitos a diferentes tiempos, y analizar la morfología de los cultivos y de los hepatocitos, a diferentes tiempos en cultivo.

-Analizar la secreción de albúmina en los diferentes cultivos como un parámetro del estado diferenciado de las células.

IV. MATERIALES

El material biológico para el desarrollo de este trabajo consistió de ratas machos de la cepa Wistar de seis semanas de edad y aproximadamente 100 g de peso, las cuales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Todos los reactivos químicos empleados se obtuvieron de diferentes fuentes comerciales y del mayor grado de pureza. El EDTA, el fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF), la N-etilmaleimida (NEM), la pepstatina, el piruvato de sodio, el NADH, el desoxicolato de sodio, la DNAasa y RNAasa, las colagenasas IV y VII, la pepsina, la ASB, la L-prolina y la L-hidroxi-prolina y los

medios DMEM se adquirieron de Sigma Chem. Corp., la cloramina T, el p-dimetilbenzaldehído, el CCl_4 y todos los reactivos de uso frecuente como ácidos y sales se obtuvieron de Merck y J.T. Baker respectivamente; La acrilamida y la N-N'-metileno-bisacrilamida, el dodecil sulfato de sodio (SDS), el persulfato de amonio, el azul brillante de Coomassie G-250 y R-250, el TEMED, el ditiotricitoil (DTT) fueron de Bio-Rad Laboratories. Los anticuerpos policlonales contra albúmina de rata se obtuvieron de Chemicom; las membranas y las placas de acetato de celulosa se adquirieron de Helena Laboratories y las placas para cultivo de 6 y 12 pozos de Costar.

V. MÉTODOS

A) Inducción de cirrosis:

Para realizar este trabajo se les indujo cirrosis a ratas Wistar machos de seis semanas de edad, con 10 inyecciones (3 cada semana) intraperitoneales con 0.2 ml de una dilución de tetracloruro de carbono 1:7 en aceite de olivo (Rojkind y Díaz de León, 1970). También se trabajó paralelamente con ratas macho Wistar sin tratamiento, hasta que tuvieron nueve y media semanas de edad y con ello se obtuvieron ratas normales y cirróticas de la misma edad.

B) Obtención del hígado.

Cada rata se pesó previamente a la anestesia con cloroformo, y después se disectó y se obtuvo el hígado, éste se perfundió con PBS a 4° C (para limpiarlo de sangre) y se pesó. Se separó el lóbulo mayor y también se pesó. El lóbulo mayor se guardó en una solución con inhibidores de proteasas (EDTA 4 mM, PMSF 5 mM, NEM 5 mM y pepstatina 1 µg/ml) y se congeló. Una parte de las muestras se homogeneizó y se congeló a -20° C para posteriores pruebas bioquímicas.

C) Obtención de la biomatriz y homogenados:

La obtención de la biomatriz se realizó de acuerdo al método de Rojkind et al (1980) con algunas modificaciones.

El lóbulo mayor del hígado se fragmentó y se homogeneizó con un sonicador, empleando una solución con inhibidores de proteasas a 4° C. Posteriormente se filtró el homogenado en una malla (organza) y se colectaron las fibras retenidas en la malla. Las fibras se lavaron tres veces, en agitación, con la solución de inhibidores de proteasas y posteriormente en NaCl 1 M por una hora c/u a 4° C, hasta que la solución se aclaró.

Después se deslipidizaron las fibras colocándolas en desoxicolato de sodio al 1% en agitación, a temperatura ambiente por una hora y se revisó la muestra con aceite rojo para ver si había lípidos todavía; cuando la muestra se limpió de lípidos entonces se lavó con NaCl 1 M y posteriormente se colocó en medio sin suero (aproximadamente 30-50 ml/100 g de material inicial, con 1.0 mg de DNAasa y 5 mg de RNAasa) y se agitó 1 h a 37° C, luego se observó si

quedaban residuos de ácidos nucleicos revisando con naranja de acridina al 0.3%.

Por último se recogieron las fibras en 250 ml de agua destilada y se lavaron tres veces (1h c/u) con un último lavado con PBS e inhibidores de proteasas durante toda la noche a 4° C. Las fibras se liofilizaron y se guardaron en congelación a -20° C.

D) Cuantificación de colágena total:

Se colocaron muestras de aproximadamente 100 mg de tejido y 10 mg de biomatriz en ampollitas de vidrio y se deshidrataron a 100°C en una mufla por 72 h, para tener un peso constante. Las muestras se hidrolizaron con 2 ml de HCl 6 N sellando las ampollitas al vacío e incubándolas a 100°C por 48 h. Los hidrolizados se filtraron y se evaporaron a sequedad, para después resuspendierlos en 2 ml de agua bidestilada ajustando a pH 7. La OH-Pro se determinó por los métodos colorimétricos de Woesner, para ello se tomaron alícuotas de 25 µl, 50 µl y 100 µl y se llevaron a 2 ml con agua bidestilada. Entonces se adicionó 1 ml de cloramina T 0.05 M, se agitó e incubó a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente se agregó 1 ml de HClO₄ 3.15 M se agitó e incubó a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente se agregó 1 ml de p-dimetilaminobenzaldehído 20% agitando fuertemente y se calentó a 60°C por 20 min, se dejó enfriar y se determinó la absorbencia a 557 nm. Paralelamente se desarrolló una curva estándar de OH-Pro 10 µg/ml, tomándose volúmenes correspondientes a 2.0, 4.0, 6.0 8.0 y 10 µg. La concentración de la colágena se obtuvo multiplicando por 7.42 la cantidad de hidróxiprolina determinada. Este factor se empleó asumiendo que la colágena posee 13.45% de este aminoácido, los resultados se expresaron en mg de colágena/gts (gramo de tejido seco).

E) Cuantificación de proteína total:

La cuantificación de proteína total se realizó por medio de la determinación cuantitativa de prolina y se empleó el método colorimétrico de Troll y Lindsley (1955).

De los tejidos y biomatrices hidrolizados anteriormente se tomaron diferentes alícuotas y se llevaron a 1.5 ml con agua bidestilada. Se adicionaron 1.5 ml de ácido acético y 1.5 ml de

solución de ninhidrina (1.25 g de ninhidrina + 30 ml de CH₃COOH + 20 ml de H₃PO₄ 6 N) a cada tubo. Se agitaron los tubos e incubaron a ebullición en baño maría por 60 min. Se enfriaron los tubos y se determinó la absorbencia a 515 nm. Paralelamente con cada grupo de determinaciones se desarrolló una curva estándar de prolina con una solución de 1 µmol/ml, tomándose volúmenes correspondientes a 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 µmoles.

F) Cuantificación de DNA:

Para la cuantificación de DNA se utilizó la técnica establecida por Labarca y Paigen (1989). Para ello se tomaron alícuotas de homogenado (1 g de tejido/10 ml) de hígado para tener varias diluciones. De estas diluciones se tomaron 200 µl y se le agregaron 2.8 ml de amortiguador (Na₂PO₄ 0.05 M, NaCl 2.0 M pH 7.4) incluyendo 3 µg del reactivo de Hoechst 33258. Se preparó el blanco de reactivo y contra éste se leyó en un fluorómetro Perkin Elmer a 360 nm de excitación y 460 de emisión. Se utilizó una sensibilidad de 10 unidades (12 es el máximo) y el ensayo se realizó a dos diferentes grados del selector 1X para las muestras más concentradas y que no pueden ser leídas en 10X. La curva estándar de DNA se realizó con 100 ng, 500 ng, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg y 5 µg.

G) Extracción y cuantificación de GAG:

La extracción de GAG en los tejidos y en la biomatriz se realizó según el método de Kao J. et al (1990). Para ello se tomaron 10 ml de homogenado (1g tejido/10 ml) y 10 ml de la biomatriz (0.1g biomatriz/10 ml). Las muestras se incubaron a 50°C durante 24 h con pronasa (10mg/ml), posteriormente se centrifugó a 13000g por 20 min. Se agregó 1 ml de NaOH 3M al sobrenadante y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Al otro día se añadió TCA 50% cbp 5% final a 0°C 1 h para después centrifugar a 13000g 20 min. Entonces se dializó el sobrenadante contra agua bidestilada a 4°C durante un día con varios cambios de agua. Se añadieron tres volúmenes de acetato de potasio al 1.4% en etanol, se agitó y se mantuvo a -20°C durante 24 h y al otro día se centrifugó a 100000g en la ultracentrífuga Beckman (rotor SW27) a 0°C por 1 h. Se resuspendió el botón en 0.3 ml de agua

y después de 2 horas se añadieron 0.9 ml de acetato de potasio 1.4% y se dejó toda la noche a -20°C. Por último se centrifugaron las muestras a 13000g a 4°C 15 min. tres veces para lavar el botón y los botones se resuspendieron en 100 µl de Tris-HCl 10mM pH 7.5.

Para cuantificar los GAG, se empleó el método de Bartold y Page (1985). Se marcaron cuadros de 2 cm² en membranas de acetato de celulosa y se colocaron 20 µl de muestra (0.5 a 1.0 mg GAG/ml) en cada cuadro. Entonces se sumergieron las membranas en una solución de azul de alciano 0.02%, MgCl₂ 0.05M, acetato de sodio 0.025M, etanol 50% v/v con agua; durante 30 min a temperatura ambiente (paralelamente se preparó una curva patrón de condroitin sulfato de 0.05 a 1.0 mg/ml). Las membranas se destiñeron con una solución de MgCl₂ 0.05M, acetato de sodio 0.025M, en etanol 50% v/v con agua, con tres cambios cada 15 min. Se dejaron secar las membranas, se cortaron los cuadros y se disolvieron en 2 ml de DMSO (los cuadros sin aplicación de muestra se usaron como blancos) y se determinó la absorbencia a 678 nm.

I) Identificación de proteínas en la biomatriz:

Digestiones enzimáticas:

Se hicieron digestiones con pepsina para identificar las proteínas colagénicas y digestiones con colagenasa para identificar proteínas no colagénicas. Para las digestiones con pepsina se incubaron 3 mg de biomatriz en 1 ml de ácido acético 0.5M con 3 mg de pepsina durante 24 h a 4°C, se precipitó con NaCl 2M y después se resuspendió en ácido acético 0.5M y se dializó contra ácido acético 5mM. Para la digestión con colagenasa se disolvieron 3 mg de biomatriz en 1 ml de ácido acético 0.5M y se dializaron contra un amortiguador de Tris-HCl 0.15M, CaCl₂ 5mM pH 7.4. Después se hizo la digestión con colagenasa VII a 35°C durante 24 h.

Electroforesis (SDS-PAGE)

La identificación de proteínas de la biomatriz se realizó mediante geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio como lo indica Laemmli (1970). Se utilizaron geles al 6% para proteínas colagénicas y al 5% para proteínas como la fibronectina y laminina.

Para identificar las colágenas tipo I y III, se hicieron reducciones retardadas según la técnica de Sykes et al (1976).

I) Identificación de GAG:

Electroforesis en placas de acetato de celulosa:

Se realizaron mediante la técnica de Hopwood y Harrison (1981). Para ello se humedeció la placa de acetato de celulosa en un amortiguador de acetato de bario 0.1M pH 5 y se pusieron las muestras con un multiaplicador a 1.5 cm del borde de la placa. Entonces se colocó la placa con las muestras orientadas hacia el cátodo, se llenó el tanque de la cámara con un amortiguador de acetato de bario 1M pH 5 y se colocaron los puentes de papel filtro previamente humedecidos en este amortiguador. Se cerró la cámara con una tapa que hace presión de 1kg y se inició la corrida a 200v durante 5 min; después se sumergió la placa en amortiguador de acetato de bario 0.1M pH 5 con 15% de etanol por 2 min y se reinició la corrida a 200v durante 30 min. Se colocó la placa en el mismo amortiguador pero ahora con 50% de etanol durante 2 min y se volvió a someter la placa a 200v por 10 min. Por último se tiñó la placa con azul de alciano 0.25% 15 min y destiñó con ácido acético 0.18M, se lavó con agua destilada y se dejó secar.

J) Preparación de la biomatriz como sustrato para cultivo:

Se preparó una solución de 1mg de biomatriz/ml en ácido acético 0.5M y se dializó contra ácido acético 5 mM. Se usaron placas para cultivo de 6 y/o 12 pozos de 9.5 y 4 cm² respectivamente, y al momento de cubrirlas con la biomatriz, ésta se sonicó durante 2 min para homogeneizar la solución, ya que la biomatriz es muy insoluble. Una vez sonicada la solución se cubrieron las cajas con diferentes concentraciones de la biomatriz (1, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µg/cm²) y se dejaron secar a temperatura ambiente en condiciones estériles. Las placas ya cubiertas se esterilizaron por medio de irradiación y en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). También se cubrieron placas con colágena seca con 10 µg/cm² como control.

