



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**METABOLISMO DE LA COLÁGENA
DESPUÉS DE LA RESECCIÓN DE 70% DEL
HÍGADO NORMAL Y FIBRÓTICO DE LA RATA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A**

M. en C. JUAN ANTONIO SUAREZ CUENCA

**DIRECTOR DE TESIS
DR. ROLANDO E. HERNÁNDEZ MUÑOZ**

**COMITÉ TUTORAL
DRA. VICTORIA E. CHAGOYA DE SÁNCHEZ
DRA VILMA MALDONADO LAGUNAS**



MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2009

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ROLANDO E. HERNÁNDEZ MUÑOZ, EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

SE REALIZÓ CON EL APOYO DE UNA BECA DE ESTUDIOS DE DOCTORADO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, ASÍ COMO BECA DE APOYO COMPLEMENTARIA DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

“...a Dios no puede sobrevenirle ninguna ciencia nueva, de manera que sepa ahora lo que no ha sabido antes”.

Gracias por permitir aproximarme.

“El deseo de "enseñar", y "enseñar de corazón", crea en los alumnos un agradecimiento, que constituye terreno idóneo para el apostolado.”.

Gracias por confiar en mí Dr. Rolando.

“El encontrar un maestro desinteresado es la mejor fortuna que puede tener un alumno descarriado”.

Gracias Vilma, Jorge y Dra. Chagoya.

“El agradecimiento es una virtud, es la memoria del corazón y mira siempre grande el favor que recibió”

Gracias por sus comentarios Drs. Ruy Pérez Tamayo,
Ma. Lourdes Rodríguez Frago, y
Mauricio Díaz Muñoz y Jesús Chimal Monroy

“Si juzgas que tienes pocos bienes para agradecer a Dios, agrádesele al menos...los muchos males que no tienes en la vida”.

Gracias por la paciencia Yeli, Poulet y Poletina.

“Las más bellas palabras en labios de una persona son mamá y papá. Las llamada más dulce: padres míos”.

Gracias mamá y papá (y Moroco) por estar siempre conmigo.

“El corazón de un verdadero amigo es el único capital del sentimiento que nunca quiebra, y con el cual se puede contar siempre y en todo tiempo con toda seguridad”.

Gracias amigos Marisela, Edgar, Serafín, Lulú, César, Vicky, Juan, Gaby,
Lidia, Cristina, Lucy, Susanita, Julian, Céline, Melchy, José Luis, Aldo,
Dr. José Juan Lozano, Dra. Sophie Lotersztajn, Dr. Philippe Mathurin, Dr. Ramón Bataller...

INDICE	Página
I. RESUMEN	4
II. ABREVIATURAS	5
III. INTRODUCCIÓN	6
IV. ANTECEDENTES	7
4.1 Propiedades de la matriz extracelular (MEC) hepática	8
4.2 Metabolismo de la MEC	9
4.3 Modelo del equilibrio tisular hepático	11
4.4 Pérdida de la homeostasis	12
4.5 La respuesta hepática	13
4.6 La regeneración hepática	14
4.7 La fibrosis hepática y cirrosis	16
4.8 La progresión y la reversión de la fibrosis hepática	17
4.9 La MEC en la regeneración del hígado fibrótico	20
V. HIPÓTESIS	22
VI. OBJETIVOS	23
VII. JUSTIFICACIÓN	24
VIII. METODOLOGÍA	25
IX. RESULTADOS	31
9.1 Obtención del modelo de fibrosis inmunológica	31
9.2 Regeneración del hígado fibrótico post-HP70%	32
9.2.1 Recuperación de la masa hepática	32
9.2.2 Elevación de los indicadores de proliferación	32
9.3 Evaluación morfológica del hígado fibrótico post-HP70%	34
9.3.1 Reducción del grado de fibrosis (escala histológica)	34
9.3.2 Reducción del área de fibrosis (estimación morfométrica)	34
9.3.3 Reducción del contenido de colágena hepática	36
9.4 Metabolismo de la colágena post-HP70%	38
9.4.1 Estimulación transcripcional de la colágena (síntesis del RNAm)	38
9.4.2 Estimulación del recambio de la prolina	38
9.4.3 Estimulación síntesis colagénica (prolina incorporada a colágena)	38
9.4.4 Estimulación de la degradación matricial (actividad total de colagenasa y expresión de gelatinasas, MMP-13, TIMP-1 y TIMP-2)	41
9.4.5 Persistencia de las CEH activadas post-HP70%	44
X. DISCUSIÓN	46
XI. CONCLUSIONES	52
XII. REFERENCIAS	53
XIII. PERSPECTIVAS	64
XIV. ARTÍCULO	64

I. RESUMEN

La fibrosis que acompaña a la enfermedad hepática crónica, se caracteriza por un depósito excesivo de matriz extracelular (MEC), que junto con una arquitectura hepática modificada y la alteración en la proliferación de hepatocitos constituyen los cambios cirróticos observados en la etapa final de la progresión fibrótica. Sin embargo, tanto el hígado fibrótico como cirrótico son capaces de regenerar después de una hepatectomía parcial al 70% (HP70%), presentando modificaciones variables de la MEC durante este proceso. En el presente trabajo se caracterizaron dichas modificaciones a través de la evaluación del metabolismo colagénico, considerando que el nuevo equilibrio entre síntesis y degradación de la MEC constituye una respuesta adaptativa del hígado fibrótico ante el estímulo regenerativo. Para este objetivo, se utilizó el modelo animal de fibrosis de tipo inmunológico. Se inyectó suero porcino por vía intraperitoneal a ratas Wistar macho durante 9 semanas, y posteriormente se sometieron a una HP70%, o controles falsamente operados, seguido de un período de evaluación a los 1, 3, 7 y 30 días. Se realizó el análisis histológico así como la estimación de la proliferación celular y la fibrosis en el tejido hepático. Posteriormente, se estudió la regulación de la síntesis de la colágena a nivel transcripcional, la cantidad de proteína depositada y la actividad de degradación matricial. Se encontró que el contenido de la colágena se redujo hasta 75% después de la HP70% en el hígado fibrótico. Durante la regeneración, el hígado fibrótico oxidó activamente la prolina libre y redujo sus niveles de RNAm de colágena α -1 (I), lo cual resultó en una menor síntesis de colágena. La HP70% también incrementó la actividad de colagenasa total, que se asoció a la expresión de pro-MMP-9, MMP-2 y MMP-13, acompañada de una menor expresión de TIMP-1 y TIMP-2. Es posible diferenciar una etapa de regeneración temprana donde existe: 1) disminución en la síntesis de colágena, 2) degradación leve de la MEC y 3) regeneración activa. Esta etapa fue seguida de: 4) mayor colagenólisis y 5) un depósito limitado de MEC, probablemente asociado al incremento en la función mitocondrial. Las CEH activadas incrementaron durante la fibrosis y continuaron presentes después de la HP70%; sugiriendo su participación tanto en la progresión fibrótica como en la regeneración hepática en este modelo. No se puede descartar la participación de otras células (hepatocitos, células de Kupffer y células endoteliales sinusoidales), así como otros procesos con potencial para la remodelación matricial. En conclusión, la inducción de la regeneración hepática mediante HP70% restaura el balance entre la síntesis y la degradación de la MEC, mostrando una remodelación matricial que favorece la resolución casi completa de la fibrosis hepática. Tanto la actividad mitocondrial como las CEH activadas parecen jugar un papel regulador de la remodelación matricial en este modelo.

II. ABREVIATURAS

MEC	=	Matriz extracelular
CEH	=	Células estelares hepáticas
MMPs	=	Metaloproteinasas de matriz extracelular
TIMPs	=	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
CCl ₄	=	Tetracloruro de carbono
TNF α	=	Factor de necrosis tumoral alfa
IL-6	=	Interleucina 6
IL-10	=	Interleucina 10
IL1- β	=	Interleucina 1 beta
HGF	=	Factor de crecimiento de hepatocitos
DNA	=	Acido desoxirribonucleico
RNA	=	Acido ribonucleico
RNA _m	=	Acido ribonucleico mensajero
TGF β	=	Factor de crecimiento transformante beta
PCNA	=	Antígeno nuclear de células en proliferación
DDR2	=	Receptor con dominio de discoidina
EGF	=	Factor de crecimiento epidérmico
FGF	=	Factor de crecimiento fibroblástico
VEGF	=	Factor de crecimiento del endotelio vascular
ALR	=	Estimulante de la regeneración hepática
HP70%	=	Hepatectomía parcial de 70% de la masa hepática
post-HP70%	=	Posterior a la hepatectomía parcial de 70% de la masa hepática
α -SMA	=	Actina de músculo liso tipo alfa
NGF	=	Factor de crecimiento neuronal
p ⁷⁵ NTR	=	Receptor del factor de crecimiento neuronal

III. INTRODUCCIÓN

La enfermedad hepática crónica es una entidad frecuente en nuestro país, con tasas de morbi – mortalidad elevadas (1-3). Aquí, la progresión fibrótica subyacente se asocia a un mal pronóstico, debido a que eventualmente conduce a la cirrosis hepática y sus complicaciones (4).

Sin embargo, el hígado fibrótico mantiene su capacidad para regenerar, y el tejido conectivo experimenta modificaciones variables durante este proceso (5).

En modelos animales de fibrosis y regeneración se ha demostrado que: 1) el estado redox, 2) la tasa de síntesis de colágena y 3) el equilibrio entre metaloproteinasas matriciales y sus inhibidores específicos, son factores que participan en la remodelación de la matriz extracelular (MEC) y en una adecuada reparación del tejido hepático. Además, varios estudios experimentales sugieren el papel de la MEC como reguladora misma de la fibrogénesis y proliferación en el hígado fibrótico. Las posibles vías incluyen la regulación transcripcional, el depósito y modificación post-traducciona l de componentes matriciales, cambios en la maquinaria enzimática de degradación, la activación celular, la síntesis y la liberación de citocinas (6-8).

Este trabajo explora el metabolismo de la MEC y su equilibrio adaptativo, como respuesta homeostática durante la regeneración del hígado fibrótico, que además se asocia a la reparación tisular.

IV. ANTECEDENTES

El hígado se considera la glándula de mayor tamaño en el organismo. Constituye del 1.8% al 3.1% del peso corporal y entre sus principales funciones se cuentan la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, así como la eliminación de sustancias tóxicas (9).

Histológicamente, el parénquima hepático (80% del tejido hepático) está formado por distintas poblaciones celulares que proporcionan las características morfológicas y funcionales únicas de este órgano (9).

Los hepatocitos (70-80%) cumplen con las funciones de la síntesis proteica, las vías del metabolismo intermediario, la formación de bilis, el catabolismo de fármacos (9) y además participan importantemente en la degradación de MEC (10). Las células estelares hepáticas (CEH, también conocidas como lipocitos, las células de Ito o las células de almacén lipídico) se localizan en el espacio de Disse y son inferiores en número a los hepatocitos. Estas células se encargan del almacén de la vitamina A, la regulación de la contractilidad sinusoidal y tienen cualidades fibroblásticas. Las células endoteliales sinusoidales tienen funciones de filtración, endocitosis, presentación de antígenos y secreción de citocinas. Las células de Kupffer son macrófagos hepáticos con capacidad endocítica, fagocítica y secretan varios mediadores pro-inflamatorios. Las demás poblaciones celulares incluyen a las células del epitelio biliar, las células ovoides y las células de Pitt (9,11).

El resto del tejido hepático libre de células (20%) constituye la MEC, cuya proteína más abundante es la colágena. Ésta, constituye el 25-30% del total de las proteínas matriciales y su contenido en el hígado es de 5.5 ± 1.6 mg/gr de tejido hepático. Podemos encontrar colágenas en sus variedades genéticas tipo I (33%), III (33%), V (7-10%), y las colágenas no fibrilares (tipo membrana basal) IV, VI y XIV (1-2%) (9). Debido al elevado contenido de colágena en la MEC, se acepta que esta proteína (incluyendo los tipos I, III y IV) y algunas enzimas encargadas del recambio colagénico, son marcadores que reflejan en buena medida la cantidad de MEC y su remodelación en el hígado. La MEC también está compuesta de elementos no colagénicos como la fibronectina, la laminina, la elastina, los proteoglicanos, los glucosaminoglucanos, agua y algunos minerales (12-17).

Tanto los hepatocitos como las células del sinusoides hepático participan activamente en el recambio de la MEC a través de la interacción regulada entre las células hepáticas, los procesos de activación / inactivación celular, la secreción de citocinas y factores de crecimiento así como enzimas con capacidad degradativa matricial (9-11,18), (figura 1).

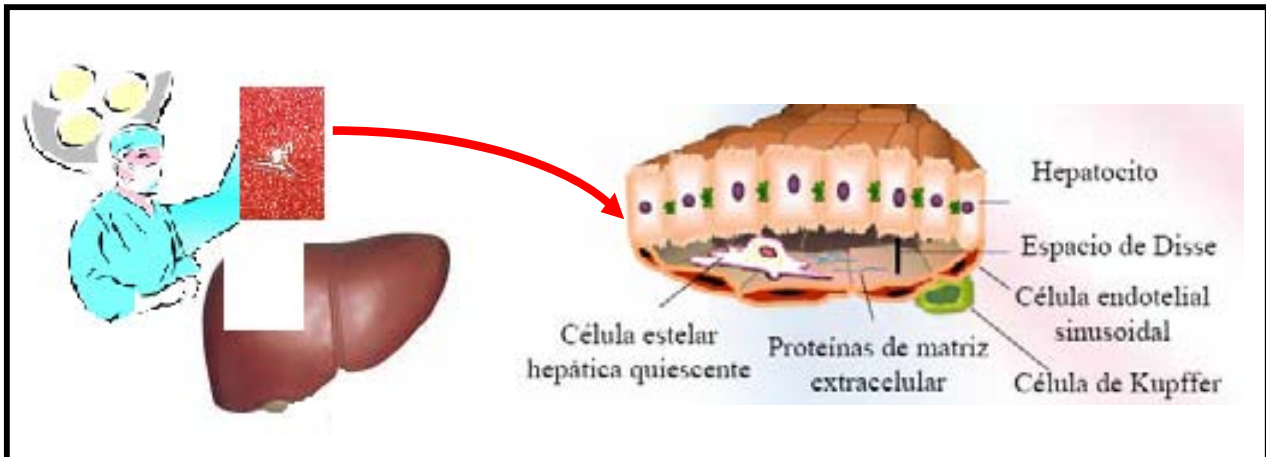


Figura 1. La organización celular y de la MEC en el hígado sano. Se muestra la distribución de las poblaciones celulares hepáticas y las proteínas matriciales en el hígado sano. (Basado en la referencia 19).

4.1 PROPIEDADES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR HEPÁTICA

La MEC es una estructura biológica compleja, y no solamente un esqueleto físico. Actúa como un agonista de fase sólida cuya remodelación tiene un papel clave en procesos como la angiogénesis, inflamación, fibrogénesis, regeneración, reparación, invasión tumoral y metástasis (20,21).

A nivel celular, la MEC regula actividades como la adhesión, migración, diferenciación, proliferación, apoptosis y activación / inactivación fibrogénica a través de distintos mecanismos (6,16). Por ejemplo, las proteínas matriciales interactúan con receptores celulares, lo que constituye un proceso esencial para la función diferenciada de las células residentes del hígado (19); o bien, las proteínas de la MEC secuestran y liberan citocinas, regulando así estímulos para la activación de células hepáticas, la migración de células inflamatorias y la reparación tisular (6).

La MEC del hígado se caracteriza por su alta capacidad de remodelación. Esto es evidente al observar la respuesta del hígado ante distintos tipos de estímulos como: a) la regeneración completa del tejido hepático tras una lesión aguda, b) la formación de una cicatriz con distorsión tisular tras un estímulo fibrogénico, o bien una combinación de ambas (18,22,23).

4.2 METABOLISMO DE LA MEC

Básicamente, el recambio de la MEC resulta del equilibrio entre dos procesos simultáneos pero opuestos: la biosíntesis y la degradación (24).