K) Aislamiento de hepatocitos:

La obtención de hepatocitos tanto de rata normal como cirrótica se basó en el método descrito por Berry y Friend (1969 y 1991), modificado por Acosta (1994). Los animales con 24 h de ayuno se anestesiaron con cloroformo. Se realizó una laparotomía amplia en condiciones asépticas para localizar la vena porta, la cual se canuló con una cánula de látex. La perfusión se inició pasando una solución de TD salino (dextrosa 5.5 mM, NaCl 137 mM, KCl 50 mM, Na₂HPO₄ 0.4 mM, Tris-HCl 25 mM, rojo fenol 0.001%; pH 7.3) a 37°C durante 5 min a una velocidad de ≈15 ml/min y simultáneamente se cortó la vena cava superior para lavar el hígado. Posteriormente se escindió el hígado y se pasó una solución de colagenasa (1 mg/ml) durante 10 min. Al término de la perfusión se colocó el hígado en una caja de petri estéril. En condiciones de esterilidad, se añadieron 40-50 ml de MEM completo, agitando suavemente el hígado para facilitar el desprendimiento de los hepatocitos; la suspensión celular se filtró a través de una malla de organza, recolectándose en un tubo cónico. Las células se dejaron sedimentar por gravedad durante 3-5 min, se retiró el sobrenadante y se añadió MEM completo (con 10% de suero).

L) Cultivo de hepatocitos:

Se tomaron muestras del aislamiento de hepatocitos para determinar su viabilidad, utilizando el criterio de la exclusión del azul tripano. En todos los experimentos la viabilidad de los hepatocitos al momento de sembrar fue mayor al 85%.

Alicuotas de la suspensión celular con una concentración de 2×10^5 células/ml se inocularon en las cajas de cultivo para tener una densidad celular de 50000 células/cm² y se incubaron en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C. Después de dos horas de incubación, se retiró el sobrenadante con las células que no se adhirieron a la caja de cultivo, se alimentaron con MEM sin suero y se procedió a la realización de los experimentos.

M) Adhesión de hepatocitos:

La adhesión de los hepatocitos en cultivo se determinó por medio del conteo de células

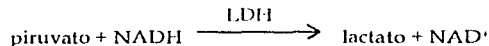
muertas en el hemocitómetro, utilizando la prueba de exclusión de azul tripano. Para ello se recogió el medio a diferentes tiempos y de estos se contó el número de células despegadas de las cuales se contaron las células vivas y las muertas, tomando en cuenta el porcentaje de viabilidad al momento de sembrar.

N) Morfología de hepatocitos:

Se tomaron fotografías a los cultivos primarios de hepatocitos sobre diferentes sustratos (colágena seca, biomatriz normal y cirrótica) a diferentes tiempos de cultivo. Con lo cual se buscó encontrar diferencias o similitudes morfológicas y estructurales que nos permitiera establecer una relación entre morfología y función.

O) Integridad celular y duración de los cultivos:

Una de las maneras de poder establecer la integridad celular de los hepatocitos es mediante la prueba para determinar la cantidad liberada al medio de la deshidrogenasa láctica (LDH), la cual es una enzima que se encuentra en el citoplasma de las células cuando están en buen estado y la membrana plasmática está intacta. Para ello se empleó la prueba de la actividad de la LDH (Berry et al, 1991). En esta técnica se preparan soluciones de NADH 2.5mg/ml y piruvato de sodio 1mg/ml en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.4, estas soluciones se preparan al momento y se mantienen en hielo hasta su uso. La reacción catalizada es la siguiente:



Se tomaron muestras del medio y monocapa de los cultivos a diferentes tiempos y al momento se sonicaron para romper las células y se centrifugaron a 10,000 rpm por 3 min para separar todo resto celular. Entonces se tomaron 33.3 µl de muestra y se le añadieron 833.3 µl de amortiguador de fosfatos a 37°C, después se le agregaron 67 µl de la solución de NADH. Para iniciar la reacción se adicionó 67 µl de la solución de piruvato de sodio y a los 5 minutos se paró la reacción con 100 µl de SDS 10%. Por último se determinó la absorbencia a 340nm utilizando como blanco agua destilada (la absorbencia

cuando se oxida el NADH (NAD⁺) es de 334-365nm con un máximo a 340nm).

*Se tomó un tiempo control (Tc) agregando 33.3 µl de agua en vez de muestra.

*Se tomó un tiempo cero (To) agregando SDS 10% antes de añadir el piruvato de sodio.

*La unidad de la actividad de la LDH es la que trasforma 1 µmol de piruvato a lactato/min a 37°C. Para los cálculos, una unidad de LDH se puede definir como:

$$\text{unidades/ml} = A_m - A_c \times 10,000 \times 1.16$$

donde:

A_m = absorbencia de la muestra

A_c = promedio de la absorbencia del Tc y To.

10,000 = factor de dilución

1.16 = factor de temperatura a 37°C.

P) Estudio de secreción de albúmina por los hepatocitos en cultivo.

Los hepatocitos en cultivo sobre las biomatrices se alimentaron con MEM y 10% de suero, sólo las dos primeras horas en cultivo y después se alimentaron con MEM libre de suero para poder analizar a las proteínas secretadas por los hepatocitos, en este caso albúmina. Para ello, de las muestras obtenidas se concentró la proteína total por medio de una precipitación con TCA y ácido tánico (10% y 0.15 % final), los precipitados se lavaron con etanol y se resuspendió la muestra en 100 µl de amortiguador de muestra para SDS-

PAGE, y se sometieron a electroforesis 20 µl de cada muestra.

Electrotransferencia y Western blot.

Las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida-SDS (7.5%), se transfirieron a un papel de nitrocelulosa con un voltaje constante de 200 mA durante 2 h. El papel con las proteínas transferidas se bloqueó con leche Svelty al 1% en PBS a 4°C toda la noche y se lavó 3 veces con PBS. Entonces se agregaron los anticuerpos contra albúmina a una dilución de 1:200 con PBS y leche al 1% a temperatura ambiente por 3 h. Se lavó con PBS-Tween 20 0.3% 3 veces 5 min/cu, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG biotinado en dilución 1:1000 en PBS-leche 1% a temperatura ambiente 3 h y se lavó como se hizo con el anticuerpo primario. Entonces se incubó con avidina-peroxidasa 1:1000 en PBS-leche 1% (30-60 min) a temperatura ambiente; se volvió a lavar como antes y se reveló con una solución de diaminobenzidina (50 mg de DAB/ 100 ml PBS) y agregando 10 µl de H₂O₂ al 30%.

Q) Análisis estadístico.

El desarrollo de los análisis estadísticos se realizó con la prueba de *t* de Student para análisis de promedios poblacionales. Invariablemente se reportaron los promedios ± desviación estándar de todos los resultados.

VI. RESULTADOS

El propósito fundamental de este trabajo fue determinar el efecto de la matriz extracelular del hígado sobre las células (en este caso hepatocitos) y cómo responden éstas ante una matriz extracelular que ha cambiado en composición. Para ello se tomó el modelo de la cirrosis hepática, ya que es un buen ejemplo de una matriz que ha sufrido grandes cambios ante un agente de daño (anteriormente explicado), y

que en consecuencia la comunicación entre las células y el medio que le rodea ya no es la misma. Para evaluar lo anterior se dió a la tarea de identificar cambios físicos, químicos y biológicos tanto del tejido hepático, la matriz extracelular aislada (biomatriz) y de células aisladas y cultivadas sobre esta matriz obtenida de hígados de ratas normales y cirróticas.

Cambios en el peso del hígado.

Se trabajó con dos grupos de 12 ratas Wistar machos de 6 semanas de edad, a un grupo se le aplicaron 10 inyecciones de CCl_4 (3 inyecciones por semana) para inducir una fibrosis moderada y el otro grupo sirvió como control. Se encontró que las ratas con cirrosis inducida ganaron peso corporal en aproximadamente 22 g con respecto al control y con base en las medias de los dos grupos. Sin embargo, las desviaciones se sobreponen, lo que sugiere que no es una diferencia significativa ($P > 0.05$, tabla 6).

Por otro lado, se encontraron cambios significativos en el peso de tejido hepático, donde los hígados de ratas cirróticas pesan más que los hígados de las ratas control ($P < 0.05$). Para homogeneizar más los resultados se trabajó exclusivamente con el lóbulo mayor del hígado, en todos los casos (determinaciones en tejido, aislamiento de la MEC (biomatriz) y aislamiento de hepatocitos en cultivo) y se encontró que era directamente proporcional el aumento del peso del hígado total y del lóbulo mayor en los grupos con cirrosis, con un aumento en aproximadamente 1.5 g (tabla 6).

Por último, se pudo observar que al aislar la biomatriz de los lóbulos se obtuvo una mayor cantidad de biomatriz de los lóbulos con cirrosis (224.5 mg) en aproximadamente 2 veces más con respecto al grupo control (113.7 mg). ($P < 0.05$, tabla 6).

Cambios en la concentración de colágena

Se encontró que, al igual que en reportes anteriores (Paez, 1986), la cantidad de colágena total en tejido cirrótico fué mayor ($P < 0.05$), ya

que la cantidad de colágena en tejido cirrótico es aproximadamente el doble con respecto al tejido sano. Así, por medio de la cuantificación de hidroxiprolina se determinó la cantidad de colágena total y se encontró que en promedio la concentración de esta proteína en tejido "normal" es de 15.08 ± 2.07 mg clg/gts y en tejido cirrótico es de 29.62 ± 5.26 mg clg/gts. Esto concuerda con los reportes obtenidos y asegura que se indujo una cirrosis moderada.

Por otra parte, la determinación de colágena total en las biomatrices nos muestra que también esta relación se mantiene y la cantidad de colágena total se ve aumentada en las muestras obtenidas de hígados cirróticos, ya que la biomatriz aislada de hígados sanos tiene una menor cantidad de colágena total 873.33 ± 36.47 μg clg/mg BM y las biomatrices obtenidas de hígados cirróticos tienen 902.93 ± 42.47 μg clg/mg BM ($P < 0.05$), situación que refleja los efectos de la cirrosis inducida (fig.7).

Cambios en la relación de proteínas totales y colagénicas

Los cambios en la relación de proteínas totales y colagénicas se analizó mediante la determinación colorimétrica de prolina e hidroxiprolina en hidrolizados ácidos de tejido. El valor determinado para tejido normal fué de 14.83 ± 2.20 y disminuyó en tejido con cirrosis 9.93 ± 1.38 ($P < 0.05$). Lo mismo ocurrió en las biomatrices donde la biomatriz normal presentó una relación de 0.50 ± 0.03 y la biomatriz de hígado cirrótico 0.38 ± 0.14 ($P < 0.05$). Todo ello nos reveló un aumento en la proporción de colágena total con respecto a las proteínas totales, en los casos de cirrosis (fig. 6).

Tabla 6. Peso de las ratas normales y cirróticas, de los hígados y biomatrices (BM) obtenidos de éstas, así como las relaciones para obtener el rendimiento de BM por hígado. (n=12).

	rata (g)	hígado (g)	lóbulo (g)	BM húmeda (mg)	BM seca (mg)	relación hígado rata	relación lóbulo hígado	relación BM-hum lóbulo	relación BM/seca BM
Normal	200.47 ± 19.14	16.50 ± 2.826	5.52 ± 0.85	113.7 ± 32.10	12.05 ± 2.60	0.0823	0.3348	0.0206	0.1060
Cirrótica	222.33 ± 36.80	20.37 ± 2.94	7.060 ± 0.97	224.5 ± 25.20	23.3 ± 5.00	0.0916	0.3466	0.0318	0.1038

Cambios en la cantidad de DNA

La mayor cantidad de DNA que presenta el tejido cirrótico (15.74 mg/gts \pm 2.35) con respecto al tejido sano (10.21 mg/gts \pm 0.96) ($P < 0.05$), hace suponer que es debido a un aumento en la celularidad durante el proceso de fibrosis (tabla 7 y figura 7). Así, ante el daño con CCl_4 se presenta una proliferación celular por parte de los hepatocitos, los cuales para protegerse forman los conocidos nódulos de regeneración. Por otro lado, las células de Ito (I^{SC}) también proliferan y son las principales productoras de la MEC durante la fibrosis produciendo principalmente colágenas tipo I y III.

Variaciones en la relación colágena/DNA en los tejidos

Para poder establecer el valor de la relación estroma/parénquima se expresaron los

datos de la cuantificación de colágena y DNA, por medio de la relación colágena/DNA. El valor normal fué de 1.47 y en los tejidos con cirrosis de 1.80 ($P < 0.05$, fig. 6).

Determinación de GAG

La concentración de GAG obtenidos en el tejido normal fué de 3.66 mg/gts \pm 1.33, mientras que en el tejido cirrótico también se encontró un aumento considerable 10.57 \pm 1.88 ($P < 0.05$), lo que representa un aumento de cerca de tres veces mayor al presentado por los tejidos normales. Este aumento también se encontró en las biomatrices cirróticas, sólo que las cantidades son muy pequeñas con 0.50 mg por gramo de biomatriz normal y 0.78 mg por gramo de biomatriz cirrótica ($P < 0.05$).