La síntesis de la colágena es parcialmente regulada por la disponibilidad del sustrato, particularmente de la prolina. Además, su depósito es complejo debido a que se trata de una proteína insoluble y extracelular, por lo que se sintetiza como un precursor soluble, que al alcanzar el medio extracelular sufre transformaciones que le permiten ser insoluble y poder acomodarse en la MEC, al mismo tiempo que aumenta su estabilidad (23,24), (cuadro 1).

CUADRO 1. Síntesis de colágena		
LOCALIZACIÓN	MODIFICACIÓN	RESPONSABLE DE LA MODIFICACIÓN
Intracelular	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de cadenas polipeptídicas • Hidroxilación de prolinas • hidroxilación de lisinas • Glucosilación de la proteína 	<ul style="list-style-type: none"> → <i>MAQUINARIA DE SINTESIS PROTEICA</i> → <i>PROLYL - HIDROXILASA</i> → <i>LYSYL - HIDROXILASA</i> → <i>GLICOSIL-TRANSFERASA Y GALACTOSIL- GLICOSILTRANSFERASA.</i>
Extracelular	<ul style="list-style-type: none"> • Corte de propéptidos • Formación de "entrecruzamientos" 	<ul style="list-style-type: none"> → <i>N - PEPTIDASA DE PROCOLÁGENA Y C - PEPTIDASA DE PROCOLÁGENA</i> → <i>LYSYL - OXIDASA, TRANSGLUTAMINASA</i>

La colágena sufre varias modificaciones antes y después de su depósito en la MEC que le permiten ser una proteína extracelular, insoluble y estable (Tomado de referencias 24 y 25).

Por otro lado, la degradación de colágena es particularmente difícil debido a su arquitectura tridimensional, su estabilidad conferida por modificaciones post-traduccionales y su resistencia frente a proteasas inespecíficas (24,26).

La degradación de la MEC ocurre gracias una familia de enzimas llamadas metaloproteinasas de matriz extracelular o MMPs (cuadro 2), que son metaloenzimas que contienen zinc en su estructura y se secretan en forma de pro-enzimas hacia el espacio extracelular. El mecanismo de activación tiene que ver con la pérdida del contacto, y consecuentemente de la estabilidad, que ejerce un residuo de cisteína sobre el centro reactivo de zinc en un dominio de la pro-enzima. Este mecanismo de activación es conocido como “switch de cisteína” (26).

Su actividad enzimática también la regula una familia de inhibidores tisulares de metaloproteinasas o TIMPs, que presentan una estequiometría 1:1 respecto a las MMPs (cuadro 3). El equilibrio entre MMPs y TIMPs, así como la actividad enzimática secuencial, determinan en gran medida la degradación de la MEC (27).

CUADRO 2. MMPs, metaloproteasas de matriz extracelular			
ENZIMA	CLAVE	SUSTRATO	FUENTE
<i>Colagenasas</i>			
Colagenasa-1	MMP-1 Intersticial humano	Colágena tipo I, II, III, VII, VIII, X, gelatina, fibronectina, laminina, agrecano, serpinas.	Células de Ito, hepatocitos Neutrófilo, músculo y riñón.
Colagenasa-2	MMP-8 Neutrófilo		
Colagenasa-3	MMP-13 Intersticial rata		
<i>Gelatinasas</i>			
Gelatinasa A	MMP-2	Colágena desnaturalizada. Colágena nativa tipo IV, V, VII, X, XIV, elastina, fibronectina, agrecano, precursores de TNF.	Células de Ito, hepatocitos. Células de Kupffer.
Gelatinasa B	MMP-9		
<i>Estromelisinias</i>			
Estromelisinina-1	MMP-3	Colágena III, IV, V, IX, X, gelatina, PGs, fibronectina, laminina, precursor TNF. Elastina, col IV, gelatina, precursor TNF. Colágena IV, fibronectina, laminina, y PGs.	Células del estroma, hepatocitos, corazón, pulmón y riñón. Células epiteliales
Estromelisinina-2	MMP-10		
Estromelisinina-3	MMP-11		
Metaloelastasa	MMP-12		
Matrilisina (útero)	MMP7		
<i>MMPs - tipo membranal</i>			
MT ₁ -MMP		Pro-MMP-2 (complejo con TIMP-2), colágena I, II, III, gelatina, agrecano, fibronectina y laminina	Fibroblastos, células tumorales pulmón, mama, gastrointestinales, sistema nervioso, etc.
MT ₂ -MMP	MMP-14		
MT ₃ -MMP	MMP-15		
MT ₄ -MMP	MMP-16		
MT ₅ -MMP	MMP-17		
	MMP-18	Gelatina, precursor de TNF.	

La degradación de la MEC se lleva a cabo mediante la acción secuencial de MMPs, que tienen diferente origen y tienen especificidad por componentes de la MEC. (Basado en las referencias 10,27-30).

CUADRO 3. TIMPS, inhibidores tisulares de MMPs

INHIBIDOR TISULAR	SUSTRATO	FUENTE
TIMP-1	Colagenasas intersticiales (MMP-1, MMP-13) , estromelisina y pro-MMP-9	Células de Ito, células de Kupffer, hepatocito.
TIMP-2	Pro-MMP-2 y se ha involucrado en su activación en complejo con MT ₁ -MMP. MMP-2 activa.	Células de Ito, hepatocito.
TIMP-3	Se une a varios componentes de la MEC, TACE.	Fibroblastos, MEC de embiones de pollo, ratón. Membrana fetal y tumores cerebrales de humano
TIMP-4	Probablemente pro-MMP-2	MEC de cerebro, corazón, riñón, colon, páncreas, gónadas, células madre en sistema nervioso, membrana fetal, endotelio vascular y plaquetas de humano.

Los TIMPs son proteínas que interactúan con las MMPs, con cierta selectividad, y limitan de esta forma la actividad degradativa de matriz extracelular. (*Basado en las referencias 10,28,31,32*).

A nivel celular, tanto los hepatocitos como las células de Kupffer, las CEH y las células endoteliales sinusoidales llevan a cabo la síntesis y degradación basal de la MEC, de una manera organizada y altamente regulada (11).

4.3 MODELO DEL EQUILIBRIO TISULAR HEPÁTICO

Para entender mejor los mecanismos fisiológicos que mantienen la estructura y función del hígado, se puede considerar a este órgano como un microambiente heterogéneo con un sistema de regulación que permite el equilibrio entre tejidos (9).

Aquí, cada población celular o componente de la MEC son elementos importantes que se mantienen en cantidades constantes e interactúan para alcanzar la homeostasis, logrando la conservación morfológica y funcional del tejido. Los metabolitos, citocinas y factores de crecimiento producidos en el hígado y fuera de él, regulan la expresión de genes que participan en la proliferación celular y el metabolismo de la MEC. Así, los eventos locales son responsables de la regulación a nivel tisular, mientras que los cambios sistémicos también participan, pero en menor medida (6,9,12), (figura 2).

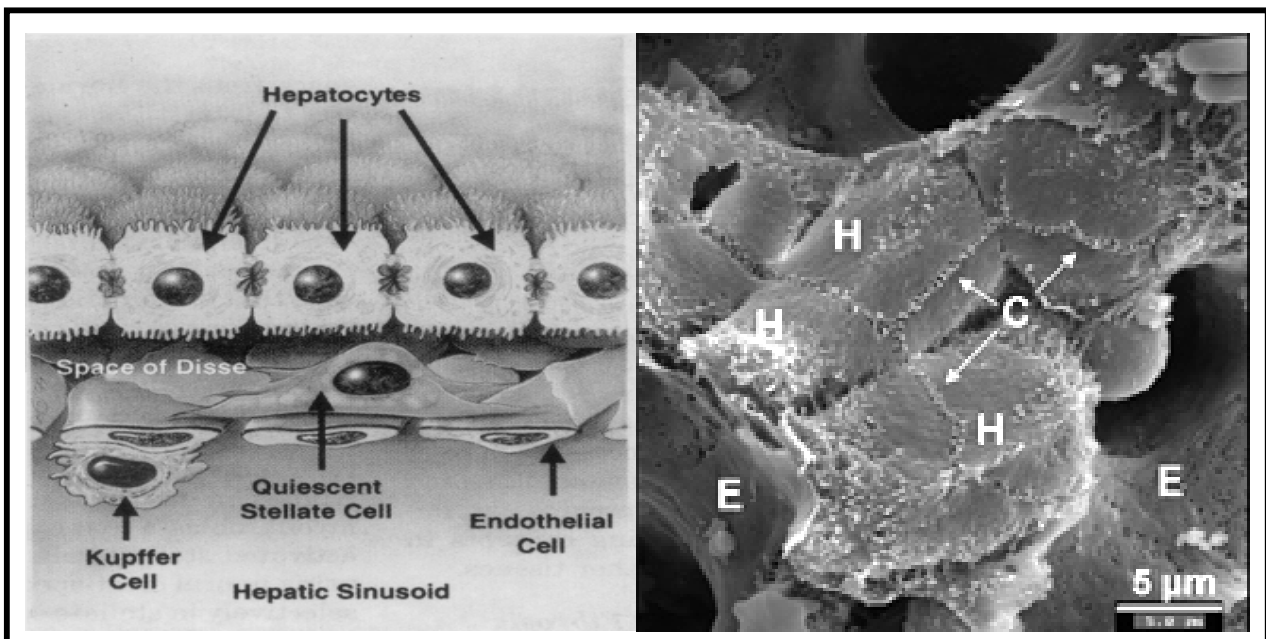


Figura 2. El equilibrio tisular hepático. *Izquierda*, dibujo de la morfología y disposición de las poblaciones celulares en el hígado. *Derecha*, imagen de microscopía de barrido (10000x) que muestra la interrelación entre hepatocitos (**h**), células del canalículo biliar (**c**) y células del endotelio sinusoidal (**e**). (Tomado de las referencias 19,33).

4.4 PÉRDIDA DE LA HOMEOSTASIS

Existen varios estímulos capaces de modificar la homeostasis del equilibrio tisular hepático. De acuerdo a su naturaleza pueden ser de tipo genético, metabólico, infeccioso, inmunológico, colestásico, alcohólico o inducido por tóxicos. Son variables en cuanto a su intensidad y duración, pudiendo durar semanas, meses o años (9).

Si ocurrieran cambios en la función celular, independientemente de una lesión hepática evidente, que provocaran el desequilibrio de metabolitos, citocinas y/o factores de crecimiento, se alterarían los mecanismos normales de comunicación célula-célula o célula-matriz, y/o se modificarían la homeostasis del órgano. En tal caso, el sistema homeostático cuenta con mecanismos específicos para restaurar su normalidad frente a los estímulos que amenacen su equilibrio (18,34).

4.5 LA RESPUESTA HEPÁTICA

Ante un cambio en los mecanismos homeostáticos, el hígado cuenta con dos tipos de respuesta: 1) la prevención de un daño mayor, y 2) la división celular y curación del tejido después de la lesión. Los factores que determinan la respuesta hepática no son claros; sin embargo, se conoce que la respuesta es diferente dependiendo del estímulo o daño. Por ejemplo: a) frente a una lesión aguda, intensa o que destruya muchas células; la disminución de la reserva funcional hepática, las citocinas y factores de crecimiento inducirán la regeneración hepática (9,18,34), (figura 3).

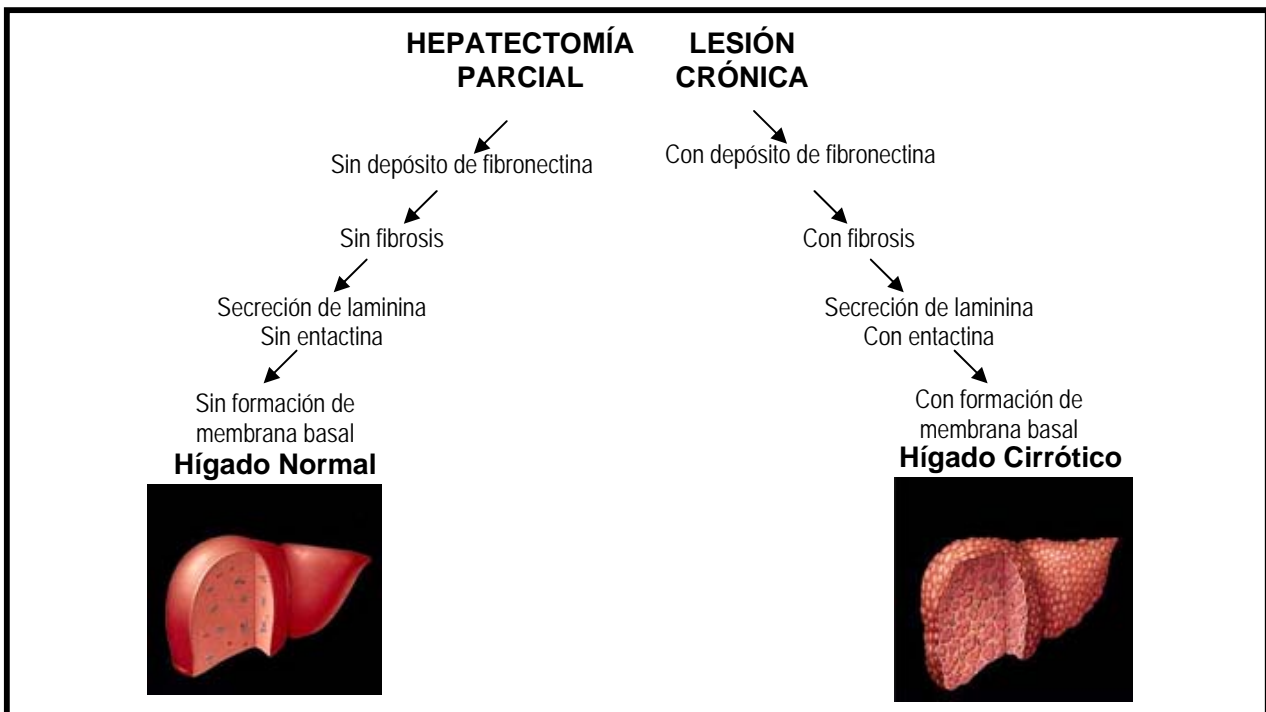


Figura 3. La respuesta hepática ante distintos tipos de lesión. El esquema muestra las distintas características que adquiere la MEC, de acuerdo al tipo de estímulo y al tipo de respuesta, que conducen al hígado hacia la regeneración o a la cirrosis hepática (Tomado de la referencia 16).

Pero si, b) el daño es pequeño, repetitivo y crónico, los intentos por restaurar la homeostasis son insuficientes, conduciendo a la fibrosis o cirrosis observables en el hígado enfermo. En la mayoría de los casos de fibrosis progresiva y cirrosis, es posible observar una combinación de ambas respuestas. Aquí, las características genotípicas y fenotípicas del individuo son factores que también influyen en la respuesta hepática ante estímulos nocivos (19).

4.6 LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Existe un interés considerable por conocer la habilidad del hígado para regenerar, tanto en condiciones normales, como en condiciones de enfermedad (35,36). De hecho, se considera que una regeneración hepática adecuada es vital, ya que la sobrevida a una lesión aguda o crónica depende de una actividad regenerativa exitosa; mientras que una regeneración alterada contribuye al desarrollo de varias enfermedades hepáticas a corto o a largo plazo (34).

Para estudiar la regeneración hepática se han utilizado modelos *in vitro* e *in vivo*. Estos últimos incluyen: 1) hepatectomía química; es decir, la pérdida de la masa funcional inducida por sustancias hepatotóxicas (d-galactosamina, CCl₄, tioacetamida, acetaminofén) que estimulan la regeneración mediante la necrosis hepatocelular extensa (37), y 2) hepatectomía quirúrgica, un modelo más utilizado y estudiado, que se obtiene mediante resección quirúrgica de un porcentaje de la masa hepática, iniciando el estímulo necesario para inducir la regeneración. Este modelo no se asocia a daño tisular, ni inflamación significativas y proporciona un inicio definido para el proceso regenerativo (34,38).