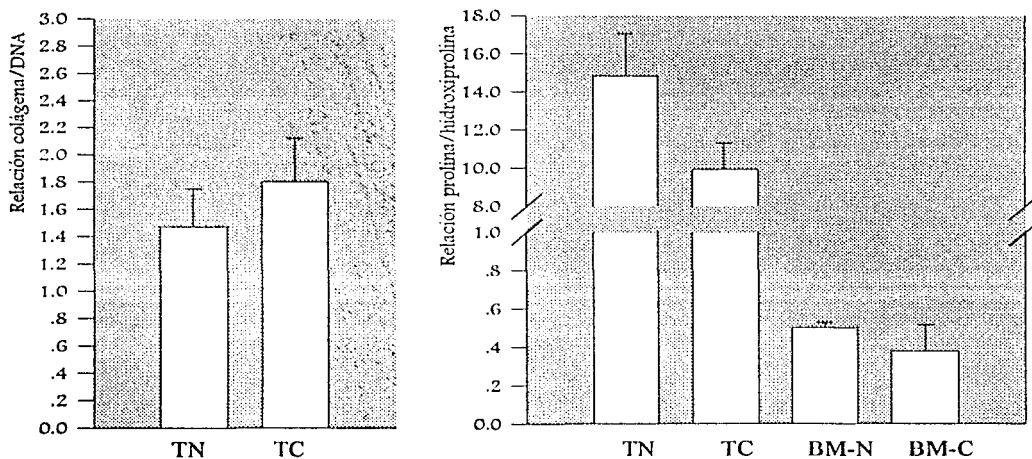


Figura 6. La gráfica de la izquierda muestra la relación estroma/parénquima en tejido normal (TN) y cirrótico (TC). La gráfica de la derecha muestra la relación prolina/hidroxiprolina en tejido normal y cirrótico, y biomatriz de hígado normal (BM-N) y de hígado cirrótico (BM-C).

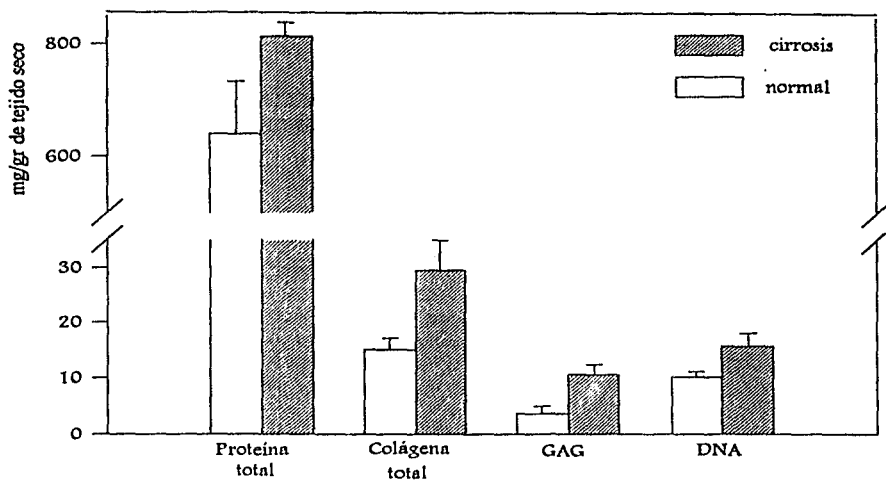


Figura 7. Determinación de proteína total, colágena total, GAGs y DNA presentes en tejido hepático de ratas normales (barras blancas) y cirróticas (barras con líneas).

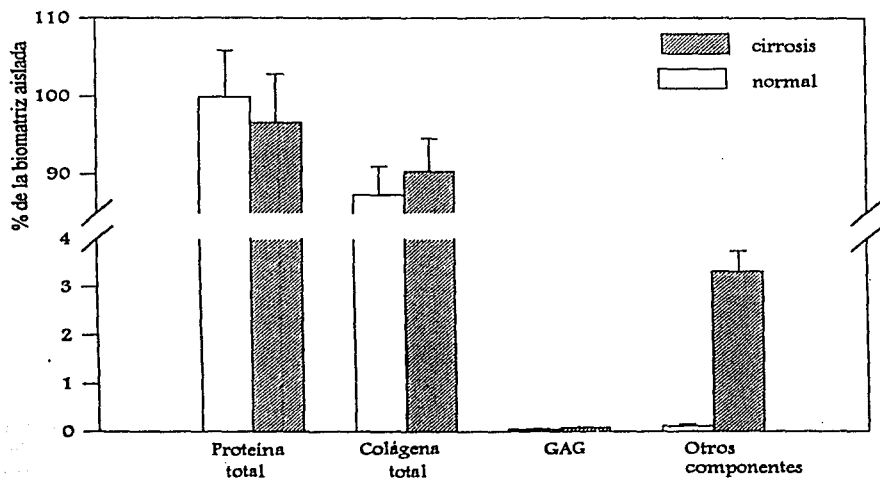


Figura 8. Proporción de proteína total, colágena total y GAGs; con respecto a la biomatriz aislada de hígado de ratas normales (barras en blanco) y cirróticas (barras con líneas).

Tabla 7. Valores de la concentración de colágena, proteína total, DNA y GAG presentes en tejidos y biomatriz de ratas normales y cirróticas, así como las relaciones Pro/OH-pro, clg/prot total y clg/DNA.

	<i>Prolina</i> (mg/gts)	<i>OH-pro</i> (mg/gts)	<i>DNA</i> (mg/gts)	<i>Colágena</i> (mg/gts)	<i>Proteína</i> (mg/gts)	<i>GAG</i> (mg/gts)	<i>Pro</i> <i>OH-pro</i>	<i>Clg</i> <i>DNA</i>	<i>Clg</i> <i>Prot.</i>
<i>Tejido Normal</i>	29.44 ±2.6910	1.9532 ±0.2683	10.21 ±0.9623	15.0787 ±2.0713	640.11 ±93.84	3.66 ±1.330	14.8323 ±2.2000	1.47 ± 0.28	0.0023
<i>Tejido Cirrótico</i>	37.48* ±1.4145	3.8374* ±0.6810	15.74* ±2.3490	29.6247* ±5.2573	814.70* ±25.11	10.57* ±1.880	9.9282* ±1.3790	1.80* ± 0.32	0.0036*
<i>Biomatriz Normal</i>	48.51 ±6.5090	116.31 ±4.7200		873.3299 ±36.4716	998.42 ±159.72	0.50 ±0.017	0.5034 ±0.0276		0.8798
<i>Biomatriz Cirrótica</i>	42.06* ±8.9930	121.5* ±5.5000		902.9274* ±42.4793	966.02* ±115.58	0.78* ±0.137	0.3804* ±0.1376		0.9204*

* Diferencias significativas con respecto al grupo control ($P < 0.05$).

Análisis electroforético de proteínas en la biomatriz

Las electroforesis en geles de poliácridamida-SDS, nos muestran que el patrón electroforético de las biomatrices cirróticas son claramente diferentes al de las biomatrices normales. En la figura 9 se puede observar un aumento de las bandas que representan a la colágena en biomatrices cirróticas, así como un cambio en la relación de colágena tipo I y colágena tipo III, mostrando que hay una mayor proporción de colágena I con respecto a la colágena III en las biomatrices cirróticas.

Por otro lado los ensayos enzimáticos con pepsina nos revelan una biomatriz que en su mayor parte se compone de colágena (fig. 10) y los ensayos con collagenasa nos muestran muy poco material no colagénico.

Identificación de colágena tipo I y III, laminina y fibronectina presentes en la biomatriz

Las electroforesis de las biomatrices muestran que las proporciones de colágena tipo I y tipo III se modifican, cuando estas biomatrices se aislaron de hígados cirróticos. Hay un aumento en

la cantidad de colágena tipo I y una disminución en la proporción de colágena tipo III en las biomatrices cirróticas, como lo muestran los geles de la figura 10 (reducción retardada).

Por otro lado, en las digestiones con collagenasa se observan unas bandas de alto peso molecular, de aproximadamente 200 y 400 kDa, las cuales pueden ser algunas de las cadenas de laminina (400 kDa), y de fibronectina o laminina (200 kDa) (fig. 11).

Identificación de GAG en la biomatriz

La electroforesis en membranas de acetato de celulosa para identificar GAGs nos muestra que en la biomatriz cirrótica la única banda que se observa es más grande. Como se ha mencionado, la cantidad de GAG presentes en la biomatriz es muy poca para poder hacer la electroforesis, para ello se aislaron los GAG de 5 gramos de biomatriz (con lo que el material aislado para este trabajo casi se agotó). La única banda observable puede tratarse de heparán sulfato (el GAG más abundante del hígado y de la MEC) o de ácido hialurónico, con base en la distancia a la que migran si los comparamos con los estándares

también sometidos a electroforesis. Cabe mencionar que la distancia a la que migran los GAG depende de la cantidad de cargas (grupos

sulfato) así como de su solubilidad en el amortiguador de acetatos y etanol.

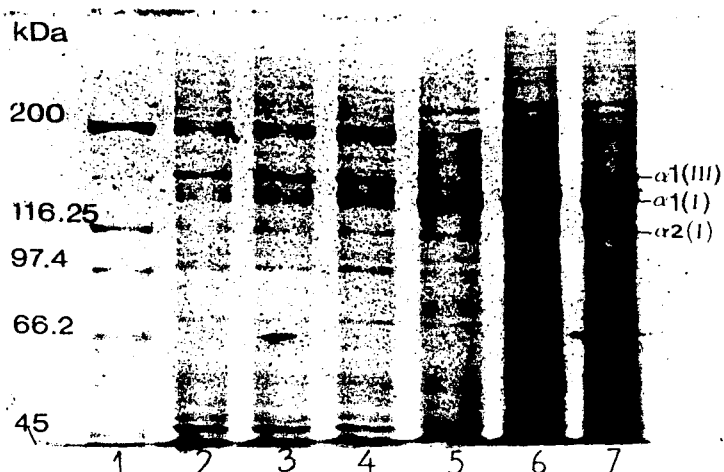


Figura 9. Patrón electroforético de proteínas de la biomatriz normal (2,3,4) y de la biomatriz cirrótica(5,6,7). Carril 1, estándares de pesos moleculares.



Figura 10. SDS-PAGE 6% de proteínas de la biomatriz. Estándares de pesos moleculares (1), estándar de colágena (2), biomatriz de hígado normal (3) y cirrótico (4) tratadas con pepsina; biomatriz de hígado normal (5) y cirrótico (6) tratadas con collagenasa; biomatriz normal (7) y cirrótica (8) tratadas con pepsina y collagenasa. Reducción retardada de los carriles 2 a 8.

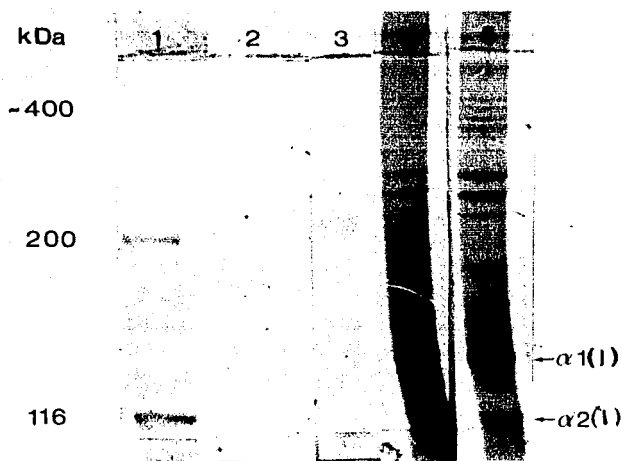


Figura 11. SDS-PAGE 5% de proteínas de la biomatriz. Estándares de pesos moleculares (1); estándar de colágena (2); laminina (3); biomatriz normal (4) y cirrótica (5), en las que se observan bandas de alto peso molecular de entre 200 y más de 400 kDa.



Figura 12. Electroforesis en placas de acetato de celulosa para identificar GAG.

Se muestra el patrón de corrimiento de GAGs en muestras de biomatriz de hígado normal (A) y biomatriz de hígado cirrótico (B).

Evaluación de los cultivos sobre las biomatrices

- Morfología de las biomatrices

Para poder observar la morfología de las biomatrices se empleó la iluminación de campo oscuro, donde se observa a las biomatrices que cubren la superficie en las cuales se siembran los hepatocitos (antes de sembrar). De esta forma se

apreció que las biomatrices obtenidas de hígados de ratas cirróticas se ven más densas y fibrosas, con respecto a las biomatrices normales (fig. 13), y por tal motivo es más difícil de disolver para poder cubrir homogéneamente las cajas de cultivo.

A



B



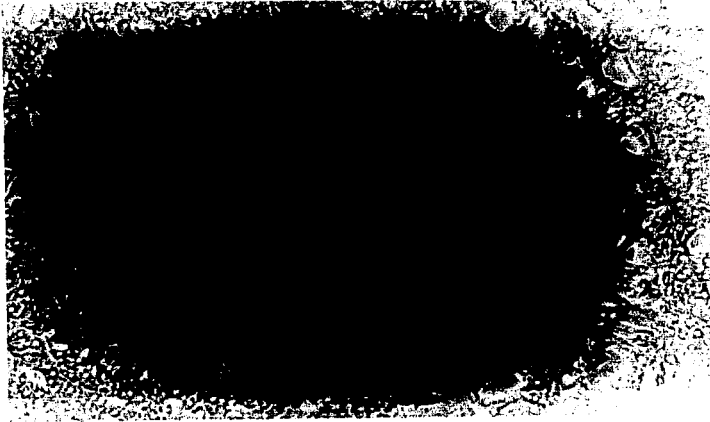
Figura 13. Fotografías de biomatriz normal (A) y cirrótica (B) que cubren la superficie de la caja de cultivo (antes de sembrar las células) vistas en iluminación de campo obscuro y a 62x aumentos. Se muestra que la biomatriz de hígado de rata con cirrosis es más densa y forma agregados fibrosos de mayor tamaño que la biomatriz normal.

-Morfología de los hepatocitos en cultivo

Los hepatocitos en cultivo sobre las biomatrices presentan una morfología diferente a los cultivos sobre colágena seca. Ambos cultivos, a las 24 h, presentan una distribución homogénea y confluyente, sin embargo los hepatocitos cultivados sobre la biomatriz se arreglan formando

"cordones" después de 48 h en cultivo. Estas estructuras asemejan a conductillos biliares, además de que las células presentan una morfología polihédrica, a diferencia de las formas fusiformes de los hepatocitos sembrados sobre colágena seca (figs. 14,15,16 y 17).

A



B

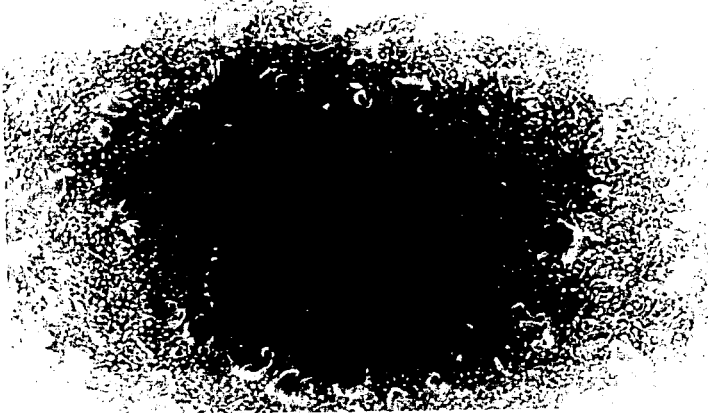
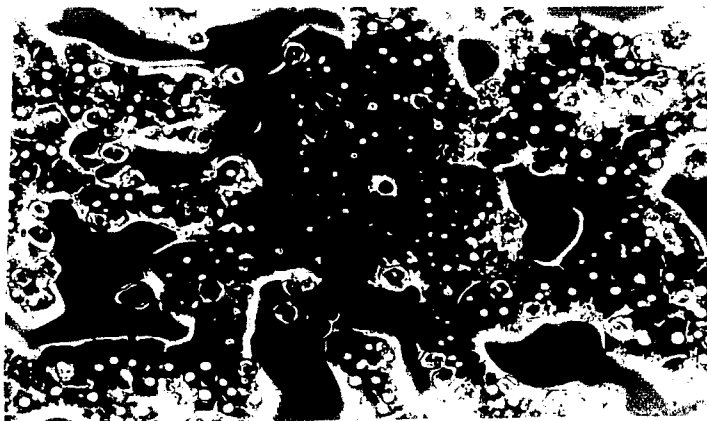


Figura 14. Cultivo de hepatocitos normales (A) y cirróticos (B) sembrados sobre colágena seca. Las células cubren casi la totalidad de la superficie y son de forma poligonal y alargada. Contraste de fases a 62x aumentos.

A

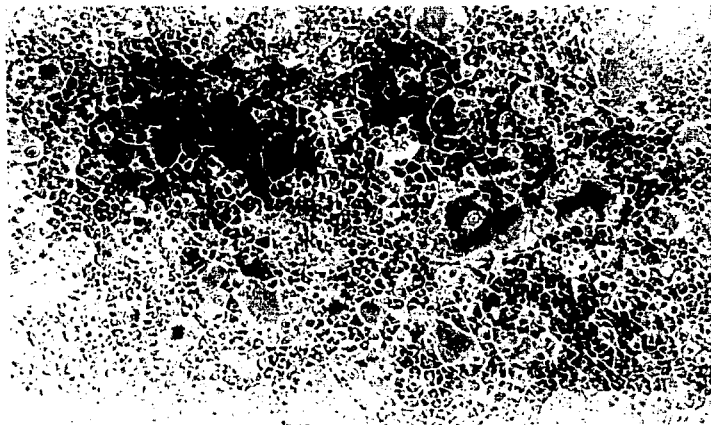


B



Figura 15. Cultivo de hepatocitos normales sembrados sobre biomatriz normal (A) y sobre colágena seca (B). Las células sobre la biomatriz forman cordoncillos y se ven menos alargadas que las sembradas sobre colágena seca. A a 160x y B a 200x.

A



B

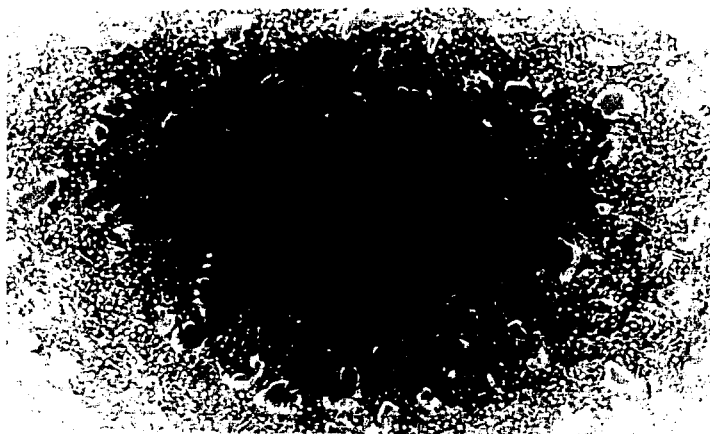
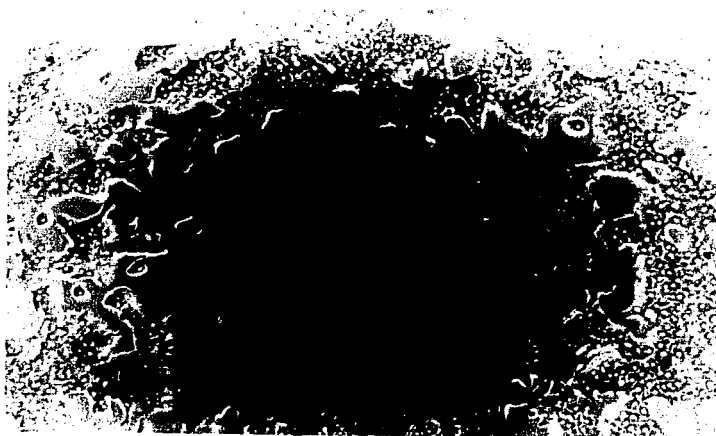


Figura 16. Cultivo de hepatocitos normales a 24 h de sembrarse sobre biomatriz normal (A) y cirrótica (B). 160x aumentos. Las células sembradas sobre BM-N forman los cordoncillos característicos y las sembradas sobre BM-C se parecen más a los cultivos tradicionales sobre colágena seca, aunque a partir del segundo o tercer día de cultivo también forman dichas estructuras.

A



B

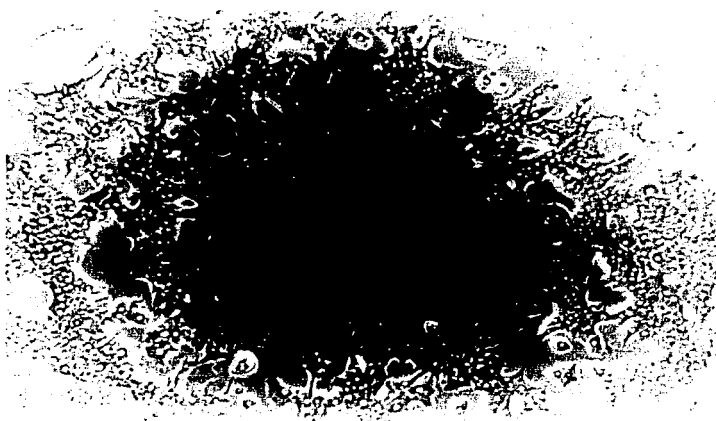


Figura 17. Cultivos de hepatocitos de rata cirrótica, a 24 h de sembrados sobre biomatriz normal (A) y cirrótica (B). Aumentos de 160x. Obsérvese que los hepatocitos de rata cirrótica forman las estructuras en forma de cordones si son sembrados sobre la BM-N, lo que no sucede en la BM-C, aunque si las forman al tercer o cuarto día de cultivo.

-Viabilidad de los cultivos y actividad de la LDH

La actividad de la LDH liberada del medio intracelular al extracelular nos indica la integridad celular del cultivo. Mediante este método se analizó la viabilidad de los cultivos sobre las biomatrices. Así, se observó que los hepatocitos son viables hasta los siete días en cultivo, aún sin

suero en el medio. También se observó que los hepatocitos cirróticos están en mejores condiciones sobre su biomatriz homóloga, aunque no es tan claro este efecto con respecto a la viabilidad (figs 18 y 19).

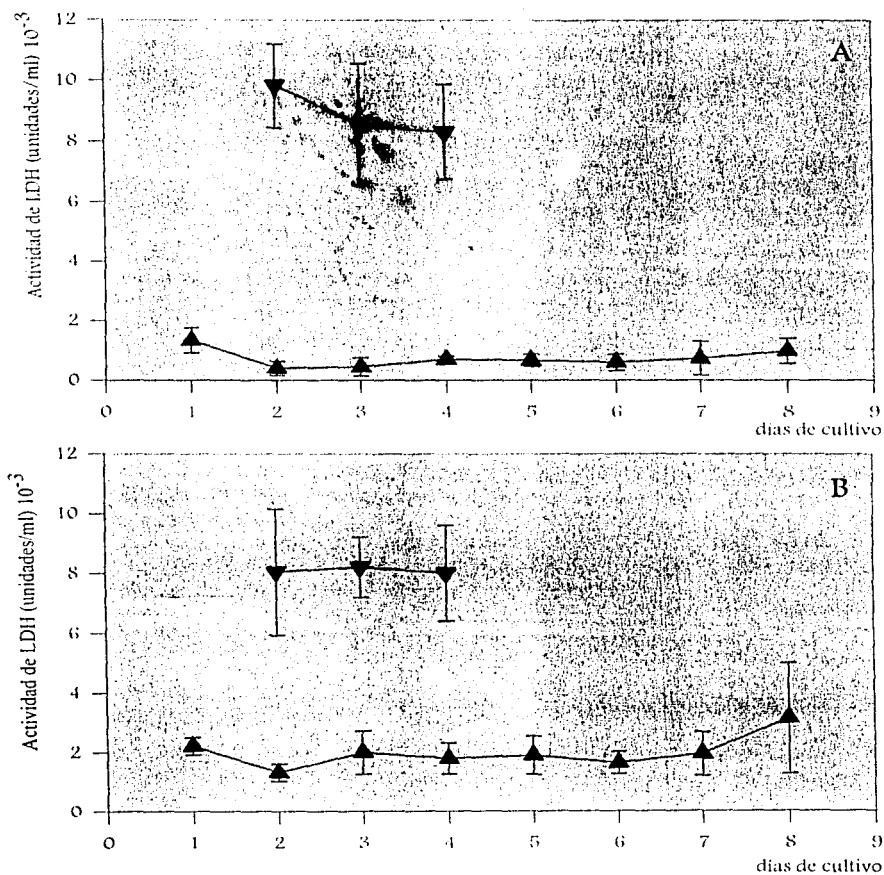


Figura 18. Actividad de la LDH en el medio (▲) y en la monocapa (▼) de cultivos de hepatocitos de rata normal sembrados sobre biomatriz normal (A) y sobre biomatriz cirrótica (B).