En ambos modelos, el estímulo es capaz de modificar el microambiente hepático, y el hígado remanente inicia una serie de actividades biológicas que consiste en: a) la inducción de mecanismos citoprotectores, b) la depuración de las células mortalmente dañadas, c) la reparación de las células dañadas en forma no letal, d) la proliferación de las poblaciones celulares de manera proporcional y ordenada para reemplazar células perdidas y e) el depósito y remodelación de nueva MEC hepática que favorece la regeneración adecuada del órgano y la recuperación de la homeostasis (34).

Histológicamente, la proliferación celular es evidente entre las 12 - 24 horas posteriores a la lesión, alcanzando un pico a las 72 horas y termina después de 7-14 días. Al segundo o tercer día de regeneración se aprecian grupos de hepatocitos rodeados de capilares. Entonces, procesos de las células del mesénquima penetran entre estos grupos de hepatocitos y comienzan a secretar lamininas y otras moléculas de remodelación. Los componentes de la MEC se modifican volviéndose más típica del hígado sano; es decir, constituida por colágena de tipos I, IV, fibronectina, pequeñas cantidades de glucosaminoglicanos y otras proteínas, que permiten el flujo normal de la sangre portal hacia la vénula central, difundiendo libremente a través de los sinusoides. Hacia el final de la regeneración, los capilares se transforman en verdaderos sinusoides que llegan a formar hileras constituidas por endotelio fenestrado y las células de Kupffer, dando al hígado una apariencia normal, aunque posiblemente se produce más colágena que la involucrada en una cicatrización (16,34,39).

La remodelación de MEC depende en gran medida de la inducción diferencial de MMPs y TIMPs. En etapas tempranas aumenta la expresión de MMP-3, MMP-10, MMP-13 y MMP-14, alcanzando una expresión máxima a las 12-24 horas. La MMP-2 muestra una elevación más retardada, alcanzando un nivel máximo a las 72 horas. Por otro lado, TIMP-1 y TIMP-2 mantienen su expresión basal durante la etapa temprana y aumentan durante el periodo de 12-72 horas post-cirugía (40). La expresión y actividad de MMPs y TIMPs también regulan de forma indirecta la remodelación matricial ya que 1) participan en el proceso conocido como "priming", o periodo de acondicionamiento pre-proliferativo, a través de la liberación local de citocinas mitogénicas y factores de crecimiento unidos a la MEC (41,42), 2) preparan la MEC para una degradación posterior, con la participación primordial de gelatinasas que preceden y se sinergizan con colagenasas (21) y 3) el equilibrio entre MMPs y TIMPs favorece la reducción de MEC hacia el final de la regeneración hepática (40,54).

El proceso regenerativo también está regulado por un microambiente de citocinas producidas por varias células activadas, tanto hepáticas como extrahepáticas. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y la interleucina 6 (IL-6) están presentes en la etapa pre-replicativa (43-45). Sin embargo, se requiere de citocinas como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento transformante alfa ($TGF\alpha$) para iniciar la síntesis de DNA, y el aumento transitorio de interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$) hacia el final de la regeneración, junto con la disminución de factores pro-mitóticos, para limitar la proliferación y favorecer el estado quiescente de las células (46,47), (figura 4).

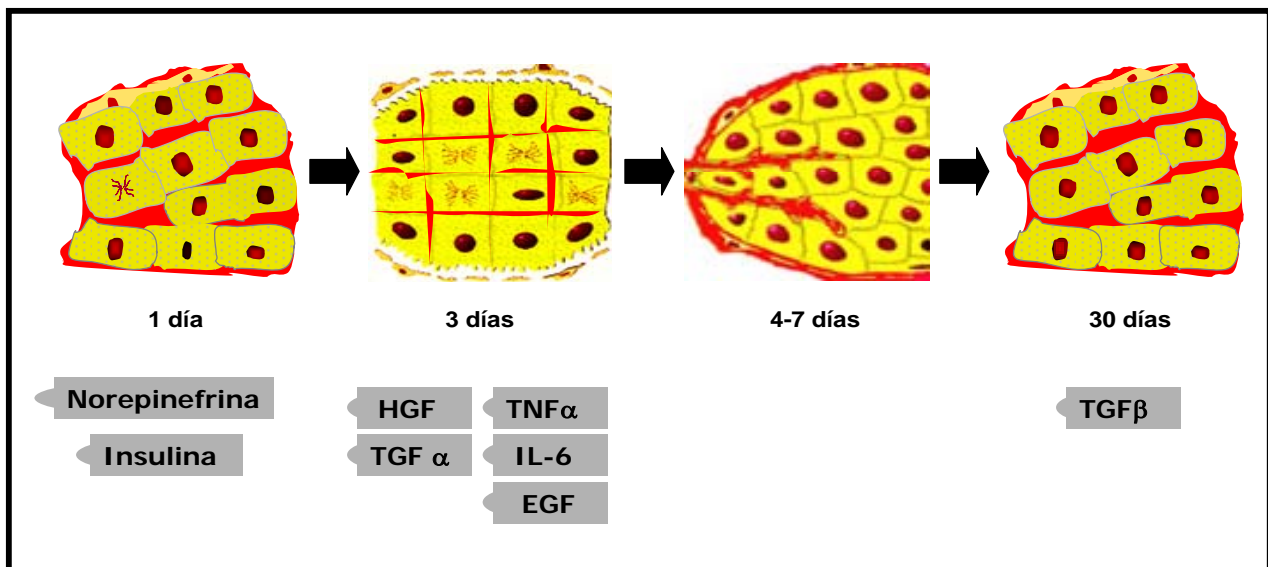


Figura 4. Cambios histológicos e inducción de citocinas durante la regeneración hepática. El dibujo muestra la proliferación celular y la remodelación de la MEC a lo largo de la regeneración hepática. Ambos procesos están regulados por citocinas. (Tomado de las referencias 16 y 48).

4.7 LA FIBROSIS HEPÁTICA Y CIRROSIS

El daño hepático crónico eventualmente resulta en el desarrollo de fibrosis hepática. Este proceso incluye la formación de septos fibróticos, donde la reparación se expresa en toda su complejidad. El depósito y re-organización de MEC fibrilar, la participación de diferentes componentes celulares y neo-angiogénicos, aunados a la regeneración poco eficiente y necrosis celular, resultan en una mayor distorsión de la arquitectura hepática y en la transformación del tejido hepático normal en un tejido cirrótico (49).

El hígado fibrótico contiene seis veces más componentes colagénicos y no colagénicos que el órgano sano, mientras que hígado cirrótico muestra un aumento de hasta diez ó más veces. Además, el hígado fibrótico mantiene una alta producción de colágena tipo I, seguida por las de tipo III, IV y V, que adquieren una distribución distinta. Respecto a los componentes no colagénicos, los incrementos involucran principalmente a proteoglicanos y glucoproteínas como fibronectina, laminina y tenascina (24).

El hígado fibrótico también posee enzimas con actividad de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), estromelina (MMP-3) y colagenasa (MMP-13), que aumentan su expresión y actividad de manera inicial, transitoria y variable durante el proceso fibrogénico. Sin embargo, tal aumento parece ser insuficiente en relación al incremento sincrónico y sostenido de TIMP-1 y TIMP-2 (10,50-53), asociado a la expresión de citocinas fibrogénicas como TGF- β 1 (54).

Tanto el hígado fibrótico como el cirrótico conservan su capacidad funcional; sin embargo, la adaptación a su nueva homeostasis ocasiona la limitación de su metabolismo basal comparado con el hígado sano. Un ejemplo es la disminución de la función mitocondrial, en parte debido al bajo número de mitocondrias, con alteración de su metabolismo y depresión de su estado energético (55-57). Otras funciones afectadas son la detoxificación y varias vías metabólicas, reflejándose en signos como la hipoglicemia, hipoalbuminemia, hipocolesterolemia y fluctuaciones en las aminotransferasas séricas (58,58A).

4.8 LA PROGRESIÓN Y LA REVERSIÓN DE LA FIBROSIS HEPÁTICA

Tanto el inicio como la progresión de la fibrosis hepática se acompañan de múltiples eventos celulares y moleculares que culminan con el depósito excesivo de la MEC. También incluye modificaciones metabólicas a distintos niveles que básicamente afectan la tasa de síntesis y de degradación de la MEC, favoreciendo el aumento de los componentes matriciales sobre su degradación, que resulta insuficiente, asociándose a una progresión de la fibrosis hepática (23).

Dentro del proceso fibrótico podemos identificar componentes más o menos constantes: 1) el daño tisular, que frecuentemente se debe a estrés oxidativo, 2) la movilización de células inflamatorias que liberan citocinas y factores de crecimiento, 3) la activación y proliferación de las células efectoras de la respuesta fibrogénica, 4) la amplificación del estímulo fibrogénico, ya que las células efectoras también producen más citocinas y factores de crecimiento, y 4) la modificación del metabolismo matricial, a través del desequilibrio entre MMPs y TIMPs, que favorece el depósito matricial sobre su degradación (8,36,59-61). Cabe señalar que, aunque la inflamación juega un papel importante, el proceso fibrótico puede activarse en su ausencia mediante la alteración de la homeostasis (la acumulación del hierro y cobre en la hemocromatosis y enfermedad de Wilson, respectivamente) debido al daño a varias poblaciones celulares (62).

A nivel celular, las CEH activadas, su transformación en miofibroblastos, la regulación autocrina, y parácrina a través de varios mediadores inflamatorios/fibrogénicos sintetizados esencialmente por las células de Kupffer, participan en la respuesta fibrótica del hígado. Además de la contribución en la síntesis de MEC por las células endoteliales y las mismas células de Kupffer, así como la participación de las células provenientes de la médula ósea y de la circulación sanguínea, que influyen en el proceso fibrogénico (19,63-65).

La degradación matricial, por otro lado, requiere la participación de distintas células. Varios trabajos han sugerido que las CEH activadas, su apoptosis y las células de Kupffer son clave para la degradación matricial, debido a que sintetizan MMPs, TIMPs y citocinas que favorecen la degradación (7,19,65A). Sin embargo, cada vez se reúne más evidencia del papel primordial que tienen otras células en la degradación matricial. Por ejemplo, el grupo del Dr. Pérez-Tamayo ha demostrado la presencia de actividad colagenolítica en preparaciones de hepatocitos que provienen de hígados con fibrosis y cirrosis experimental, que se estimula significativamente durante la reversión espontánea, asociándose a un aumento en la actividad degradativa matricial (66). El Dr. Pérez-Tamayo también demostró que, en condiciones experimentales los hepatocitos provenientes del hígados sanos y cirróticos poseen la capacidad de sintetizar las MMPs y los TIMPs más relevantes para la degradación matricial, a través de una regulación tanto a nivel transcripcional, como de la proteína, y que se acompaña de una actividad gelatinolítica y colagenolítica significativas (10). Finalmente, las células endoteliales sinusoidales también pueden contribuir debido a su capacidad de secretar MMPs (67).

Posiblemente sea la interacción regulada entre las diferentes poblaciones celulares la responsable de la degradación matricial durante el proceso dinámico de progresión y reversión fibrótica. Además de la interacción entre CEH y células de Kupffer, se ha descrito la interacción entre los hepatocitos y las CEH a lo largo de la fibrosis y la regeneración hepáticas. Esto involucra mecanismos interesantes que combinan los procesos de replicación hepatocitaria y activación de CEH, ya que los hepatocitos en proliferación sintetizan el factor de crecimiento neuronal (NGF), cuyo receptor p^{75} NTR se expresa en las CEH, regulando su activación, potencial fibrogénico y apoptosis (68,69), (figura 5).

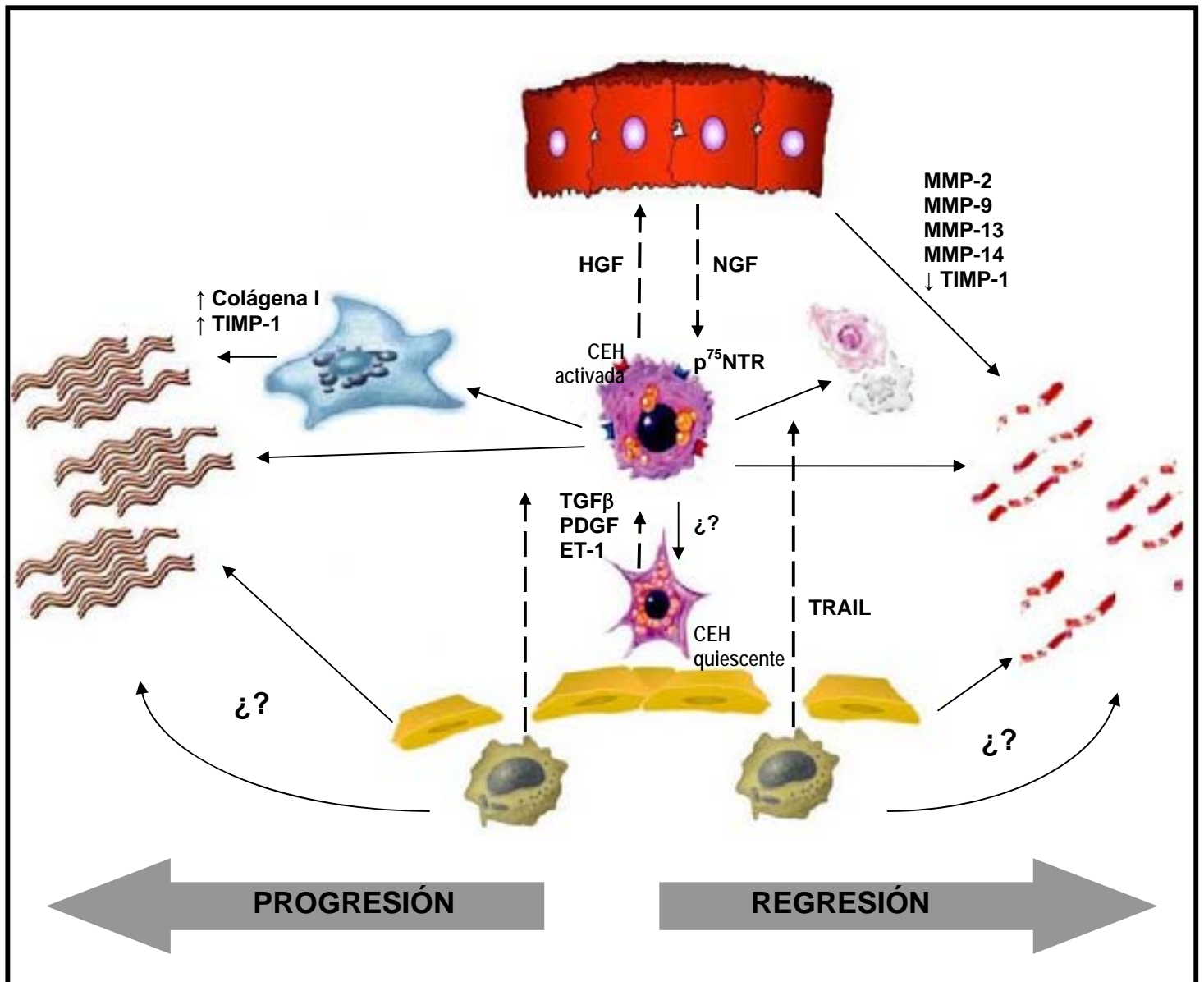


Figura 5. La participación de diferentes células durante la progresión y reversión de la fibrosis hepática. Las CEH activadas y los miofibroblastos (morado y azul) participan en la síntesis de la MEC en el hígado fibrótico. Por otro lado, los hepatocitos, las CEH activadas, su apoptosis (rosa) y las células de Kupffer (verde) participan en la degradación matricial. Tanto las células de Kupffer como las células endoteliales sinusoidales (amarillo) probablemente contribuyan en la síntesis y degradación de la MEC. Las posibles regulaciones de este proceso están marcadas con líneas discontinuas. El equilibrio entre MMPs y TIMPs participa en ambos sentidos de la remodelación matricial. (Basado en las referencias 10, 65A, 68 y 70).

4.9 LA MEC EN LA REGENERACIÓN DEL HIGADO FIBRÓTICO

La remodelación de MEC y la proliferación celular comparten una regulación mutua y son procesos clave para una adecuada regeneración hepática (34,71). Esta interrelación se evidencia en la deficiencia enzimática del activador del plasminógeno tipo urocinasa (35,72), o por la deficiencia funcional de colagenasas (7), que resultan en una proliferación alterada de hepatocitos, mientras que la deficiencia de TIMP-1 acelera la progresión del ciclo celular de hepatocitos durante la regeneración hepática (73).

El hígado cirrótico conserva su capacidad regenerativa, pero el potencial proliferativo es menor. El pico de síntesis de DNA se retrasa poco más de 24 horas. Otros marcadores de proliferación como la incorporación de bromodesoxiuridina, ciclina D1, PCNA, cinasa de timidina e índice mitótico, así como la restitución de la masa hepática, también disminuyen (74-78). Esta limitación quizá se deba al aumento temprano de TGF β 1 (75), la disminución de IL-6, TNF α y del receptor c-met de HGF (78), o el balance hacia un estado proapoptótico (79).

Sin embargo, desde 1931 se conoce que durante el proceso de regeneración, el hígado fibrótico y cirrótico cursa con una reducción variable en la MEC, que se acompaña de modificaciones funcionales (80-90). Aunque los mecanismos responsables no son muy claros, se ha sugerido que estos cambios matriciales pueden tener grandes implicaciones reguladoras sobre la fibrogénesis y proliferación durante la regeneración del hígado fibrótico, ya sea a través de efectos directos o indirectos. La remodelación de colágenas fibrilares podría modificar su interacción con las CEHs a través del receptor DDR2 (receptor tipo 2 de cinasa de tirosina con dominio de discoidina), reduciendo su proliferación y migración, que probablemente limitaría su capacidad fibrogénica (8,91); o bien la MEC podría actuar como un almacén de MMPs y de otras enzimas degradativas (6,92). Por otro lado, fragmentos proteolíticos de proteínas matriciales podrían regular directamente la proliferación celular, mediante la interacción y activación de receptores celulares estratégicos como el receptor de EGF o los receptores de la familia de FGF (41,42).

Tanto la fibrogénesis como la proliferación celular podrían ser reguladas por la MEC durante la regeneración, a través de la activación de vías específicas de señalización intracelular mediadas por integrinas, liberación y activación proteolítica de factores anclados a la MEC con propiedades mitogénicas, antifibrogénicas y/o angiogénicas como HGF, VEGF, FGF, procesamiento de factores a nivel de membrana celular ($TNF\alpha$), o la activación de formas latentes de citocinas ($TGF\beta$, $IL1-\beta$), consideradas como señales para detener la proliferación, favorecer la fibrogénesis e inflamación (93).

Mediante la manipulación de la fibrogénesis y proliferación se han estudiado algunas vías reguladoras mediadas por la MEC fibrótica en regeneración. Por ejemplo, la reducción experimental del RNAm de colágena tipo I resulta en una menor expresión de α -actina de músculo liso, de TIMP-2 y un menor depósito de colágena, así como la recuperación de la capacidad regenerativa del hígado cirrótico (94). Así mismo, modelos animales de fibrosis hepática que sobreexpresan factores asociados a regeneración, como HGF o ALR, muestran una recuperación de la degradación matricial, caracterizada por la disminución de TIMP-1 y componentes matriciales, que se relaciona con una regeneración hepática más eficiente (95,96).

También se ha sugerido que la función mitocondrial, el estado redox y adaptaciones homeostáticas del metabolismo del hígado fibrótico, que involucran la síntesis colagénica y el equilibrio entre MMPs y TIMPs, son factores que favorecen la proliferación y la remodelación de la MEC del hígado fibrótico, ambos procesos necesarios para una reparación tisular adecuada (55,97).

A nivel celular, los hepatocitos, las CEH activadas y las células de Kupffer podrían jugar un papel clave en la remodelación de la MEC fibrótica, debido a su capacidad conjunta para sintetizar la MEC, las enzimas que favorecen o inhiben su degradación, así como varias citocinas reguladoras. También podrían participar en la progresión y reversión del hígado fibrótico, la regeneración hepática y en la fisiopatología de las enfermedades hepáticas crónicas (10,19,65A,66,98-104).

El modelo de hígado fibrótico en regeneración en rata es una herramienta útil para el estudio de la remodelación matricial asociado a la proliferación celular. El conocimiento del metabolismo y vías reguladoras mediadas por la MEC, en condición de fibrosis hepática subyacente, es valioso debido a la posibilidad de intervenciones exitosas en el metabolismo matricial. Sin embargo, se conoce poco de los mecanismos celulares y moleculares que participan en la remodelación de la MEC del hígado fibrótico, que a su vez limita la disponibilidad de nuevos blancos de intervención, quizá más específicos.

V. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El metabolismo de la colágena presenta cambios adaptativos durante la regeneración del hígado fibrótico, que favorecen una organización tisular parecida al tejido sano.

VI. OBJETIVOS

GENERAL

Estudiar el metabolismo de la colágena del hígado sano y fibrótico de ratas durante la reorganización de MEC, que se presenta en la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial.

PARTICULARES

- Obtener el modelo de fibrosis hepática de tipo inmunológico en la rata, mediante la administración de suero porcino. Posteriormente, la estimulación de la regeneración mediante hepatectomía parcial al 70%.
- Estudiar el depósito de la colágena en el hígado sano y fibrótico durante la regeneración hepática.
 - Estimar el contenido de colágena presente en el hígado.
 - Cuantificar morfométricamente el tejido conectivo en el hígado.
- Estudiar el metabolismo colagénico durante la regeneración.

Biosíntesis:

- Cuantificar el RNAm de la colágena tipo 1 (Coll α -1 (I)).
- Cuantificar la prolina libre.
- Determinar la actividad de incorporación de prolina marcada a colágena.

Degradación:

- Determinar la actividad de colagenasa total.
- Estimar la actividad de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9.
- Estimar la expresión de MMP-13, TIMP-1 y TIMP-2.

Probable asociación con CEH activadas:

- Evaluar la presencia de CEH activadas.

VII. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad hepática crónica y cirrosis ocasionan una alta tasa de morbi – mortalidad a nivel mundial. En México se calcula que 1.02% de la población padece algún tipo de hepatopatía crónica y se espera un incremento progresivo, hasta triplicar su valor en el año 2020 (1). La tasa de mortalidad por hepatopatía crónica es de 5.7%, incluyendo a 1,055,162 individuos en edad productiva (2) por lo que se considera un problema de salud pública (3).

La enfermedad hepática crónica conlleva el riesgo de progresión fibrótica que eventualmente conduce a la cirrosis hepática. Esto representa un mal pronóstico, ya que se asocia a complicaciones como ascitis, hipertensión porta, hemorragia de tubo digestivo y cáncer; además de ser una causa frecuente de ingresos hospitalarios y generar altos costos económicos (105).

Se sabe que el hígado fibrótico es capaz de regenerar, y el tejido conectivo experimenta modificaciones variables durante este proceso (5,80,106). En modelos animales de fibrosis y regeneración, se ha observado que el estado redox, la tasa de síntesis colagénica y el equilibrio entre metaloproteinasas matriciales y sus inhibidores específicos, son factores que participan en la remodelación de la matriz y en una adecuada reparación del tejido hepático (55,97).

El estudio del metabolismo de la MEC y su equilibrio adaptativo, como respuesta homeostática durante la regeneración del hígado fibrótico, contribuye al mejor entendimiento de fenómenos proliferativos y de remodelación inherentes a procesos biológicos como el cáncer, metástasis y regeneración hepática, además de aportar nuevos blancos terapéuticos, cada vez más específicos, seguros y eficaces.

VIII. METODOLOGIA

MODELO DE FIBROSIS INMUNOLÓGICA DEL HÍGADO. Se realizó con base en el modelo descrito por Paroneto y Popper, con pequeñas modificaciones (107,108). Brevemente, se utilizaron ratas Wistar macho de 100 gramos de peso con libre acceso a agua y alimento y se mantuvieron en una temperatura ambiente de 22°C y ciclos de luz / oscuridad de 12 horas, con el encendido de la luz a las 7:00 horas, y el apagado a las 19:00 horas. El manejo de los animales se llevó a cabo bajo las recomendaciones de cuidado y uso de animales de laboratorio del personal del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Los animales se inyectaron dos veces por semana durante 9 semanas, por vía intraperitoneal, con una dosis inicial de 0.5 mL de suero porcino e incrementos graduales de 3.5 ml/kg de acuerdo al peso del animal. El suero se preparó a partir de sangre fresca y se liberó de toxinas mediante un filtro de 0.45 μm (Millipore Corp., Bedford, MA) con una concentración de proteínas totales de 56 mg/mL, en acuerdo a lo reportado en la literatura. Dos días después de la última inyección, los animales se dejaron en ayuno toda la noche. Se pesaron, anestesiaron y se practicó una hepatectomía parcial del 70% (HP70%) siguiendo a la técnica descrita por Higgins y Anderson (109). Los animales control fueron falsamente operados (realizando todo el procedimiento, pero sin la resección parcial del hígado). Posteriormente, con el objeto de obtener las muestras biológicas, los animales se anestesiaron con 40 mg/kg de pentobarbital sódico (i.p.) y se sacrificaron a los siguientes tiempos después de la cirugía: cero (inmediatamente posterior al acto quirúrgico), 24 horas, 72 horas, 1 semana y 1 mes. Se colectó la sangre de los vasos sanguíneos del cuello y se tomaron muestras del hígado y del bazo. La sangre se centrifugó en centrífuga clínica a 800g por 5 minutos para obtener el suero sanguíneo.

GRUPOS DEL ESTUDIO. De acuerdo a las variables de fibrosis hepática y hepatectomía, se formaron cuatro grupos incluyendo un mínimo de cinco animales en cada grupo.

- 1) Grupo fibrótico control: recibió el tratamiento con suero porcino como se describió anteriormente, y una operación falsa.
- 2) Grupo sano control: recibió inyecciones intraperitoneales de cloruro de sodio 0.9%, equivalentes al tratamiento en el grupo fibrótico y una operación falsa.
- 3) Grupo fibrótico hepatectomizado: se trató con suero porcino y después HP70%.
- 4) Grupo sano hepatectomizado: se inyectó con cloruro de sodio 0.9% y HP70%.

EVALUACION DE LA REGENERACIÓN. La regeneración hepática se estimó mediante distintas metodologías. La recuperación de masa hepática post-HP se determinó mediante el porcentaje de ganancia de masa hepática post-HP. Para estimar la regeneración, se evaluó la actividad de cinasa de timidina *in vitro* utilizando como sustrato [H^3]-timidina (NEN, Boston MA) de acuerdo a un método bioquímico estándar (110), así como el contenido de DNA tisular mediante un método colorimétrico, basado en la reacción con difenilamina (111). Para el índice mitótico, una porción de hígado se fijó en formaldehído al 10% en buffer de fosfatos pH 7.2 y se incluyó en parafina. En cortes de 3 a 4 μ m de grosor, teñidos con H&E, se contaron las células en metafase de mitosis. Los resultados de la actividad de cinasa de timidina y contenido de DNA se expresaron como veces sobre el control de las unidades originales. Para cada variable se tomaron en cuenta una $n=5$ animales por cada grupo.

EVALUACION MORFOLÓGICA, INMUNOHISTOQUIMICA Y FUNCIONAL DEL HÍGADO

Para la evaluación de la fibrosis a nivel histológico, se realizaron cortes del hígado incluido en parafina y se tiñeron con Tricrómico de Masson. La calificación de fibrosis se evaluó mediante microscopia de luz, de acuerdo a una escala específica de fibrosis en este modelo (112). En este trabajo solamente se utilizaron animales con grado 4 de fibrosis hepática, considerado en la literatura como un estadio similar a la cirrosis.

Grado	Característica
0	Ninguna fibrosis
1	Septos cortos de colágena que nacen y se extienden desde las venas centrales.
2	Septos delgados que unen a las venas centrales, pero se conserva la arquitectura lobular.
3	Uno o más pseudolóbulos formados por septos delgados.
4	Todo el parénquima está subdividido en pequeños pseudolóbulos por septos delgados.

Para el análisis morfométrico, en cada laminilla se digitalizaron 50 campos representativos obtenidos a 10x y 40x cada uno (Laser Pix, Biorad EU). En cada campo se calculó: área del estroma, área del parénquima e índice estroma / parénquima. Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar de $n = 5$ casos por grupo.

Adicionalmente se evaluaron características ultraestructurales de áreas de interés, particularmente células estelares hepáticas en la MEC, mediante microscopía electrónica. Porciones de hígado de 1 mm cúbico se fijaron en solución de glutaraldehído 2.5% en buffer fosfatos pH 7.4 durante 2 horas a 4°C; post-fijadas en solución de tetróxido de osmio al 1% en buffer de fosfatos 0.2 M durante 2 horas a 4°C, y deshidratadas en etanol e incluidas en resinas de epóxido. Se realizaron cortes semi-finos y se tiñieron con azul de toluidina. Se examinaron por microscopía de luz para encontrar sitios de interés. Entonces se realizaron cortes ultradelgados y doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en microscopio electrónico. Se obtuvieron imágenes representativas de las células estelares hepáticas. Para continuar la evaluación del fenotipo de CEH, se realizó marcaje inmunohistoquímico de la proteína α -SMA. Brevemente, secciones de 2 μ m de grosor se desparafinaron y re-hidrataron en un tren de alcoholes. Posteriormente se incubaron 30 min a 95°C con citrato de sodio 0.1M pH6 (recuperación antigénica). Las laminillas se lavaron, y se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena mediante peróxido de hidrógeno al 3%. Las muestras se incubaron con el anticuerpo anti- α -SMA dilución 1:50 (anticuerpo monoclonal de ratón, Dakopatts Co. DAKO M0851) durante 30 minutos y con el anticuerpo secundario biotinilado (DAKO K400711) durante 30 minutos, con lavados intermedios con PBS 1x (pH 7.6) / 0.01% Tween-20. Finalmente, se agregaron sustratos cromogénicos (complejo estreptavidina-peroxidasa, y solución de 3, 3'-diaminobenzidina en buffer con peróxido de hidrógeno) y se realizó contra-tinción con Hematoxilina de Mayer y Harris.

EVALUACION DEL CONTENIDO DE COLÁGENA

a) Determinación Bioquímica. Después del sacrificio, el hígado se homogenizó y lavó con etanol absoluto, y posteriormente buffer Tris / NaCl pH 7.4, para eliminar las proteínas solubles. La colágena se extrajo con ácido acético 0.25 mol/L y se hidrolizó en HCl 6N a 110°C durante 24 horas. El contenido de hidroxiprolina se midió de acuerdo al método de Rojkind y González (113) en extracto de tolueno, de acuerdo a lo descrito en la literatura (114).

b) Western Blot (Colágena tipo I). Se estimó el contenido de colágena tipo I inmunorreactiva. Brevemente, 15-40 μ g de homogenizado de hígado y se sometieron a electroforesis en gel SDS-poliacrilamida 10% y 15%, y posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Previo bloqueo de epítopes inespecíficos, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario policlonal anti-colágena tipo I de rata hecho en conejo (Chemicon, dilución 1:500) al menos durante una hora.

Después del lavado, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Zymed, dilución 1:10000). Finalmente, las membranas se incubaron con reactivos de quimioluminiscencia (sistema ECL plus, Amersham), se expusieron (Kodak BIO-MAX film) y revelaron. Para el análisis densitométrico, se utilizó el Programa Collage 2.0 (analyzer de imagen Fotodyne Inc., foto/Eclipse™) y los resultados se ajustaron mediante la determinación de β -actina (anticuerpo monoclonal Sigma, 4 μ g/ml).