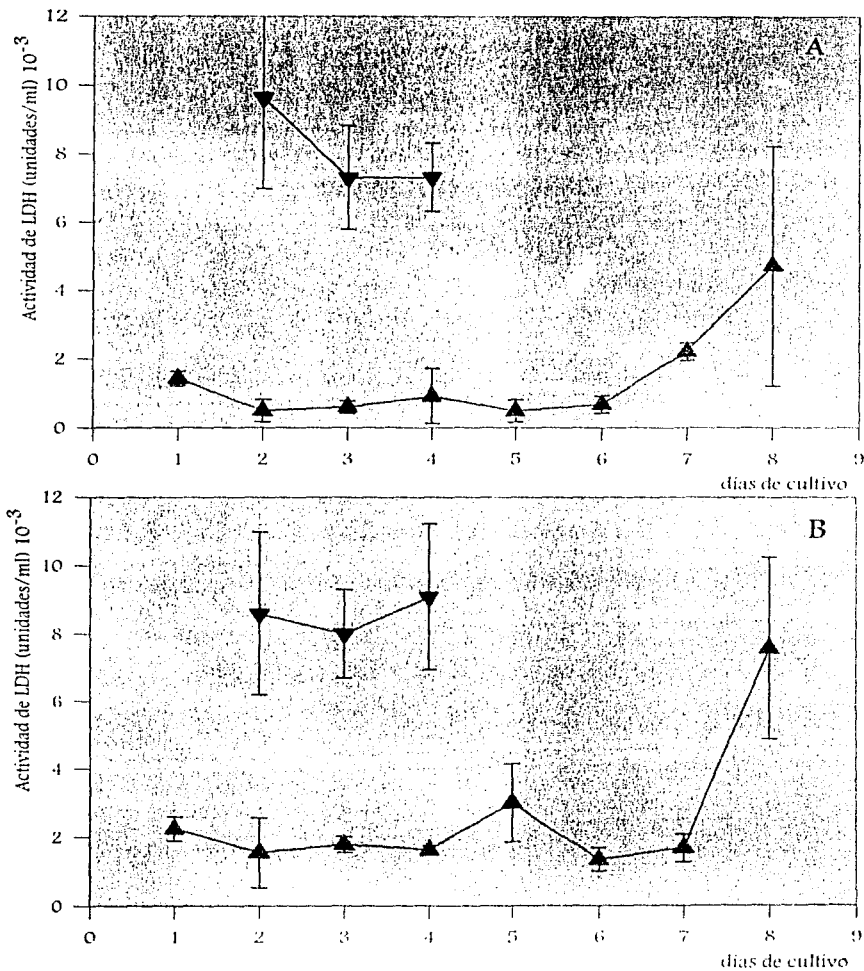


Figura 19. Actividad de la LDH en medio (▲) y monocapa (▼) de cultivos de hepatocitos de rata cirrótica sembrados sobre biomatriz normal (A) y sobre biomatriz cirrótica (B).

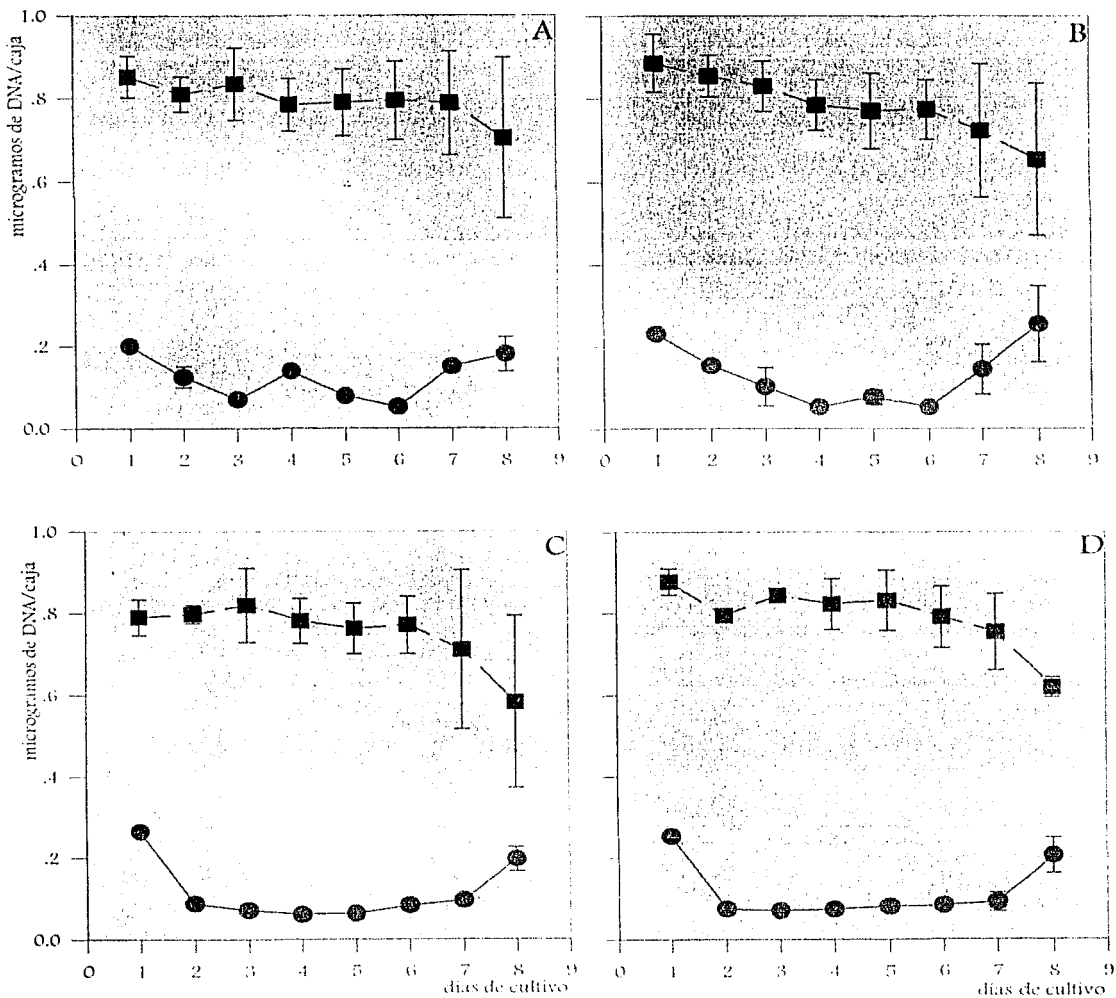


Figura 20. Cuantificación de DNA en la monocapa (□) y el medio (●) de cultivos de hepatocitos normales (A y B) y cirróticos (C y D), sembrados sobre biomatriz de hígado de rata normal (A y C) y sobre biomatriz de hígado de rata cirrótica (B y D).

-Determinación de la cantidad de DNA

La determinación de DNA total en la monocapa (fig.20), nos muestra que no hay proliferación celular, ya que la cantidad de DNA total se mantiene constante mientras duran viables los cultivos, y cuando se pierde la viabilidad aumenta la cantidad de DNA en el medio. Este mismo patrón se vió en todos los cultivos realizados en este trabajo.

-Secreción de albúmina por los hepatocitos en cultivo

La secreción de albúmina por los hepatocitos es un marcador de diferenciación celular; esta secreción en cultivos de hepatocitos normales sobre colágena seca disminuye considerablemente al tercer día en cultivo (fig. 21).

Los hepatocitos obtenidos de rata normal sembrados sobre su biomatriz homóloga (BM-normal), muestran una secreción de albúmina constante durante los ocho días en cultivo (fig. 22A), mientras que el cultivo heterólogo de hepatocitos normales presentó una síntesis baja de albúmina, que se incrementó a partir del quinto día en cultivo (fig.22B). Los hepatocitos de rata cirrótica sembrados sobre una biomatriz normal secretaron albúmina durante los ocho días de cultivo, en una forma relativamente constante (fig. 22C). Sin embargo, los hepatocitos cirróticos sembrados sobre su biomatriz homóloga, al inicio del cultivo, secretaron muy poca albúmina, pero a mayor tiempo en cultivo mostraron cada vez una mayor secreción de albúmina (fig. 22D).

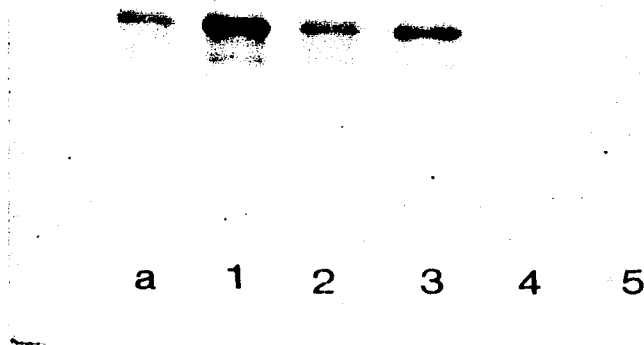


Figura 21. Secreción de albúmina por hepatocitos normales cultivados sobre colágena seca. En esta inmunotransferencia se puede observar que a partir del tercer día de cultivo disminuye considerablemente la secreción de albúmina. ASB (a); días de cultivo (1,2,3,4 y 5).

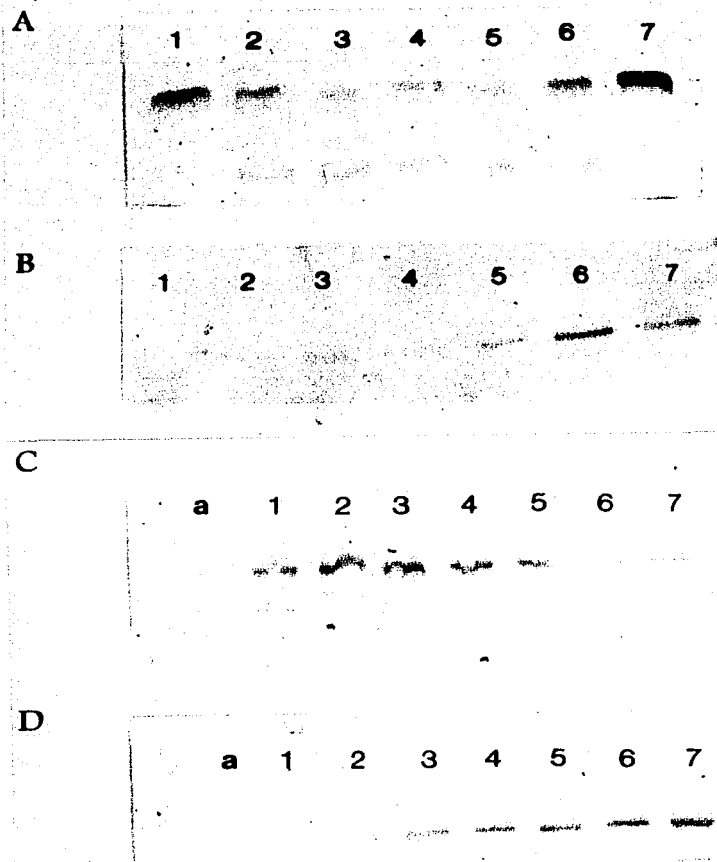


Figura 22. Western blot para el estudio de la secreción de albúmina por hepatocitos normales sembrados sobre biomatriz normal(A) y cirrótica (B); y hepatocitos cirróticos sembrados sobre biomatriz normal (C) y cirrótica (D). ASB (a); días de cultivo (1-7).

VII. DISCUSIÓN

El aumento de peso en los hígados de ratas tratadas con CCl_4 indica que ya existe un desajuste en las proporciones de algunos de los componentes del tejido, ya sea porque el tejido ha aumentado su tamaño o densidad. Es por ello, que al aislar la biomatriz se obtuvo una mayor cantidad de ella en tejido cirrótico, por lo que se puede corroborar que ante un daño, hay un mayor depósito de componentes de la matriz extracelular que es la que conforma a la biomatriz en su mayoría.

Sin embargo, no sólo hay un aumento en la cantidad de componentes de la MEC, también se encontró que la cantidad de DNA aumentó en una proporción de aproximadamente 50% (ver tabla y figura 7), por lo que se puede pensar que hubo una proliferación celular en este proceso fibrótico. La cual puede deberse a que los hepatocitos expuestos al agente dañino (CCl_4) forman nódulos de regeneración, en los cuales los hepatocitos se encuentran proliferando y, tal vez, ya sin desempeñar sus funciones diferenciadas (Bucher et al, 1990). En estos nódulos, las células se rodean de septos fibrosos, los cuales tienen una alta cantidad de componentes de la MEC característicos de una membrana basal (colágena IV, laminina, perlecano), que es menos permeable y aísla a los hepatocitos del agente del daño, pero también pierden la comunicación con el flujo sanguíneo, ocasionando que los hepatocitos ya no regulen eficientemente las funciones que son de vital importancia para el organismo.

Este aumento de la celularidad también puede deberse a que las principales células productoras de la MEC, que son las FSC, aumentan su población y, como consecuencia, el depósito de la MEC en el tejido (Friedman, 1993).

El índice de los coeficientes de la relación clg/DNA es mayor en los tejidos con cirrosis (ver figura 6), este dato nos representa la relación estroma/parénquima donde se ve que hay un aumento más pronunciado en el estroma que en el parénquima; lo que significa que hay un aumento tanto de células como de componentes de la MEC, sólo que el aumento de matriz es mayor que la proliferación celular.