EVALUACIÓN DEL METABOLISMO DE LA COLÁGENA

Para estudiar de forma secuencial el metabolismo de colágena, se evaluó la fase de síntesis y degradación de colágena a diferentes niveles.

a) Northern Blot (Colágena tipo I). Se extrajo el RNA total del tejido hepático mediante homogenización en reactivo de fenol y tiocianato de guanidina ("Tripure" Isolation Reagent Boehringer Mannheim catálogo no. 1667165) de acuerdo al método de Chomczynski y Sacchi (115) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Veinte microgramos de RNA se sometieron a electroforesis en gel de agarosa/formaldehído al 1%, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad, Co.). Esta se pre-hibridó por 2 horas a 42°C, y posteriormente se hibridó con sonda de cDNA P³²-Collagen α -1 (I), proporcionadas amablemente por el Dr. Francisco Villarreal, San Diego University, CA (107), y adicionalmente se hibridó otra sonda de G3PDH radio-marcada con P³²-deoxicitidina 5'- α (P³²)-trifosfato, usada como estándar. Después de la hibridación, las membranas se lavaron bajo condiciones de astringencia, y se expusieron en autorradiografía (película Kodak XO-MAT -70°C) o placa sensible de STORM, y se cuantificaron mediante análisis densitométrico.

b) Biodisponibilidad de prolina. La poza libre de prolina se determinó en extractos de ácido perclórico. Brevemente, se homogenizaron 300 mg de hígado en ácido perclórico 7%, que posteriormente fueron neutralizados con NaOH y se agregó cloramina T para formar pirrolidona, que es soluble en tolueno, asegurando la especificidad de la determinación. Se agregó ninhidrina a los extractos de tolueno y la prolina se estimó indirectamente por espectrofotometría a 515 nm. Por otro lado, la oxidación de prolina se determinó *in vitro* en rebanadas de hígado, como se describe en el apartado de "incorporación de prolina a colágena".

c) Incorporación de prolina a colágena. Un gramo de hígado, se cortó en rebanadas de 0.5 mm de grosor y se colocó en solución Krebs-Ringer-Bicarbonato (pH 7.4), glucosa 5mM, bajo condiciones de O₂ 95%, CO₂ 5% a 37°C, en agitación gentil. Posteriormente se incubó *in vitro* en un frasco sellado con 30 μM de prolina y con prolina marcada radioactivamente (1 μCi L-[C¹⁴]-prolina en cada frasco) durante 2 horas. La producción de CO₂¹⁴ se estimó mediante KOH 10% introducido en canastilla al frasco sellado y posteriormente cuantificado con líquido de centelleo. Aquí, el CO₂¹⁴ producido se consideró como resultado de la oxidación de la prolina, sin estimular la liberación de CO₂¹⁴ mediante acidificación del medio, debido a la interferencia potencial con el ensayo sincrónico de incorporación de prolina a colágena. En este último, la colágena se extrajo de las rebanadas de hígado después de la incubación con prolina marcada. Los detalles se describen en “evaluación del contenido de colágena - determinación bioquímica”. Se consideró que la conversión de L-[C¹⁴] prolina a L-[C¹⁴] hidroxiprolina integrados en la proteína colagénica correspondió a la síntesis de colágena (97,116).

d) Actividad de Colagenasa Total *in vitro*. El método se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Pérez-Tamayo con modificaciones menores (55,119). Se utilizaron 15 mg de homogenizado de hígado como fuente de enzima y también de sustrato (principalmente colágena como sustrato endógeno). Después de la incubación, se centrifugó la colágena no digerida y los productos de la degradación de la colágena fueron cuantificados en el sobrenadante, por medio de su contenido de hidroxiprolina (113,114,116). Se hicieron ensayos paralelos en presencia de CaCl₂ 10 mmol/L, pH 7.6 para ajustar los resultados.

e) Actividad de Gelatinasa (zimografía en gel). Se homogenizaron 100 mg de hígado en solución de extracción (CHAPS 10 mM, HEPES pH 7.5, 20 mM; NaCl 150 mM). Veinte microgramos del extracto se mezclaron con solución de carga de zimografía y se sometieron a electroforesis en gel SDS-poliacrilamida que contenía 1 mg/ml de gelatina. Después de lavados con Tritón X-100 al 2.5%, los geles se incubaron en solución de Triton X-100 2.5%; CaCl₂ 5mM; Tris-HCl (pH 8.0) 50mM durante 24 horas a 37°C. (40). Posteriormente se tiñó con azul de Coomassie y las bandas de actividad se cuantificaron mediante análisis de imagen. También se utilizaron controles positivos de actividad zimográfica.

f) Western blot (MMP-13, TIMPs). La cantidad de proteína de MMP-13, TIMP-1 y TIMP-2 se estimó siguiendo básicamente la misma metodología antes descrita en la sección de Western blot de Colágena I. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-MMP-13 de rata hecho en ratón (Chemicon, dilución 1:300), anticuerpo monoclonal anti-TIMP-1 de humano hecho en ratón (Chemicon, dilución 1:300) y anticuerpo monoclonal anti-TIMP-2 de humano hecho en ratón (Chemicon, concentración final 1 µg/ml). Se utilizaron controles positivos y los resultados se ajustaron mediante la determinación de β-actina.

Análisis estadístico. Todos los resultados se expresaron como media ± error estándar. La comparación de medias y sus interacciones se realizó mediante ANOVA de dos vías y la prueba de t de Student. La significancia estadística se consideró cuando $p < 0.05$, indicado como (*) contra el tiempo cero y (**) contra el control de grupo.

IX. RESULTADOS

9.1 OBTENCIÓN DEL MODELO DE FIBROSIS INMUNOLÓGICO.

Se indujo fibrosis hepática en 50 ratas Wistar macho mediante la administración de suero porcino. Más de la mitad de los animales tratados (n=32) desarrollaron septos que formaban pseudolóbulos completos en todo el parénquima hepático (fibrosis grado 4). Los cambios morfológicos fueron evidentes a nivel macro- y microscópico (figura 6A), mostrando también cambios ultraestructurales como pérdida de lípidos en CEHs (figura 6B). Solamente los animales que desarrollaron fibrosis en grado 4 se utilizaron para el resto del estudio.

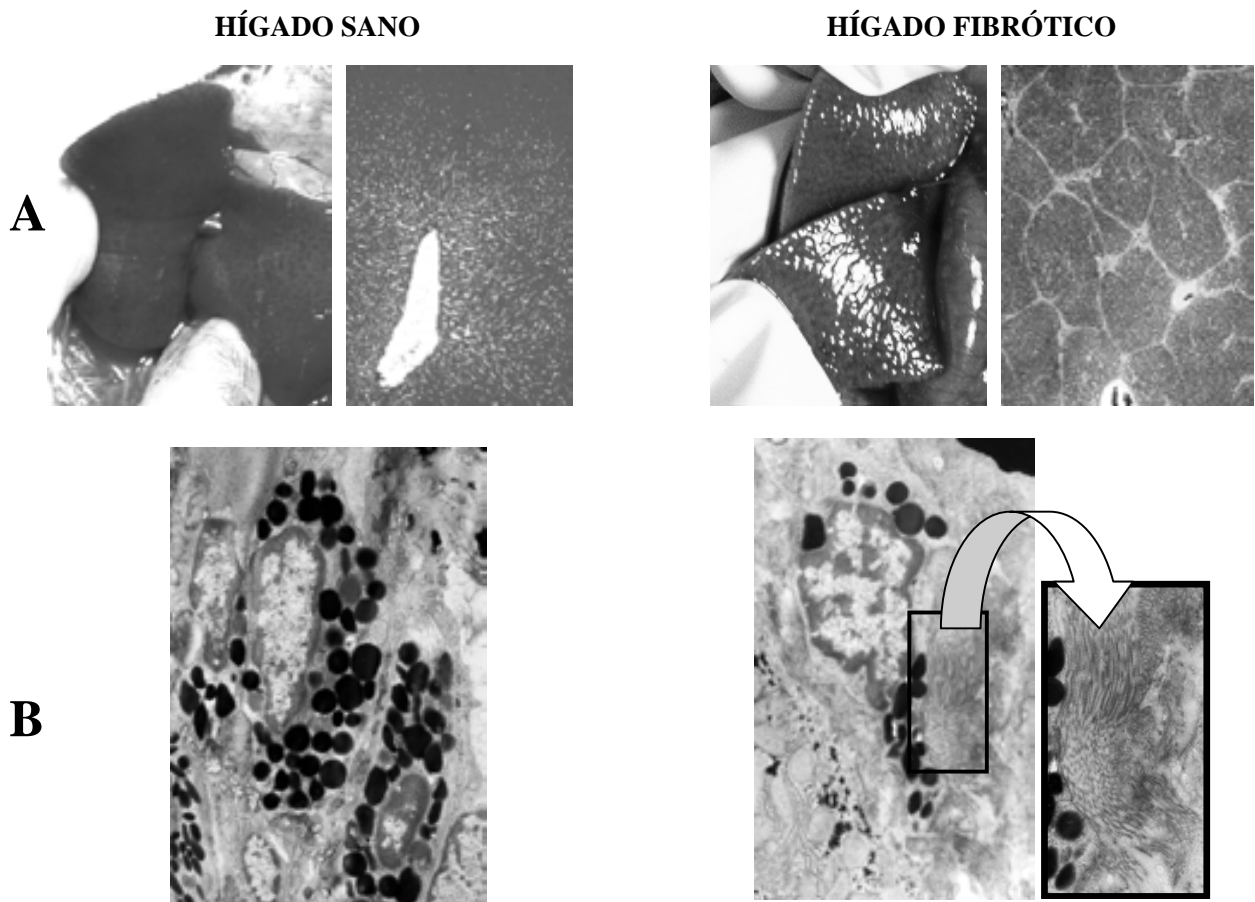


Figura 6. Apariencia del hígado sano y fibrótico de la rata. (A) Aspecto macroscópico y de microscopía de luz (2.5x) del hígado sano (*izquierda*) y después la administración de suero porcino intraperitoneal durante 9 semanas (*derecha*). **(B)** Se muestran imágenes de microscopía electrónica de células estelares hepáticas no activadas (*izquierda*) y activadas en proceso de fibrogénesis (*derecha*).

9.2 REGENERACIÓN DEL HIGADO FIBRÓTICO POST-HP70%.

9.2.1 Recuperación de la masa hepática. A las 72 horas de la HP70%, tanto el hígado sano como el fibrótico mostraron ganancia de masa hepática. Después de 30 días post-HP70%, el hígado fibrótico logró recuperar hasta 80% de su masa original (figura 7).

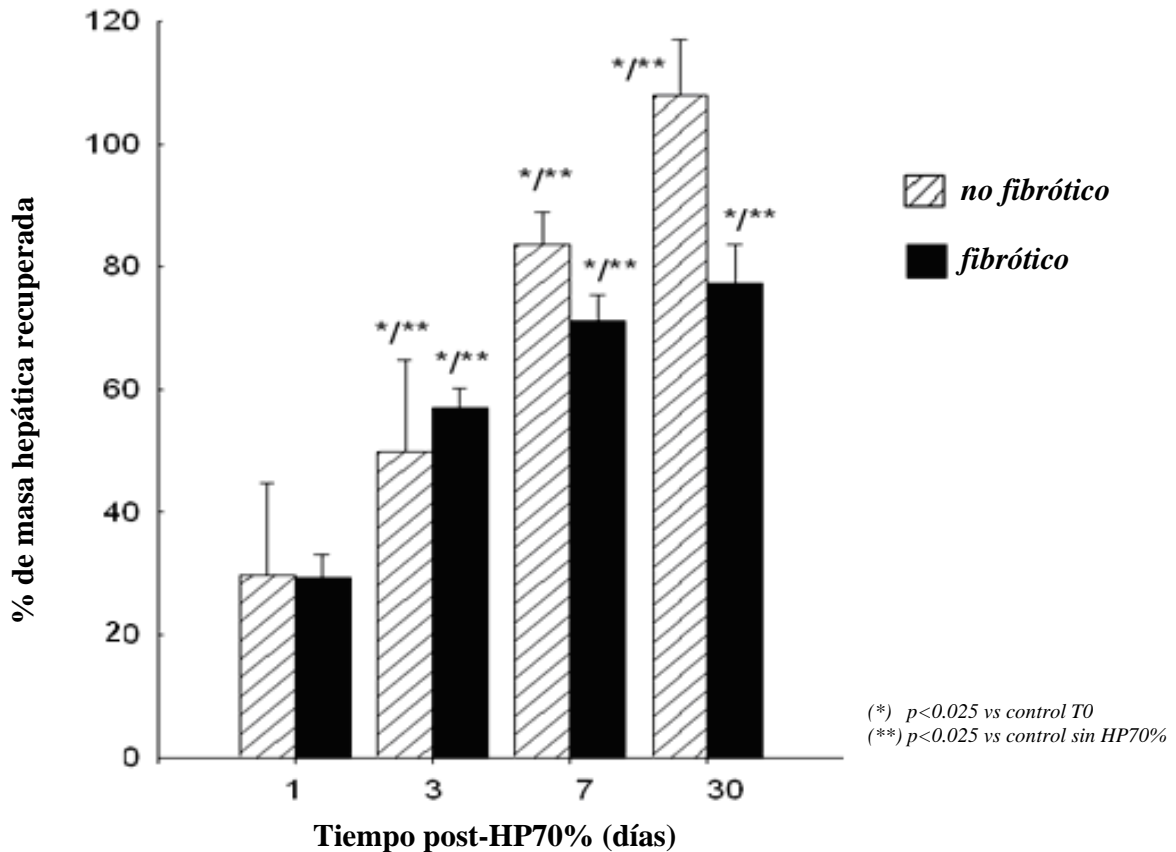


Figura 7. El hígado fibrótico recuperó la masa hepática posterior a la HP70%. El hígado fibrótico presentó una ganancia de masa hepática de 80% a los 30 días post-HP70%; que fue menor en comparación con el hígado sano. Los resultados se expresaron como media±DE del porcentaje de la ganancia de masa hepática después de la HP70%.

9.2.2 Elevación de los indicadores de proliferación. Los marcadores de proliferación celular (la actividad de cinasa de timidina y el índice mitótico) aumentaron en los grupos hepatectomizados, mostrando un pico a las 24 horas post-HP70% (figura 8). Estos marcadores proliferativos se mantuvieron elevados hasta 72 horas post-HP70% en el grupo no fibrótico, mientras que el grupo fibrótico mostró una elevación menor en intensidad y tiempo.

El contenido de DNA aumentó de manera similar en los grupos hepatectomizados, alcanzando su mayor elevación a las 72 horas y 7 días en los grupos fibrótico y control, respectivamente. Los resultados se expresaron como veces sobre el control, cuyos valores fueron: actividad de cinasa de la timidina 0.18 ± 0.07 nmolas de TMP-[H³] formado / h / mg de proteína citosólica; índice mitótico 0.4 ± 0.1 figuras mitóticas por campo en 50 campos de 40x; contenido de DNA 2.3 ± 0.2 µg de DNA / mg de tejido hepático (figura 8).