Por otro lado, los resultados de las relaciones de Pro/OH-Pro y $\text{clg}/\text{proteína total}$ disminuyen y aumentan, respectivamente, en los tejidos y biomatrices obtenidos de ratas cirróticas. Lo cual corresponde a un aumento en la cantidad de colágena de forma desproporcionada. Todos estos resultados concuerdan con los trabajos realizados anteriormente en el laboratorio (Paez, 1986). Con los datos obtenidos en la biomatriz, podemos asegurar que el cambio de las relaciones de estos componentes de la MEC se ve reflejado en las biomatrices aisladas.

El aumento total de glicosaminoglicanos en tejidos hepáticos con cirrosis (cerca de tres veces), significa un mayor depósito de éstos en la matriz extracelular y también una mayor síntesis. Ya se ha observado que las células hepáticas de ratas con cirrosis sintetizan una mayor cantidad de GAG (Gressner et al, 1977; Krull y Gressner, 1992). Este aumento también se observó en las biomatrices cirróticas con respecto a los controles normales. Sin embargo, como se puede observar en la gráfica de la figura 8, la cantidad de GAG obtenida al aislar la biomatriz es muy poca en relación a la presente en el tejido (fig. 7). Esto puede explicarse porque buena parte de los GAG pudo haberse perdido en el proceso de aislamiento de la biomatriz, por ejemplo, en alguno de los múltiples lavados con soluciones acuosas, ya que los GAG, por las cargas negativas que le confieren la gran cantidad de grupos sulfato que poseen, son altamente solubles en un medio acuoso. La pérdida de los GAG en la biomatriz es la más importante de los componentes de la MEC, ya que como se ha mencionado, la biomatriz posee una importante cantidad de proteínas colagénicas y no colagénicas que coinciden con las proporciones de la MEC tanto en condiciones normales como de fibrosis.

Los análisis electroforéticos para las proteínas presentes en las biomatrices nos indican claramente que hay un aumento de colágena en las proteínas totales, además de un cambio en la relación de colágena tipo I y colágena tipo III que se puede apreciar en la electroforesis con reducción retardada, donde la proporción de colágena tipo I aumenta con respecto a la tipo III

en biomatrices aisladas de hígados de ratas cirróticas (fig. 10). También, las digestiones con pepsina y colagenasa muestran que la mayor cantidad de proteínas son colagénicas, y solo se aprecian unas bandas por encima de los pesos moleculares de 200 kDa en las digestiones con colagenasa que pueden corresponder a las cadenas de laminina y/o fibronectina, proteínas que no abundan pero se sabe que se encuentran en la MEC normal y principalmente en la MEC de tejidos fibróticos, especialmente la laminina que se presenta en las membranas basales y los septos fibrosos (Martínez-Hernández, 1984) asociada con colágena tipo IV y perlecano (proteoglicano rico en sulfato de heparán). Para corroborar esto, sería conveniente la utilización de anticuerpos para identificar dichas proteínas.

Las diferencias en las proporciones de los componentes de las biomatrices aisladas de hígados de ratas normales y cirróticas son significativas, y reflejan, aunque no totalmente, las condiciones y composición de la MEC *in situ*. Estas diferencias también se manifiestan por cambios en varios parámetros físicos, la biomatriz cirrótica es menos soluble que la normal (que *per se* es poco soluble) aún en ácido acético 0.5 M, es por ello que al extenderla en las cajas de cultivo para que sirva de sustrato a los hepatocitos, las biomatrices cirróticas vistas al microscopio en campo oscuro, su morfología se ve más densa y grumosa (fig. 13), a diferencia de las BM-normales que se distribuyen más homogéneamente. Esto se debe a la gran cantidad de componentes fibrosos como colágenos tipos I, III y IV, laminina, fibronectina y los pocos GAG, que todos juntos interaccionan formando relaciones muy estrechas y difíciles de disociar, pero importantes para la comunicación con las células.

De tal forma, al sembrar las células sobre estas biomatrices presentan una mejor adhesión, morfología y viabilidad con respecto a las células sembradas sobre colágena seca (DiPersio et al, 1991). A diferencia de los cultivos realizados por el grupo del Dr. Marcos Rojkind (1980) de hepatocitos de rata normal sobre su biomatriz homóloga, éstos presentan un sustrato (BM-N) muy grumoso y poco homogéneo, y sobre dichos grumos se adhieren los hepatocitos, pero dejan importantes huecos en la caja de cultivo, esto se debe a la poca solubilidad de la biomatriz y la

dificultad para distribuirla por toda la superficie de la caja. En el sistema diseñado en este trabajo, la biomatriz se distribuyó mejor sonicandola con ácido acético concentrado (0.5 M) para obtener una suspensión más homogénea (fig. 13). El resultado fue la obtención de unos cultivos más homogéneos, donde las células se distribuyen por toda la caja y forman estructuras que asemejan a canaliculos biliares (figs. 15A, 16, 17).

Estas estructuras no se han reportado en los cultivos que se han realizado sobre colágena seca, gel de colágena, laminina, fibronectina o matrigel; este último se obtiene del tumor EHS y es un extracto rico en laminina, colágena tipo IV, entactina y heparán sulfato (Hirata et al, 1983; Friedman et al, 1989; Bisell, 1992). Los cultivos realizados sobre el matrigel presentan células pequeñas y esféricas, con pocos contactos célula-célula, pero muestran secreción de proteínas como la albúmina, que es usada como marcador de diferenciación de funciones celulares (Bisell, 1987). Esto concuerda con que la matriz es importante para la expresión y la síntesis de albúmina (Caron, 1990).

La mejor adhesión de los hepatocitos sembrados sobre la biomatriz puede deberse a la posible presencia de laminina en la biomatriz (Clément et al, 1990); además, se ha reportado que la laminina presente en el hígado difiere de la que se encuentra en el tumor EHS (laminina 1). De tal forma, que en los sinusoides se encuentran dos tipos diferentes de laminina que carecen de la cadena $\alpha 1$. Los sinusoides presentan la laminina 2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) y laminina 4 ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$), además parece ser que la adhesión es principalmente por medio de la cadena $\alpha 2$ de la laminina y es dependiente de iones Mg^{++} y Mn^{++} e independiente de Ca^{++} e insulina (Ponce et al, 1995).

Las estructuras en forma de cordones que presentan los cultivos sobre la biomatriz, a diferencia de la monocapa homogénea de células que cubre toda la caja en los cultivos sobre colágena seca (fig. 14), sugiere que la biomatriz tiene la capacidad de organizar a las células estructuralmente, debido a que la mayor parte de la biomatriz se compone de moléculas de la MEC, las cuales le proporcionan cierta información a las células para tener una interacción más estrecha y específica. Así, la comunicación que se establece entre la célula y la matriz extracelular, puede

representar un modelo más apegado a lo que posiblemente sucede *in vivo*, tanto en procesos normales como patológicos.

Uno de los modelos más empleados para el estudio de los hepatocitos en cultivo, son los cultivos sobre colágena seca. En estos cultivos las células forman una monocapa homogénea que cubre la superficie total de la caja, además, las células muestran sus mejores condiciones de viabilidad y adhesión a las 24 y 48 horas en cultivo (Acosta,1994). Las células tienen una forma polihédrica y la secreción de albúmina disminuye considerablemente a los tres días de cultivo (fig. 21). Por eso se dice pierden sus funciones diferenciadas en ese tiempo, ya que el sustrato de colágena es suficiente para mantenerlas hasta tres días en las mejores condiciones, pero las células necesitan de un sustrato que les permita desarrollar sus funciones y no solo mantenerlas viables.

Los cultivos sobre una biomatriz normal formaron las estructuras antes mencionadas, cuando las células sembradas eran hepatocitos de rata normal o cirrótica (figs. 16A y 17A), pero los cultivos sobre una biomatriz extraída de una rata con cirrosis no formaban estas estructuras con la claridad de las antes mencionadas (figs. 16B y 17B). Además, la formación de los cordones de células no depende de que los hepatocitos sean de rata normal o cirrótica, sino de la biomatriz. En los cultivos sobre una biomatriz cirrótica, la forma de éstos se parece más a los cultivos sobre colágena seca, pudiendo deberse a que esta biomatriz es más rica en colágena tipo I (más del 95%) y tiene menor cantidad de otros componentes no colagénicos como lo es la laminina.

En cuanto a la evaluación de las funciones diferenciadas por medio de la secreción de albúmina, se observó que los hepatocitos normales ó cirróticos sembrados sobre una biomatriz normal (fig. 22A y 22C), presentan una secreción de albúmina constante durante los siete días en cultivo en ausencia de suero, aunque los hepatocitos normales sobre la biomatriz cirrótica son ligeramente menos secretores de esta proteína, posiblemente por que su matriz es diferente.

Por otro lado, los hepatocitos de rata normal ó cirrótica, sembrados sobre biomatriz de hígado cirrótico (fig. 22B y 22D), al inicio del cultivo no secretaron la misma cantidad de

albúmina pero esta capacidad la fueron recuperando conforme pasaban más tiempo en cultivo, de tal forma que al cuarto o quinto día en cultivo ya presentaban una secreción de albúmina similar a los hepatocitos normales. Por supuesto, esta recuperación fue más acentuada en los hepatocitos de rata normal.

Estos datos nos sugieren, como lo habían propuesto Meyer et al (1991) en la teoría del hepatocito intacto, que los hepatocitos todavía no están dañados irremediablemente en patologías como la cirrosis hepática, lo que sucede es que ya no desempeñan sus funciones al perder la comunicación con el flujo sanguíneo. Por eso, los hepatocitos cirróticos, al sembrarse sobre una biomatriz normal inician sus funciones diferenciadas desde el primer día en cultivo, pero si son sembrados sobre un ambiente dañado y distorsionado como lo es la biomatriz cirrótica, los hepatocitos recuperan esta capacidad gradualmente, y puede ser que ellos modifiquen a su vez el medio que les rodea para sobrevivir, ya sea produciendo algunas metaloproteasas como colagenasas o produciendo algunos componentes de la MEC. Todo esto parece demostrar que los hepatocitos cirróticos ante un daño como una fibrosis, si retienen sus funciones diferenciadas, pero dependen mucho de como se encuentra el medio que les rodea, la MEC en este caso, aunque también es importante considerar la interacción con otros componentes celulares (Ben-Ze'ev et al,1988).

Como ya se mencionó, la biomatriz se compone principalmente de proteínas presentes en la MEC, como colágenas tipo I y III, probablemente colágena tipo IV, así como laminina, fibronectina y una pequeña cantidad de GAG. Pero falta conocer si en estas biomatrices se encuentran asociadas otras moléculas que también interaccionan con la MEC, como es el caso de algunos factores de crecimiento que pudieran retenerse en las biomatrices aisladas.

El TGF- β y la IL-1 son entre otras, las principales citocinas que se ha comprobado que intervienen en los procesos fibróticos en el hígado (Czaja et al,1989; Matsuoka y Tsukamoto,1990). El TGF- β estimula ciertos tipos celulares como las FSC para la síntesis de colágena, transformandolas a un tipo celular miofibroblastoide (MYF), e inicia así el proceso de cicatrización incrementando el

depósito de matriz, disminuyendo su degradación e incrementando la expresión de integrinas (Border y Ruoslahti, 1992). A su vez, la IL-1 induce la proliferación de las FSC pero no tiene efecto sobre la expresión genética de la colágena. También el TGF- β , al parecer modula la expresión de los proteoglicanos. Otras citocinas como el TNF- α , PDGF, INF- γ y la IL-6 se sabe que intervienen en la modulación de la MEC, la última de éstas al inhibir la activación de las FSC y la síntesis de colágena (Rockey *et al* 1992).

La pequeña cantidad de GAG recuperados en las biomatrices con relación a lo esperado, es de gran importancia porque las interacciones de los mismos componentes proteicos de la MEC, así como de buena parte de citocinas presentes en ésta, son mediados por las interacciones electrostáticas con los GAG. De tal forma, los GAG se encuentran entre los principales moduladores de la MEC, ya sea por que atrapan a los factores de crecimiento inhibiendo su actividad ó por presentarlos ante los receptores celulares amplificando la afinidad del ligando por su receptor.

La viabilidad de los hepatocitos en cultivo, empleando como marcador la LDH liberada al medio, nos indica que tanto en los cultivos homólogos como en los heterólogos fue alta hasta el octavo día de cultivo en que hubo una pérdida considerable de la viabilidad (figs. 18 y 19) y no se observaron diferencias significativas entre la viabilidad de los cultivos, solo se aprecia una leve diferencia entre los hepatocitos sembrados sobre una biomatriz normal, donde estos tienen una mejor adhesión y viabilidad con respecto a los

hepatocitos sembrados sobre la biomatriz cirrótica. Esto muestra que los hepatocitos pueden mantenerse viables y con funciones diferenciadas hasta siete días en cultivo en ausencia total de suero, a diferencia de los cultivos sobre colágena seca que gradualmente van disminuyendo su viabilidad después del segundo día en cultivo en ausencia de suero.