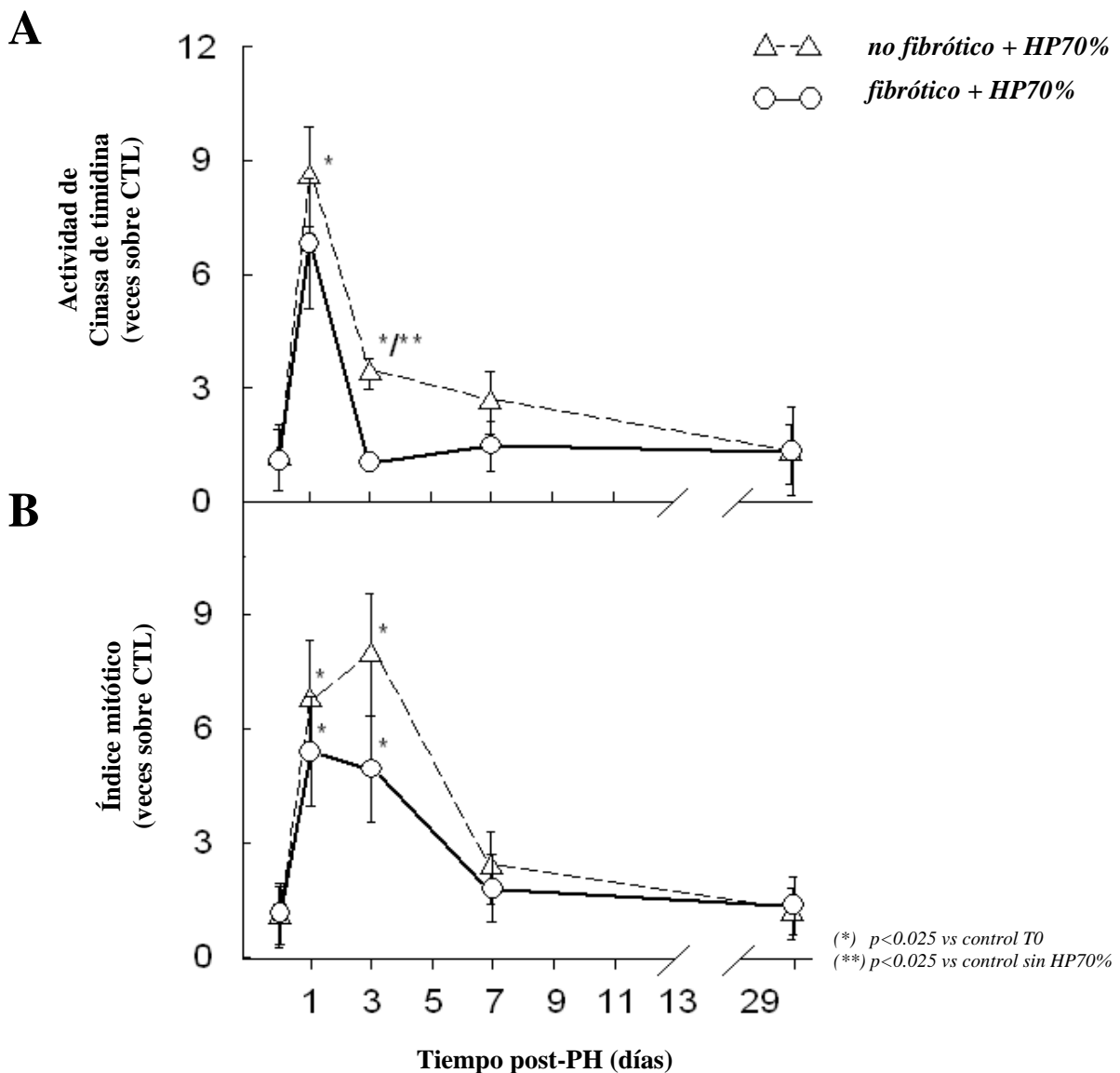


Figura 8. La HP70% indujo la proliferación celular. Los marcadores de proliferación celular se incrementaron entre los días 1-3 post-HP70%. La actividad proliferativa fue menor en el hígado fibrótico. Tanto la actividad de la cinasa de timidina (A), como del índice mitótico (B), se expresaron como media±DE de las veces sobre el control no hepatectomizado.

9.3 EVALUACION MORFOLÓGICA DEL HÍGADO FIBRÓTICO POST-HP70%

9.3.1 Reducción del grado de fibrosis (escala histológica). Después de la administración de suero porcino, el hígado de los animales tratados mostró características histológicas propias de este modelo: septos delgados que unen estructuras vasculares y dividen todo el parénquima hepático. Posteriormente, los animales control sin HP70% experimentaron una reversión espontánea leve de la fibrosis hepática, estimando una reducción del 20% de la fibrosis inicial después de 30 días, y la mayoría de estos animales (80%) permanecieron en grado 4 de fibrosis en este tiempo. Mientras que el grupo experimental con HP70% mostró una reducción significativa de la fibrosis hepática de 50 y 70% después de 7 y 30 días post-HP70%, respectivamente. En estos tiempos, la mayoría de animales con HP70% (60%) mostraron una fibrosis remanente grado 2, y ningún animal permaneció en fibrosis grado 4 (figura 9).

9.3.2 Reducción del área de fibrosis (estimación morfométrica). Al final del período de inducción fibrótica, el análisis morfométrico mostró el aumento del área del estroma hepático. Posterior a la HP70%, hubo una reducción de la fibrosis de hasta 75% después de 30 días, confirmada morfométricamente mediante el índice estroma/parénquima. Así como la reversión espontánea leve de la fibrosis histológica, observada en los animales control sin HP70% (cuadro 4). Cabe mencionar que la reducción en el índice estroma/parénquima en los animales fibróticos hepatectomizados se atribuyó a cambios en el área del estroma más que a modificaciones del parénquima, lo cual fue apoyado posteriormente por la reducción del contenido de colágena en el tejido.

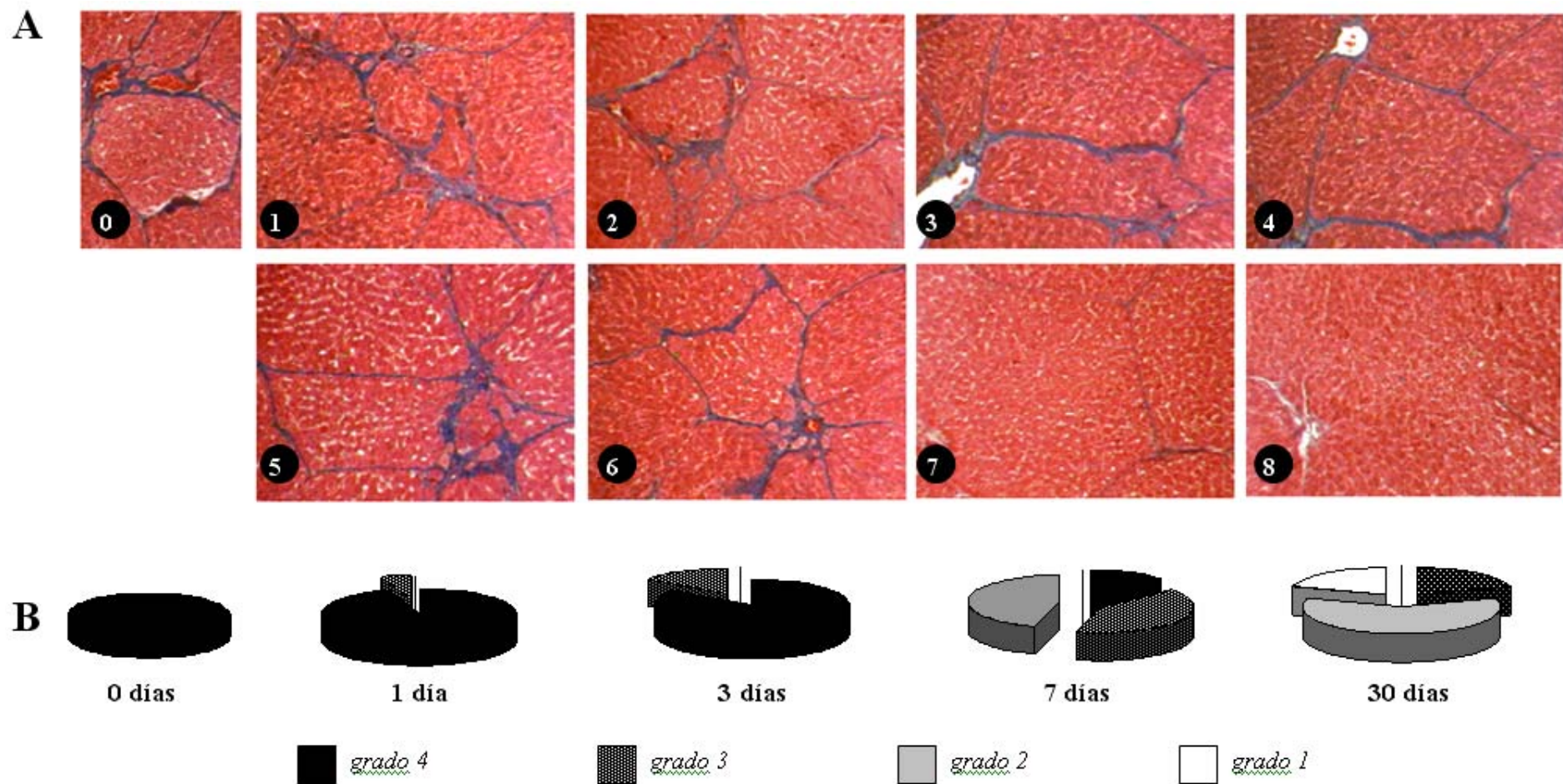


Figura 9. Reducción del tejido fibrótico en el hígado post-HP70%. (A) Tinción tricrómica de Masson en microscopia de luz (10x). El hígado fibrótico control (**imagen 0**) mostró una reversión espontánea de la fibrosis después de 1, 3, 7 y 30 días (**imágenes 1-4, respectivamente**). Tras la HP70%, el hígado fibrótico experimentó una mayor reducción del tejido fibrótico, durante los mismos tiempos (**imágenes 5-8, respectivamente**). Las flechas indican el tejido fibrótico remanente después de 7 y 30 días post-HP70%. **(B)** También se evaluó los distintos grados de fibrosis hepática* tras la HP70%, así como el porcentaje en que estaban presentes a lo largo de 30 días post-HP70% (*ver detalles descriptivos en material y métodos).

CUADRO 4. Area de fibrosis hepática

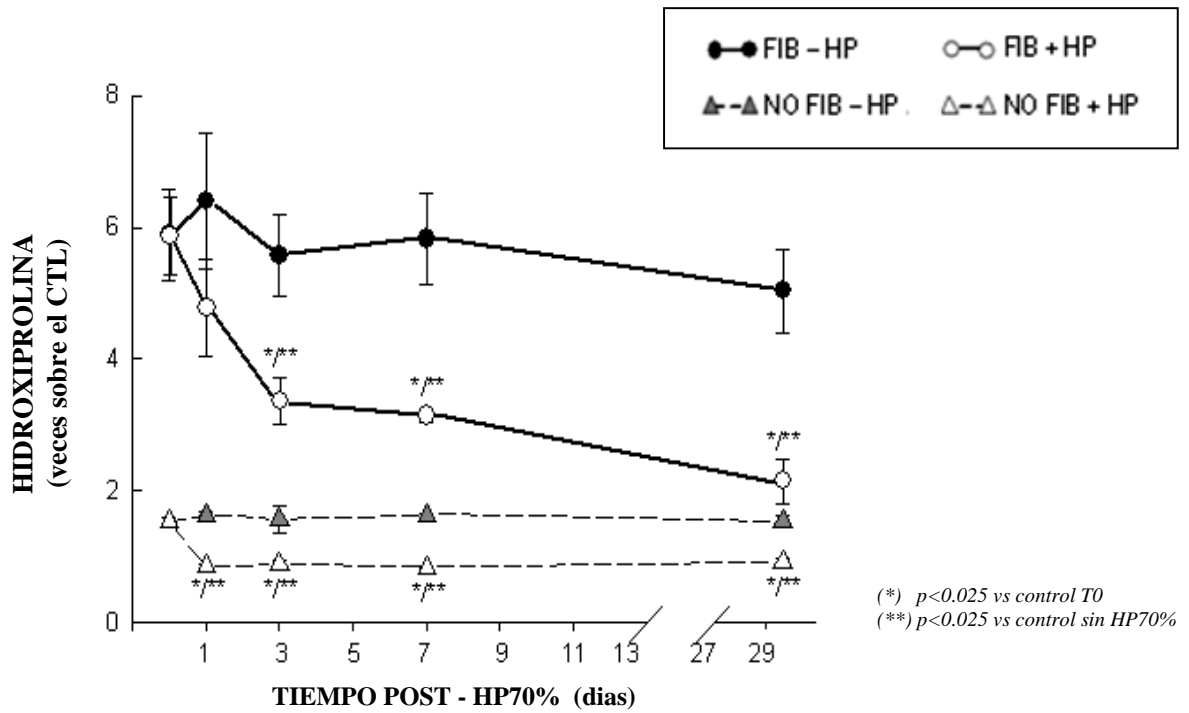
Tiempo postHPX	SANO			FIBRÓTICO		
	Área de fibrosis	Área de parénquima	ÍNDICE (FIB / PAR) x10	Área de fibrosis	Área de parénquima	ÍNDICE (FIB / PAR) x10
- HP 70%						
0 d	0.3±0.03	29±0.2	0.10 ± 0.006	5.0±0.25	24±0.3	2.03 ± 0.15
1 d	0.3±0.02	29±0.2	0.10 ± 0.010	5.1±0.29	25±0.3	2.06 ± 0.14
3 d	0.3±0.02	29±0.1	0.09 ± 0.008	4.9±0.29	24±0.2	2.09 ± 0.14
7 d	0.3±0.01	29±0.1	0.09 ± 0.005	4.4±0.24	24±0.3	1.83 ± 0.11
30 d	0.3±0.02	28±0.2	0.10 ± 0.009	3.9±0.41*	25±0.4	1.59 ± 0.19*
+HP 70%						
0 d	0.3±0.02	29±0.2	0.10 ± 0.007	4.9±0.22	25±0.3	2.06 ± 0.11
1 d	0.1±0.02***	28±0.3***	0.05 ± 0.006***	4.8±0.23	23±0.4**	2.04 ± 0.12
3 d	0.1±0.01***	28±0.3**	0.05 ± 0.005***	4.7±0.33	24±0.5	1.95 ± 0.16
7 d	0.2±0.02	28±0.2***	0.09 ± 0.006	2.3±0.3***	26±0.5***	0.9 ± 0.12***
30 d	0.2±0.01	28±0.1***	0.09 ± 0.004	1.2±0.1***	27±0.3***	0.47 ± 0.04***

Estadísticamente significativo vs control T0 (), y vs su control de grupo (**).
-HP = sin hepatectomía parcial 70%; +HP = con hepatectomía parcial 70%.*

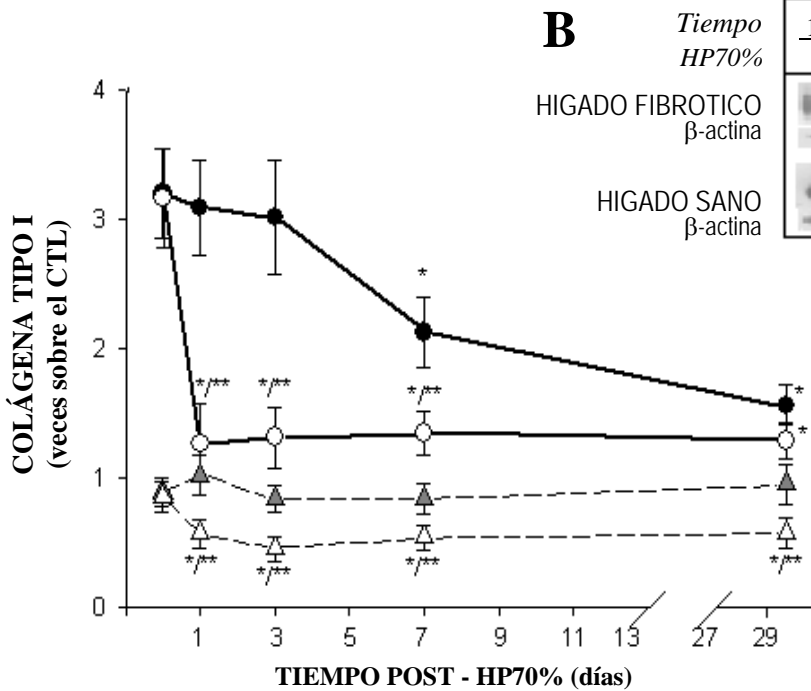
La HP70% se asoció a la reducción del área de fibrosis hepática. El área de fibrosis hepática se redujo hasta 80% de su valor inicial a los 30 días post-HP70%, mientras que el hígado control mostró una reversión espontánea del área fibrótica de 20%. Nótese que la HP70% indujo la modificación del área del parénquima que no se asoció a cambios en el área de fibrosis, y vs. Los resultados de morfometría se expresaron como media±DE de 4 animales por grupo. Se analizaron 50 campos de 40x por cada animal.