La cantidad de DNA durante el tiempo que duraron los cultivos no se incrementó y se perdió conforme se perdía la viabilidad de los cultivos en todas las condiciones (fig. 20), esto demuestra que sobre colágena seca y sobre biomatriz normal o cirrótica no hay proliferación celular. Lo que quiere decir que la biomatriz puede que carezca de EGF y HGF, los cuales estimulan la proliferación celular en conjunción con un sustrato de colágena tipo IV, laminina o fibronectina como ha sido estudiado por Enat *et al* (1984), estos últimos componentes los tienen las biomatrices.

Resumiendo, se puede decir que los cultivos de hepatocitos sobre las biomatrices son un buen modelo experimental para estudiar el metabolismo de los hepatocitos y de otros tipos celulares como las FSC, que juegan un papel importante el desarrollo de la cirrosis. Estos estudios ayudarían a comprender, por ejemplo, si los hepatocitos sintetizan colágena ante un ambiente alterado, o si las FSC recuperan sus funciones normales en un sustrato que se asemeja mucho (en los componentes proteicos al menos) a su medio normal.

VIII. CONCLUSIONES

* Los componentes de la biomatriz son, en gran parte, similares a los componentes de la matriz extracelular. Como se determinó en este trabajo, las relaciones de colágena tipo I y III, así como de proteínas no colagénicas y con la excepción de los glicosaminoglicanos, se mantienen en la misma proporción tanto en el tejido como en la biomatriz aislada.

* Estas relaciones se alteran al inducir cirrosis a las ratas, este cambio se observa con el incremento de la cantidad de colágena total tanto en hígado como en la biomatriz, la relación de clg /DNA y la cantidad de glicosaminoglicanos aumenta y al parecer la proporción de colágena III disminuye, mientras que la de colágena tipo I

aumenta. Todo estos resultados concuerdan con lo reportado con anterioridad en tejidos frescos en patologías como la cirrosis, lo que confirma que la biomatriz, además de retener muchos de los componentes de la MEC, también es diferente si se aísla de un tejido sano o de un tejido con cirrosis, por lo que la biomatriz refleja el estado en el que se encuentra el órgano.

* Los cultivos primarios de hepatocitos se desarrollan de forma diferente dependiendo del sustrato en el que son sembrados. Así, los cultivos de hepatocitos sobre colágena seca duran aproximadamente ocho días en cultivo, forman una monocapa pareja y confluyente y van perdiendo la capacidad de secretar albúmina (aproximadamente a los tres días en cultivo). Los cultivos desarrollados sobre la biomatriz de hígado normal, duran más de ocho días, forman estructuras parecidas a canalículos biliares y mantienen la capacidad de secretar albúmina, además, no presentan proliferación celular en ningún sistema de cultivo aquí desarrollado. Por estas características se piensa que los hepatocitos sembrados sobre la biomatriz mantienen sus funciones diferenciadas al menos utilizando como parámetro la secreción de albúmina.

* Los hepatocitos de ratas con cirrosis mantienen sus funciones diferenciadas sobre la biomatriz, pero los hepatocitos responden de manera diferente dependiendo del tipo de biomatriz en que son sembrados. Si son sembrados sobre una biomatriz de hígado

cirrótico, adquieren gradualmente la capacidad de secretar albúmina, pero si son sembrados sobre una biomatriz de hígado normal mantienen esta característica desde el inicio del cultivo. Entonces, al parecer, los hepatocitos que son sometidos a un daño crónico tienen la facultad de protegerse y mantenerse "intactos" y cuando son puestos en un medio óptimo pueden volver a ser funcionales.

* Los hepatocitos (ya sean normales ó cirróticos) sembrados sobre una biomatriz de hígado normal, inmediatamente secretan albúmina, porque encuentran un medio semejante al que pertenecen. Pero los sembrados sobre una biomatriz cirrótica pasan por un período de recuperación, donde al final recuperan sus funciones especializadas (al menos la síntesis de albúmina). Esto hace suponer que los hepatocitos tienen la capacidad de modificar la matriz extracelular para poder mantenerse funcionalmente diferenciados.

* Este sistema de cultivo puede ser un buen modelo para el estudio de patologías como la cirrosis hepática, donde los componentes de la MEC se alteran y para el estudio de las interacciones célula- matriz extracelular.

* Se comprueba la importancia de la comunicación celular con el medio que le rodea, la MEC tiene además de un papel estructural, otro igual o más importante, que es informacional. La MEC es uno de los medios que la célula utiliza para comunicarse con su entorno.

IX. PERSPECTIVAS

El modelo de cultivos primarios de hepatocitos sobre la biomatriz, puede abrir nuevos horizontes en la investigación de patologías como la cirrosis hepática. Este modelo es útil, por ejemplo, para poder establecer si los hepatocitos tienen un papel importante en el depósito de colágena cuando su entorno está alterado, cómo pueden modificar su entorno, si producen colagenasas o TIMPs etc.

Un sustrato como la biomatriz puede servir para sembrar células de Ito (FSC), que es la fuente principal de componentes de la MEC, y

poder establecer como se comportan en una biomatriz de hígado normal, células que ya fueron activadas (MYF).

Por otro lado, falta caracterizar de un modo más preciso los componentes de la biomatriz, esto se puede hacer con el uso de anticuerpos contra colágenas tipo I, II y IV, laminina, fibronectina, etc. Además, identificar los

tipos de GAG por medio de electroforesis o de digestiones diferenciales de GAG, para obtener relaciones de cada tipo de GAG, y también usar anticuerpos contra las proteínas núcleo de algunos PG.

Se pueden emplear las técnicas inmunohistoquímicas, para determinar la distribución de los componentes de la biomatriz al sembrar los hepatocitos y a diferentes días en cultivo, para ver como se reorganiza este sustrato dependiendo del tipo de célula con el que interacciona.

Es importante determinar si algún tipo de citocinas o metaloproteasas se encuentran presentes en las biomatrices aisladas, para establecer la participación de éstas en la activación o diferenciación de funciones de ciertos tipos

celulares, así como su papel en controlar la proliferación celular; por otra parte, resulta interesante el estudiar si dependiendo del tipo de biomatriz se atrapan o presentan mejor algunos de ellos, para de este modo regular el metabolismo de los cultivos.

También, es interesante conocer cómo se expresan los receptores celulares como las integrinas que comunican a la MEC con el citoesqueleto, en estos procesos fibrosantes, y conocer que reacciones desencadenan.

Por último, se puede estudiar el efecto de fármacos empleados en la terapéutica para la cirrosis hepática, como el mebendazol y otros más como la decorina que es un componente de la MEC.

X. REFERENCIAS

Acosta FM y Díaz de León L. Estudio comparativo de diferentes técnicas de aislamiento y cultivo de hepatocitos y su optimización. Tesis para obtener el grado de Biólogo. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 1994.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. 3th ed. Garland Publishing Inc, New York and London, 1994.

Bartold PM, Page RC. A microdetermination method for assaying glycosaminoglycans and proteoglycans. *Anal Biochem* 1985; 150: 320-324.

Ben-Ze'ev A, Robinson GS, Buchner NLR, Farmer SR. Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 2161-2165.

Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Ann Rev Cell Biol* 1992; 8: 365-393.

Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* 1969; 43: 506-520.

Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ. Isolated hepatocytes preparation, properties and applications. En: Burdon RH, van Knippenberg PH, eds. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Netherlands: Elsevier Science Publisher; 1991.

Biagini G, Ballardini G. Liver fibrosis and extracellular matrix. *J Hepatol* 1989; 8:115-124.

Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Op Cell Biol* 1995; 7: 728-735.

Bissell DM, Hammaker L, Meyer VA. Parenchymal cells from adult rat liver in non proliferating culture. *J Cell Biol* 1973; 59: 722-734.

Bissell DM, Arenson DM, Maher JJ, Roll FJ. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J Clin Invest* 1987; 79: 801-812.

Bissell DM. The extracellular matrix in the space of Disse: structure and function. En: Gressner AM, Ramadori G, eds. *Molecular and cell biology of liver fibrogenesis*. Lancaster, England: Kluwer, 1992; 471-478.

Bornstein P. Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J* 1992; 6: 3290-3299.

- Brill S, Holst PA, Zvibel I, Fiorino AS, Sigal SH, Somasundaran U, Reid LM. Extracellular matrix regulation on growth and gene expression in liver cell lineages and hepatomas. En: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. *The Liver: biology and pathobiology*, 3th ed. New York: Raven Press, 1994; 1367-1377.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Bucher N, Robinson G, Faremer S. Effects of extracellular matrix on hepatocyte growth and gene expression: implications for hepatic regeneration and the repair of liver injury. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 11-19.
- Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthopaed Rel Res* 1992; 282: 250-272.
- Burt AD. C.L. Oakley lecture: Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. *J Pathol* 1993; 170:105-114.
- Carlsson R, Engvall E, Freeman A, Ruoslahti E. Laminin and fibronectin in cell adhesion: Enhanced adhesion of cells from regenerating liver to laminin. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78: 2403-2407.
- Caron JM. Induction of albumin gene transcription in hepatocytes by extracellular matrix proteins. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 1239-1243.
- Carrel A. The new cytology. *Science* 1931; 73: 297-303.
- Chojkier M, Brener DA. Therapeutic strategies for hepatic fibrosis. *Hepatology* 1988; 8: 176-182.
- Chojkier M. Hepatocyte collagen production in vivo in normal rat. *J Clin Invest* 1986; 78: 333-389.
- Chojkier M, Lyeche K, Filip M. Increased production of collagen in vivo by hepatocytes and nonparenchymal cells in rats with carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *Hepatology* 1988; 8: 808-814.
- Clément B, Segui-Real B, Savagner P, Kleinman HK, Yamada Y. Hepatocyte attachment to laminin is mediated through multiple receptor. *J Cell Biol* 1990; 110: 185-192.
- Clayton DF, Harrelson AL, Darnell JE Jr. Dependence of liver-specific transcription on tissue organization. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 2623-2632.
- Clement B, Loreal O, Rescan PY, Levavasseur F, Diakonova M, Rissel M, L'Helgoualc'h, Guillozou A. Cellular origin of the hepatic extracellular matrix. En: Gressner AM, Ramadori G, eds. *Molecular and cell biology of liver fibrogenesis*. Lancaster, England: Kluwer, 1992; 85-98.
- Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, Giambrone MA, Wind W, Bienpica L, Zern MA. In vitro and in vivo association of transforming growth factor- β 1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol* 1989; 108: 2477-2482.
- Diegelmann RE, Guzelian PS, Gay R, Gay S. Collagen formation by the hepatocyte in primary monolayer culture and in vivo. *Science* 1983; 219: 1343-1345.
- DiPersio MC, Jackson DA, Zaret K. The extracellular matrix coordinately modulates liver transcription factors and hepatocyte morphology. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4405-4414.
- Díaz de León L, Massó F, Ocampo O. Factores involucrados en el daño hepático causado por alcohol. En: *Alcoholismo Visión Integral*. Trillas, 1986; 189-203.
- Elias H, Sherrick JC. *Morphology of the liver*. New York: Academic Press, 1969.
- Enat R, Jefferson DM, Ruiz-Opazo N, Gatmaitan Z, Leinwand LA, Reid LM. Hepatocyte proliferation in vitro: Its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81:1411-1415.
- Engel J, Taylor W, Paulsson M, Sage JI, Hogan B. Calcium binding domains and calcium-induced conformational transition of SPARC/MB-40/osteonectin, an extracellular glycoprotein expressed in mineralized and non-mineralized tissues. *Biochemistry* 1987; 26: 6958-6965.
- Ezzell R, Toner M, Hendricks K, Dunn JCY, Tompkins RG, Yarmush ML. Effect of collagen gel configuration on the cytoskeleton in cultured rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 1993; 208: 442-452.
- Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*. New York: Alan R. Liss, 1987.
- Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835.
- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Arenson DM, Bissell DM. Maintenance of differentiated phenotype of

cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J Biol Chem* 1989; 264: 10756-10762.

Frizell E, Shu-Ling L, Abraham A, LePoutre I, Sage H, Zern MA. SPARC gene expression in normal and fibrotic livers. *Hepatology* 1990; 12: 917A.

Fujita M, Spray DC, Choi H, Saez J, Watanabe T, Rosenberg LC, Hertzberg EL, Reid LM. Glycosaminoglycans and proteoglycans induce gap junction expression and restore transcription of tissue-specific mRNAs in primary liver cultures. *Hepatology* 1987; 7:(Suppl)15-95.

Geerts A, Greenwel P, Cunningham M, DeBlaser P, Rogiers V, Wisse E, Rojkind M. Identification of connective tissue gene transcripts in freshly isolated parenchymal, endothelial Kupffer and fat-storing cells by Northern hybridization analysis. *J Hepatol* 1993; 19: 148-158.

Greenwel P, Geerts A, Ogata I, Solis-Herruzo JA, Rojkind M. Liver fibrosis. En: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. *The Liver: biology and pathobiology*, 3th ed. New York: Raven Press, 1994; 1367-1377.