9.3.3 Reducción del contenido de colágena hepática. Los cambios histológicos y morfométricos se confirmaron mediante la estimación bioquímica de colágena y Western blot de colágena tipo I (figura 10). Después de 3 días post-HP70%, el 70% de los animales presentó una disminución progresiva del contenido de colágena, alcanzando hasta un tercio de su valor inicial (5.9 ± 0.7 tiempo cero vs 2.1 ± 0.3 mg colágena / g de hígado; a los 30 días post-PH, $p < 0.001$), mientras que en los animales fibróticos control, los niveles de colágena continuaron elevados después de 30 días, aunque mostraron disminución de la colágena tipo I inmunorreactiva después de 7 días, que fue menos intensa y más tardía en comparación con los animales hepatectomizados. Los animales sanos con HP70% también presentaron disminución del contenido de colágena, evaluada por ambos métodos.

A



C



B

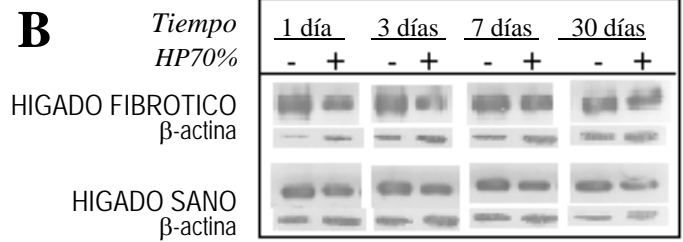


Figura 10. Reducción de la colágena post-HP70%. (A) Tras la HP70%, el contenido de hidroxiprolina del hígado fibrótico disminuyó progresivamente, aproximándose al valor del hígado sano después de 30 días post-HP70%. Mientras que el hígado fibrótico control mostró una reversión espontánea poco significativa. La modificación del contenido de colágena se evidenció también a través de (B) el análisis de western blot de la colágena tipo I y (C) la estimación densitométrica de las bandas obtenidas, que muestra una reducción similar

9.4 METABOLISMO DE LA COLÁGENA POST-HP70%

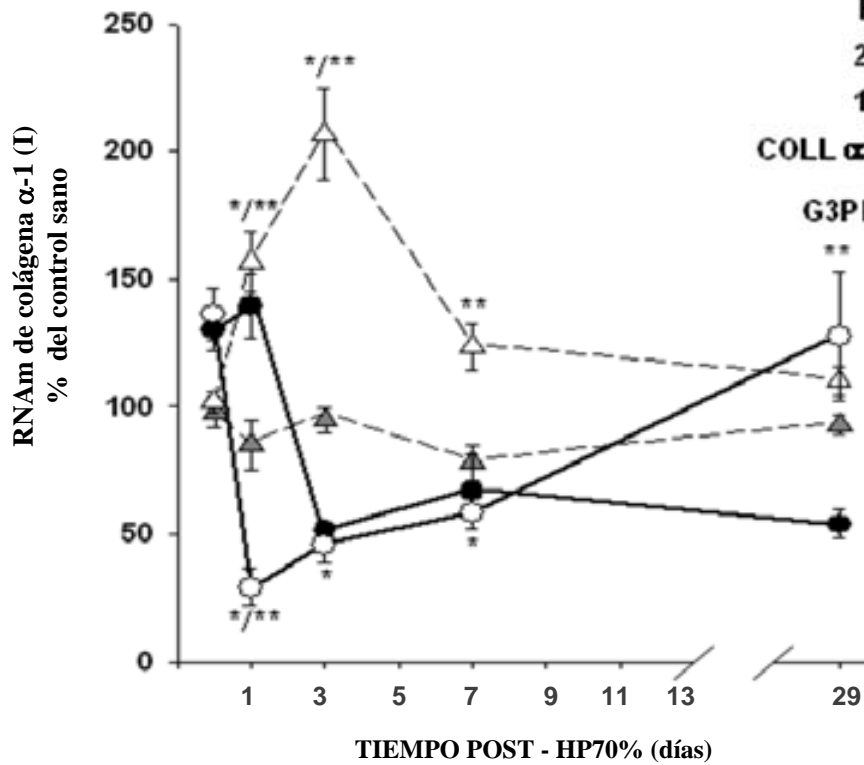
Como un abordaje para explicar los cambios ocurridos en la MEC fibrótica después de HP70%, se estudió el metabolismo de la colágena tratando de abarcar varios niveles de sus componentes básicos: la síntesis y la degradación.

9.4.1 Estimulación transcripcional de la colágena (síntesis del RNAm). La síntesis del RNAm del gen de colágena α -1 (I) en el hígado fibrótico disminuyó al discontinuar la administración del suero porcino. La HP70% precipitó el descenso del RNAm, seguida de una recuperación gradual de la actividad transcripcional, alcanzando el nivel de transcripción inicial al cabo de un mes post-HP70% (figuras 11A,B).

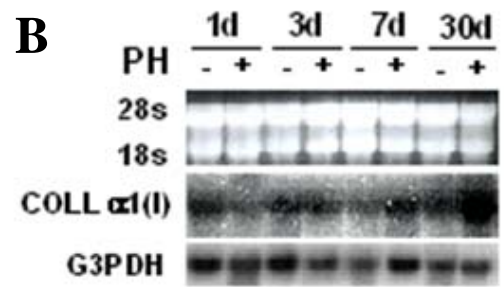
9.4.2 Estimulación del recambio de la prolina. En el hígado sano, la HP70% se asoció al aumento en la poza de prolina libre, acompañado de una reducción temprana en su oxidación, que se recupera posteriormente. La poza de prolina libre también aumentó después de HP70% en el hígado fibrótico, permaneciendo más elevada que el hígado sano, a pesar de una estimulación tardía de la oxidación de la prolina, de menor intensidad que el hígado sano post-HP70% (figura 12).

9.4.3 Estimulación síntesis colagénica (prolina incorporada a colágena). La actividad transcripcional del gen de colágena α -1 (I), post-HP70%, coincidió con la tasa de síntesis de la proteína colagénica, estimada como la incorporación de prolina marcada a colágena. Sin embargo, los animales fibróticos control mostraron una formación elevada de colágena a pesar de los niveles reducidos de RNAm de colágena α -1 (I) (figura 11C).

A

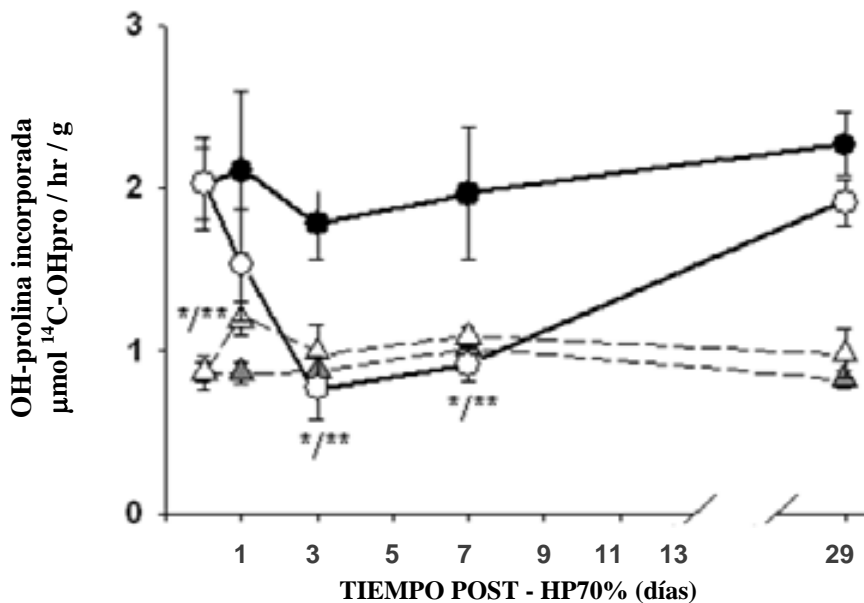


B



(*) $p < 0.025$ vs control T0
 (**) $p < 0.025$ vs control sin HP70%

C



(*) $p < 0.025$ vs control T0
 (**) $p < 0.025$ vs control sin HP70%

Figura 11. Estimulación de la síntesis colagénica en el hígado fibrótico post-HP70%. La HP70% ocasionó la caída y la recuperación posterior del (A) RNAm de colágena tipo I en el hígado fibrótico, determinado por (B) ensayo de Northern blot. El RNAm del hígado fibrótico control disminuyó tras discontinuar la administración de suero porcino. La recuperación del RNAm post-HP70% coincidió con el aumento en (C) la actividad de incorporación de C^{14} -prolina a la proteína colagénica, determinada en rebanadas de hígado. La estimación del RNA de COLLa1(1) se presentan como porcentaje del control no fibrótico, considerado como 100%. Se utilizó el RNAm de G3PDH para normalización.

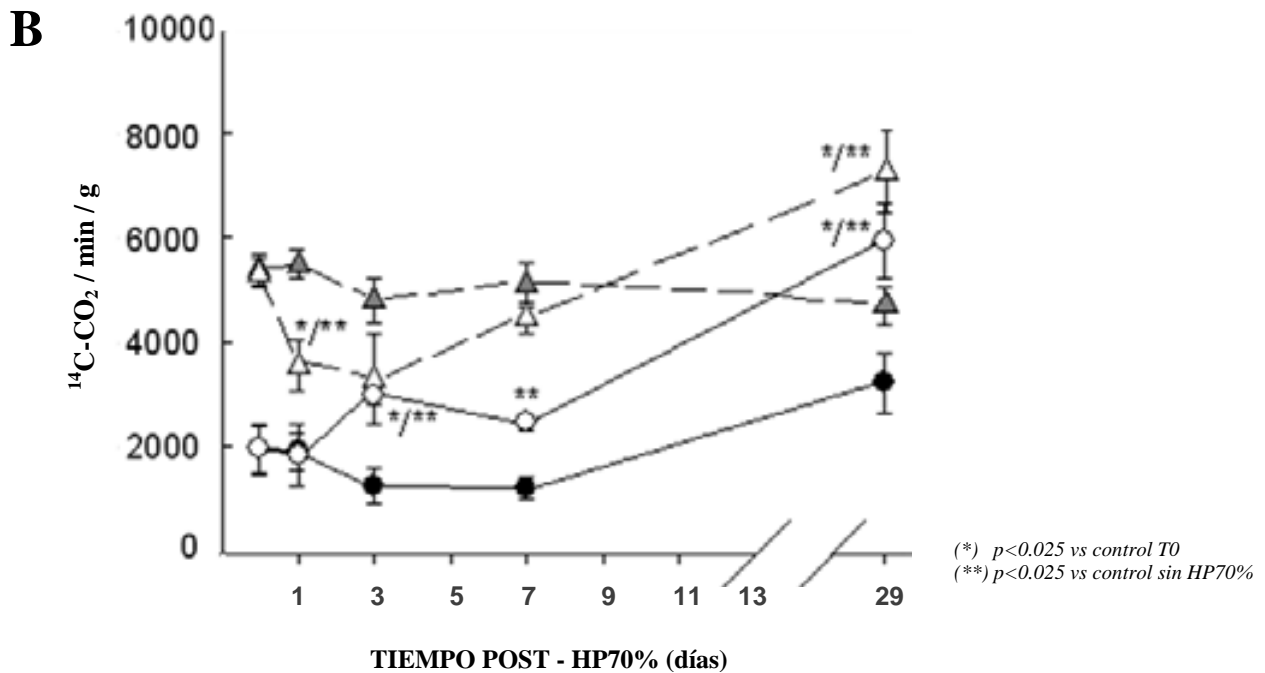
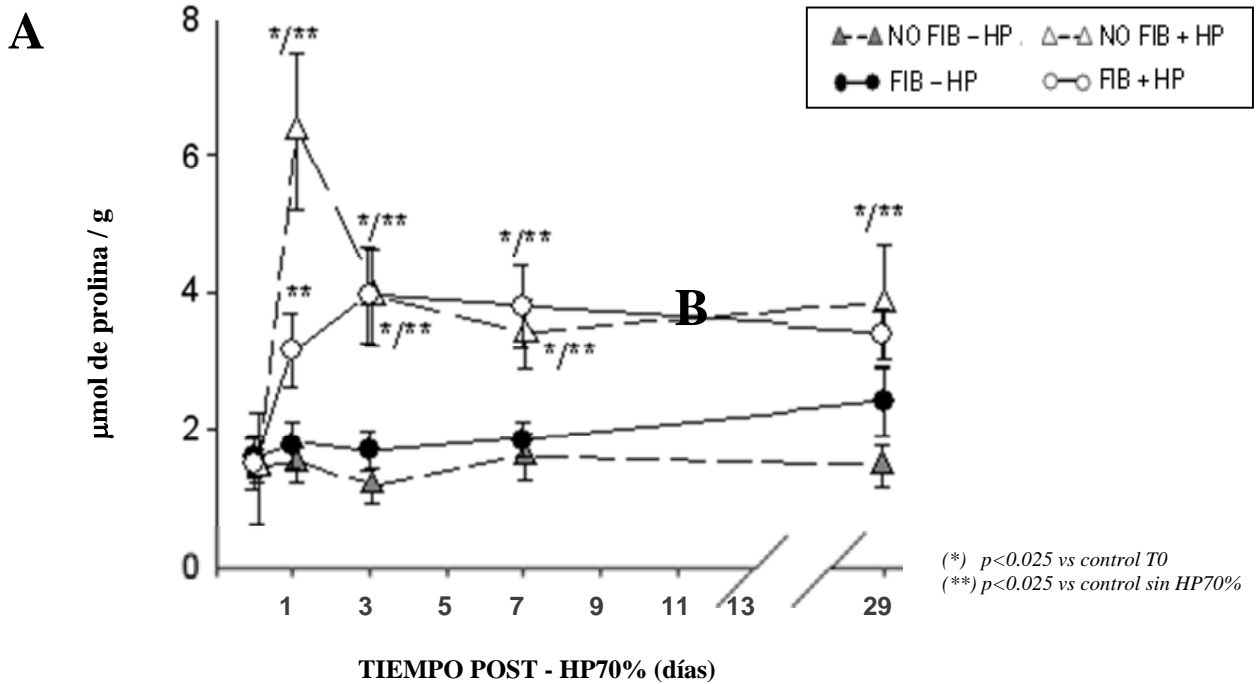


Figura 12. Estimulación del recambio metabólico de la prolina post-HP70%. (A) La poza de prolina libre aumentó después de la HP70%, tanto en el hígado sano como en el fibrótico, acompañándose del incremento de **(B)** su propia oxidación, que se realiza a nivel mitocondrial. Dichos cambios tuvieron una menor intensidad en el hígado fibrótico post-HP70%, y no se presentaron en el hígado fibrótico control. Los resultados se expresaron como media±DE de 5 animales por grupo.

9.4.4 Estimulación de la degradación matricial (actividad total de colagenasa y expresión de gelatinasas, MMP-13, TIMP-1 y TIMP-2). La actividad total de colagenasa del hígado fibrótico (fiura 13) permaneció sin cambios, no obstante el incremento en la expresión de MMP-13, TIMP-1 y TIMP-2 (figura 15). La HP70% se asoció a una elevación en la actividad total de colagenasa y del índice de colagenasa/colágena en los animales fibróticos, que coincidió con 1) el aumento persistente de actividad gelatinolítica, caracterizada por la expresión de MMP-2 y proMMP-9 (figura 14), 2) la caída transitoria y recuperación de MMP13 y 3) la disminución en la expresión de TIMP-1 y TIMP-2 (figura 15). La actividad total de colagenasa en los animales sin HP70% disminuyó continuamente y la expresión de MMP-13 y TIMPs regresó a sus niveles basales. Un comportamiento similar se observó en los animales sanos (figura 15).