Greenwel P, Rubin J, Schuertz M, Hertzberg EL, Rojkind M. Liver Fat-Storing cells clones obtained from a CCl₄-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, interleukin-6, and connexin 43. *Lab Invest* 1993; 69: 210-216.

Gressner AM, Pazen H, Greiling H. The synthesis of total and specific glycosaminoglycans during development of experimental liver cirrhosis. *Experientia* 1977; 33:1290-1292.

Hirata K, Yoshida Y, Shiramatsu K, Freeman AE, Hayasaka H. Effects of laminin, fibronectin and type IV collagen on liver cell cultures. *Exp Cell Biol* 1983; 51: 121-129.

Hopwood JJ, Harrison JR. High-Resolution electrophoresis of urinary glycosaminoglycans: An improved screening test for the mucopolysaccharidoses. *Anal Biochem* 1982; 119: 120-127.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.

Kao J, Huey G, Kao R, Stern R. Ascorbic acid stimulates production of glycosaminoglycans in cultured fibroblasts. *Exp Mol Pathol* 1990; 53: 1-10.

Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Ann Rev Biochem* 1991; 60: 443-475.

Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 1982; 27: 6188-6193.

Knittel T, Armbrust T, Schwogler S, Shuppan D, Ramadori G. Distribution and cellular origin of undulin in rat liver. *Lab Invest* 1992; 67: 779-787.

Krull NB, Gressner AM. Differential expression of keratan sulphate proteoglycans fibromodulin, lumican and aggrecan in normal and fibrotic rat liver. *FEBS Lett* 1992; 312: 47-52.

Kuiper J, Brouwer A, Knook DL, van Berk el TJC. Kupffer and sinusoidal endothelial cells. En: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. *The Liver: biology and pathobiology*, 3th ed. New York: Raven Press, 1994; 761-818.

Kuri-Harcuch W, Mendoza-Figueroa T. Cultivation of adult rat hepatocytes on 3T3 cells: expression of various liver differentiated functions. *Differentiation* 1989; 41: 148-157.

Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 1980; 102: 344-352.

Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 440-447.

Landry J, Bernier D, Ouellet C, Goyette R, Marceau N. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: Histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J Cell Biol* 1985; 101: 914-923.

Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. *Texty/Atlas de Histología*. Interamericana: México, 1990; 475-498.

Lieber CS. Hepatic and metabolic effects of ethanol: Pathogenesis and prevention. *Ann Med* 1994; 26: 325-330.

Loréal O, Levavasseur F, Fromaget C, Gros D, Guillouzo A, Clément B. Cooperation of Ito cells and hepatocytes in the deposition of an extracellular matrix *in vitro*. *Am J Pathol* 1993; 143:538-543.

Maher JJ, Bissell DM, Friedman SL, Roll FJ. Collagen measured in primary cultures of normal rat hepatocytes

- derived from lipocytes within the monolayer. *J Clin Invest* 1988; 82:450-459.
- Martínez-Hernández A. The hepatic extracellular matrix I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab Invest* 1984; 51: 57-74.
- Martínez-Hernández A. The hepatic extracellular matrix II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl₄ induced cirrhosis. *Lab Invest* 1985; 53:166-186.
- Martínez-Hernández A, Martínez DF, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagen types I, III, IV, laminin, and fibronectin. *Lab Invest* 1991; 64:157-166.
- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *TIG* 1990; 6.
- Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor β ; Implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* 1990; 11: 599-605.
- McGuire RF, Bissell DM, Boyles J, Roll FJ. Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. *Hepatology* 1992; 15: 989-997.
- Meyer B, Luo H, Bargetzi M, Renner EL, Stalder GA. Quantitation of intrinsic drug-metabolizing capacity in human liver biopsy specimens: Support for the intact-hepatocyte theory. *Hepatology* 1991; 13: 475-481.
- Michalopoulos G, Pitot HC. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. *Exp Cell Res* 1975; 94:70-78.
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, Riecken EO, Stein H. Cellular localization of laminin gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1989; 134: 1175-1182.
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, Surrenti C, Riecken EO, Stein H. Cellular localization of type I, III and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1990; 137: 59-70.
- Miyai K. Structural organization of the liver. In: Meeks RG, Harrison SD, Bull RJ, eds. *Hepatotoxicology*. Boca Raton: CRC Press, 1991; 1-65.
- Moshage H, Casini A, Lieber CS. Acetaldehyde selectively stimulates collagen production in cultured rat liver fat-storing cells but not in hepatocytes. *Hepatology* 1990; 12: 511-518.
- Murphy-Ullrich JF, Lightner VA, Aukhil I, Yan YZ, Erickson HP, Hook M. Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. *J Cell Biol* 1991; 115: 1127-1136.
- Murray M, Farrell GC. Different effects of carbon tetrachloride toxicity and cirrhosis on substrate binding to rat hepatic microsomal cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 2001-2003.
- Nathanson MH, Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 1991; 14:68-91.
- Paglia L, Wilczek J, Díaz de León L, Martín GR, Horlein D, Müller P. Inhibition of procollagen cell-free synthesis by amino terminal extension peptides. *Biochemistry* 1979; 18: 5030-5034.
- Panduro A, Shalaby F, Biempica L, Shafritz DA. Changes in albumin, α -fetoprotein and collagen gene transcription in CCl₄ induced hepatic fibrosis. *Hepatology* 1988; 8: 259-266.
- Páez A y Díaz de León L. Mebendazol y cirrosis hepática experimental. Tesis para obtener el grado de Química Farmacéutica Bióloga. ENEP Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. 1986.
- Parés A, Potter JJ, Rennie L, Mezey E. Acetaldehyde activates the promoter of the mouse $\alpha_2(I)$ collagen gene. *Hepatology* 1994; 19: 498-503.
- Paulsson M, Deutzmann R, Dziadek M, Nowack H, Timpl R, Weber S, Engel J. Purification and structural characterization of intact and fragmented nidogen obtained from a basement membrane tumor. *Eur J Biochem* 1986; 156: 467-478.
- Phillips S, Poucell J, Patterson J, Valencia P. *The liver: An atlas and text of ultrastructural pathology*. Raven Press, New York. 1987.
- Ponce ML, Rojkind M. Rat hepatocytes attach to laminin present in liver biomatrix proteins by an Mg⁺⁺-dependent mechanism. *Hepatology* 1995; 22: 620-628.
- Popper H. Hepatology in the next seventy-five years. In: Berk PD, Chalmers TC, eds. *Frontiers in liver disease*. New York: Thieme Stratton, 1981; 336-339.
- Popper H. Introduction: Organizational principles. En: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz

DA, eds. *The liver: biology and pathobiology*, 2nd ed. New York: Raven Press, 1988; 3-6.

Ramadori G, Knittel T, Odenthal M, Schwogler S, Neubauer K. Synthesis of cellular fibronectin by rat liver fat-storing (Ito) cells: regulation by cytokines. *Gastroenterology* 1992; 103: 1313-1321.

Rao MS, Bendayan M, Kimbrough RD, Reddy JK. Characterization of pancreatic-type tissue in the liver or rat induced by polychlorinated biphenyls. *J Histochem Cytochem* 1986; 34:197-201.

Rao MS, Dwivedi RS, Yeldandi AV, et al. Role of periductal and ductular epithelial cells of the adult rat pancreas in pancreatic hepatocyte lineage. A change in the differentiation commitment. *Am J Pathol* 1989; 134: 1069-1086.

Reid LM, Fiorino AS, Sigal SH, Brill S, Holst PA. Extracellular matrix gradients in the space of Disse: relevance to liver biology. *Hepatology* 1992; 15: 1198-1203.

Rescan PY, Loréal O, Hassell JR, Yamada Y, Guillouzo A, Clément B. Distribution and origin of the basement membrane component perlecan in rat liver and primary hepatocyte culture. *Am J Pathol* 1993; 142: 199-208.

Rieder H, Ramadori G, Schwogler S, Meyer Zum Buschenfelde KH. Thrombospondin, a matrix protein of the Disse space, is mainly produced by sinusoidal endothelial liver cells. In: Gressner AM, Ramadori G, eds. *Molecular and cell biology of liver fibrogenesis*. Lancaster, England: Kluwer, 1992; 85-98.

Rojkind M, Diaz de León L. Collagen biosynthesis in cirrhotic rat livers slices a regulatory mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1970; 217: 512-522.

Rojkind M, Kershenovich D. Effect of colchicine on collagen, albumin and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver slices. *Biochimica et Biophysica Acta* 1975; 378: 415-423.

Rojkind M, Gatmaitan Z, Mackensen S, Giambione MA, Ponce P, Reid LM. Connective tissue biomatrix: Its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1980; 87: 255-263.

Rojkind M, Greenwel P. The extracellular matrix of the liver. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jacoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. *The liver: Biology and Pathobiology*, 3th ed. New York: Raven Press, 1994; 843-868.

Rojkind M, Novikoff PM, Greenwel P, Rubin J, Rojas-Valencia L, Campos de Carvalho A, Stockert R, Spray D, Hertzberg EL, Wolkoff AW. Characterization and functional studies on rat liver fat-storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system. *Am J Pathol* 1995; 146: 1508-1520.

Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991; 64: 867-869.

Ruoslahti E, Pierschbacher MD, Border WA. Cell-extracellular matrix interactions. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jacoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. *The liver: Biology and Pathobiology*, 3th ed. New York: Raven Press, 1994; 899-906.

Sawada N, Tomomura A, Sattler CA, Sattler GL, Kleinman HK, Pitot HC. Extracellular matrix components influence DNA synthesis of rat hepatocytes in primary culture. *Exp Cell Res* 1986; 167: 458-470.

Schwarzbauer JE. Alternative splicing of fibronectin: three variants, three functions. *BioEssays* 1991; 13: 527-533.

Sigal SH, Brill S, Fiorino AS, Reid L. The liver as a cell stem and lineage system. *Am J Physiol* 1992; 263: 139-148.

Sirica AE, Richards W, Tsukada Y, Sattler CA, Pitot HC. Fetal phenotypic expression by rat adult hepatocytes on collagen gel/nylon meshes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 283-287.

Soto H, Massó F, Cano S, Diaz de León L. Effects of mebendazole on protein biosynthesis and secretion in human-derived fibroblast cultures. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 289-299.

Sykes B, Puddle B, Francis M, Smith R. The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Comm* 1976; 72: 1472-1480.

Terada T, Nakanuma Y. Immunohistochemical demonstration of pancreatic alpha-amylase and trypsin in intrahepatic bile ducts and peribiliary glands. *Hepatology* 1991; 14: 1129-1135.

Troll W, Lindsley J. A photometric method for the determination of proline. *J Biol Chem* 1955; 215: 655-660.

T'seng SCG, Lee PC, Ells PF, Bissell MD, Smuckler EA, Stern R. Collagen production by rat hepatocytes and sinusoidal cells in primary monolayer culture. *Hepatology* 1982; 2: 13-18.

Van Eyken P, Geerts A, De Bleser P, Lazou JM, Vrijsen R, Sciot R, Wisse E, Desmet VJ. Localization and cellular source of the extracellular matrix protein tenascin in normal and fibrotic rat liver. *Hepatology* 1992; 15: 909-916.

Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. 2nd ed. John Wiley & Sons, USA, 1995.

Volpes R, Van den Oord JJ, Desmet VJ. Distribution of the VLA family of integrins in normal and pathological human liver tissue. *Gastroenterology*. 1991; 101:200-206.

Wake K, Motomatsu K, Eukataksin W. Postnatal development of the perisinusoidal stellate cells in the rat liver. En: Wisse E, Knook DL, McCuskey RS, eds. *Cells of the hepatic sinusoid*. Rijswijk: The Kupffer Cell Foundation, 1991; 269-275.

Weibel ER, Stäubli W, Gnägi HR, Hess FA. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol*. 1969; 42:68-91.

Weiner FR, Giambrone MA, Czaja MJ, Shah A, Annoni G, Takahashi S, Eghbali M, Zern MA. Ito cell gene expression and collagen regulation. *Hepatology* 1990; 11: 111-117.

Weiner FR, Shah A, Biempica L, Zern MA, Czaja MJ. The effects of hepatic fibrosis on Ito cell gene expression. *Matrix* 1992; 11: 36-43.

Wilson EJ, McMurray WC. Effects of hormones on the maintenance and mitochondrial functions of rat hepatocytes cultured in serum-free medium. *Cancer J Biochem Cell Biol* 1983; 61: 636-643.

Wisse, Geerts A, Bouwens L, Vanderkerken K, Van Goethem F. An attempt to review the IVth international Kupffer cell symposium. *Cell of hepatic sinusoid Anno*. 1988.

Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961; 93: 440-447.

Wu CH, Donovan CB, Wu GY. Evidence for pretranslational regulation of collagen synthesis by procollagen propeptides. *J Biol Chem* 1986; 261: 10482-10484.

Yamada KM, Miyamoto S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Op Cell Biol* 1995; 7: 681-689.

Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor- β by proteoglycan decorin. *Nature* 1990; 346: 281-284.