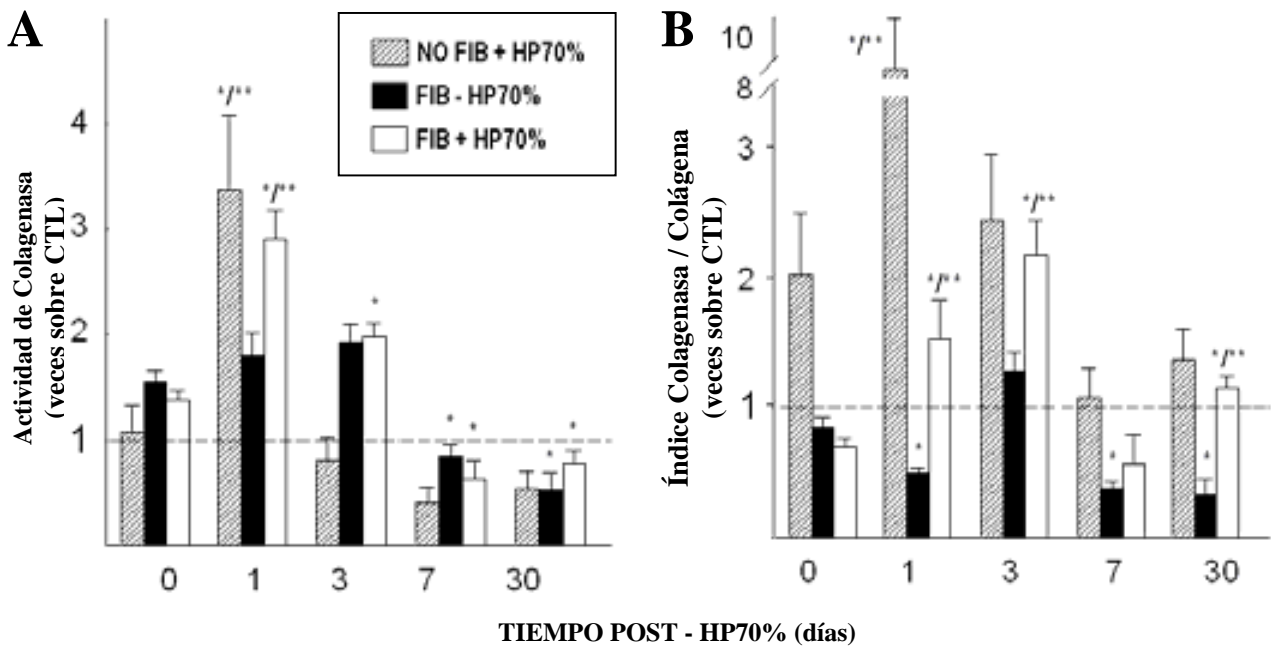


Figura 13. Estimulación de la actividad total de colagenasa post-HP70%. La HP70% se asoció al incremento de (A) la actividad total de colagenasa y del (B) índice de colagenasa/colágena, tanto en el hígado sano como en el hígado fibrótico. El control sin HP70% mostró un descenso de la actividad de colagenasa hacia el final del periodo estudiado. La actividad total de colagenasa se expresó como veces sobre el control sano sin HP70%, cuya actividad enzimática fue de 0.25 ± 0.03 nmols de colágena degradada/hr/mg de proteína, y un índice colagenasa/colágena calculado de 0.05 ± 0.01 . Los resultados se muestran como media \pm DE de 6 animales por grupo. * $p < 0.025$ vs el tiempo 0; ** $p < 0.025$ vs control sin HP70%.

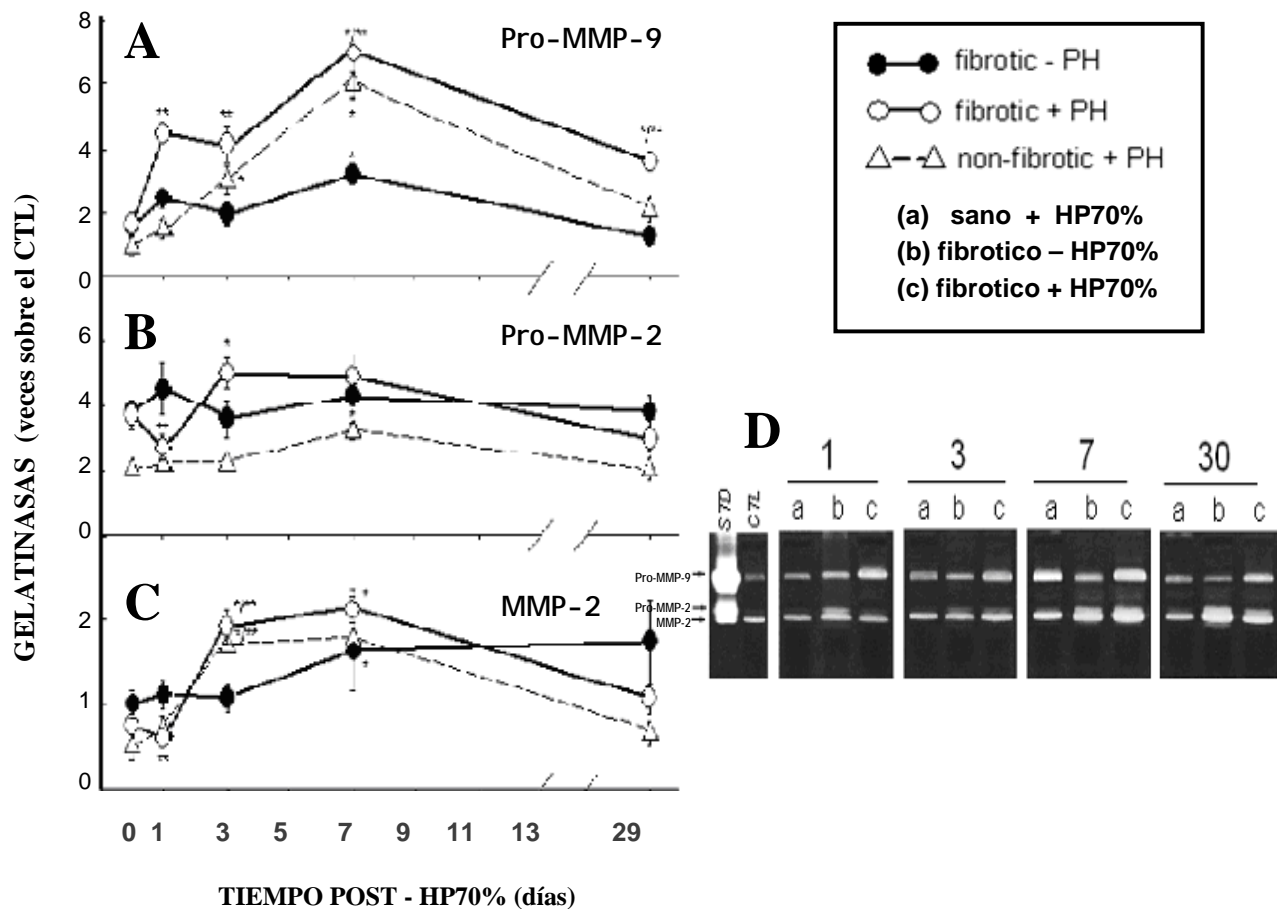


Figura 14. Estimulación de la expresión de gelatinasas post-HP70%. La actividad gelatinolítica de (A) pro-MMP9, (B) pro-MMP2 y (C) MMP2, estimadas mediante (D) zimografía en gel, se incrementó tras la HP70% en el hígado fibrótico. El hígado sano mostró una tendencia similar, mientras que el hígado fibrótico control presentó un aumento progresivo de la MMP-2. La actividad gelatinolítica se expresó como veces sobre el control sano sin HP70%. STD=control positivo de zimografía. CTL=control sano sin HP70%. Los resultados se muestran como media±DE de 5 animales por grupo. * $p < 0.025$ vs el tiempo 0; ** $p < 0.025$ vs control sin HP70%.

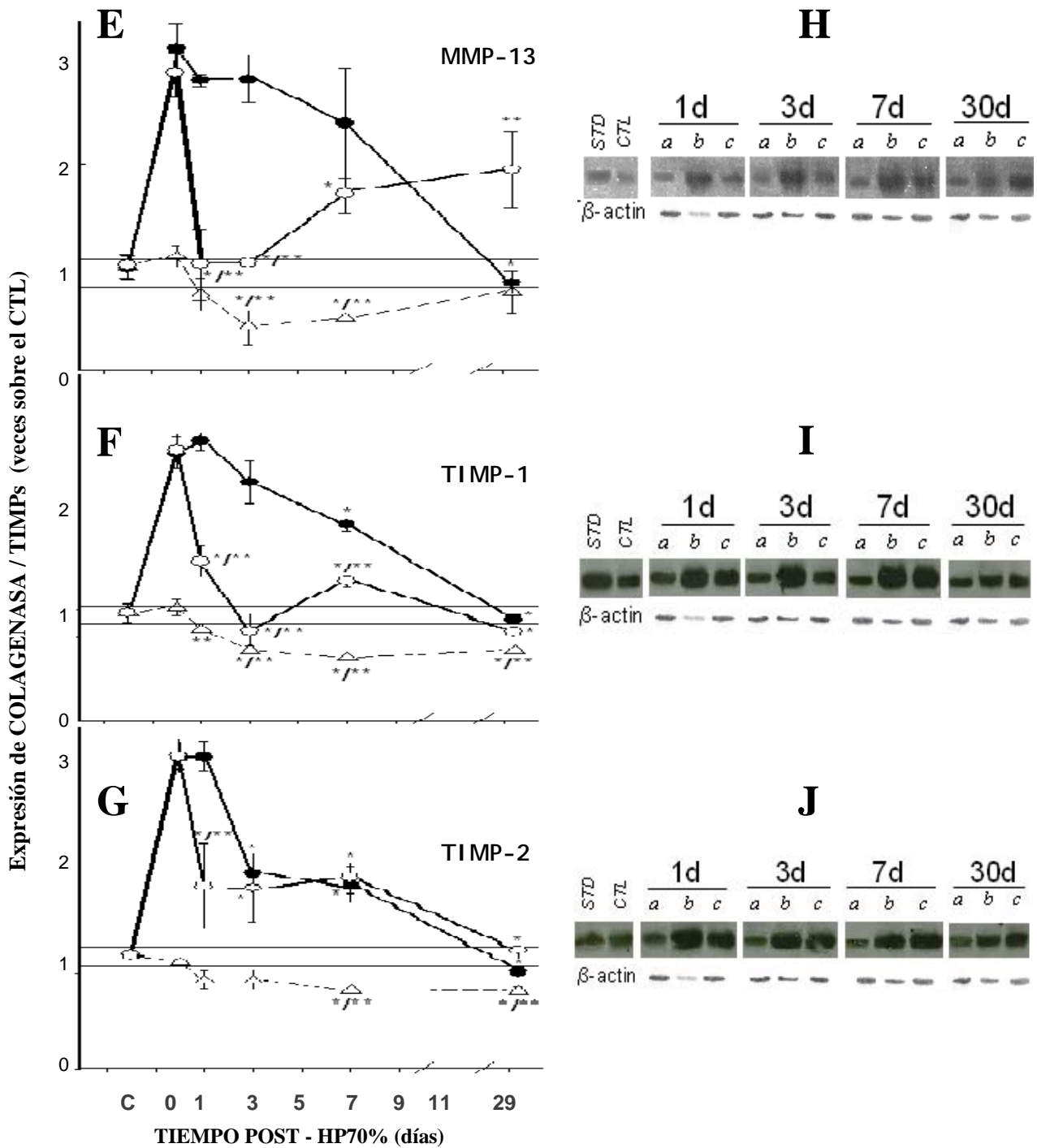
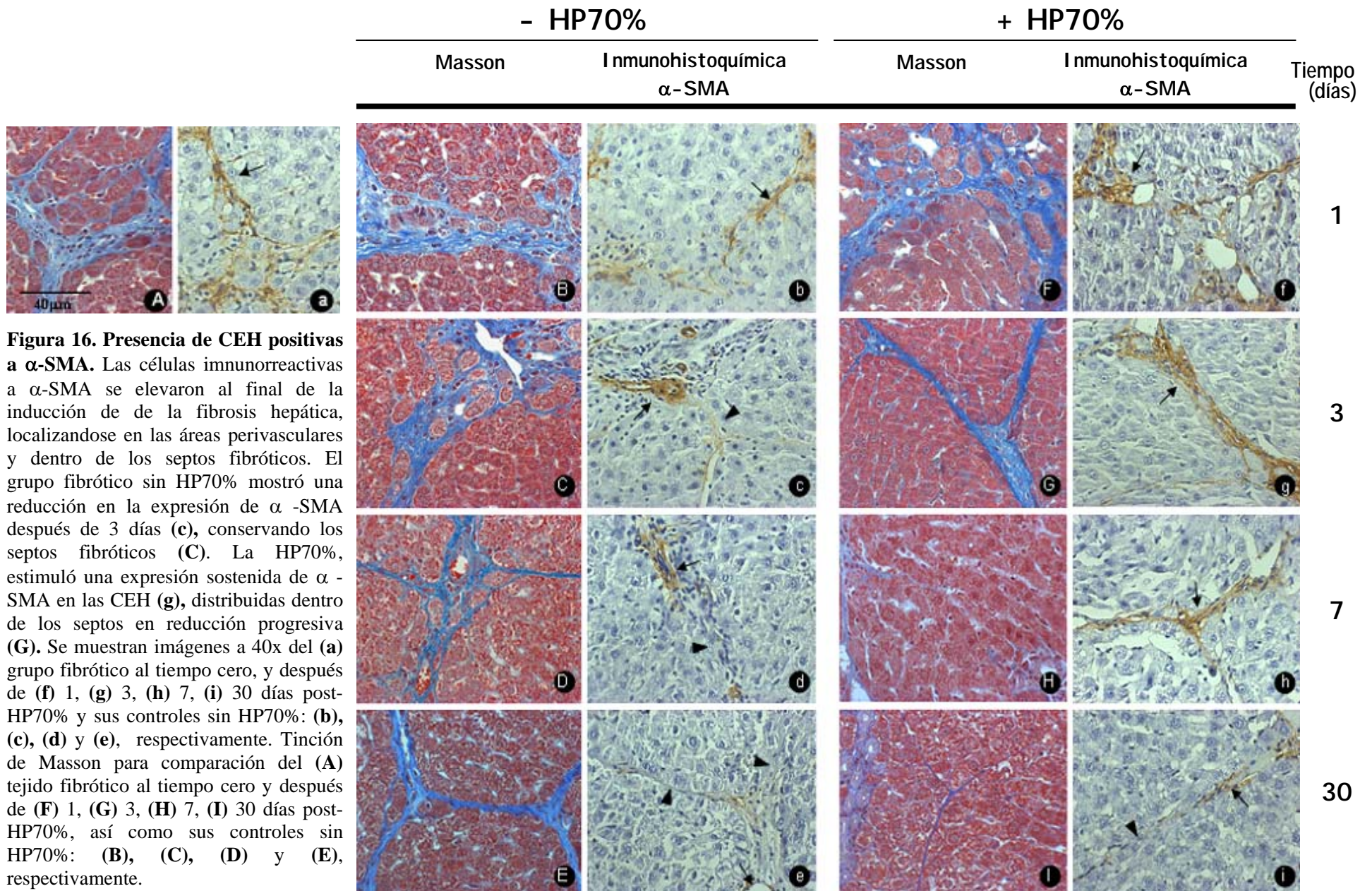


Figura 15. Estimulación de la expresión de MMP-13 y descenso de TIMP-1 / TIMP-2 post-HP70%. La HP70% causó la disminución transitoria de la proteína (E) MMP-13, que precedió a su recuperación hasta alcanzar un valor similar al inicial, y que acompañó a la elevación de las gelatinasas. Tanto (F) TIMP-1 como (G) TIMP-2 mostraron su disminución temprana post-HP70%. El hígado fibrótico control tuvo una disminución lenta en la expresión de MMP-13 y TIMPs. Se muestran las bandas del Western blot correspondientes a las proteínas MMP-13, TIMP-1 y TIMP-2 ((H),(I),(J), respectivamente), normalizadas con β -actina. La expresión del control sano sin HP70% se muestra entre las barras horizontales. STD=control positivo de cada proteína. CTL=control sano sin HP70%.

9.4.5 Persistencia de las CEH activadas post-HP70%. A la microscopia electrónica, hubo más CEH con pocos lípidos (apariencia “activada”) en el hígado fibrótico. Tras la operación falsa su número se redujo progresivamente, mientras que post-HP70% mantuvieron un conteo similar. En el ensayo de inmunohistoquímica se identificó la población y localización de CEH activadas que expresaron la proteína α -SMA, conocidas por su elevado potencial fibrogénico. Las células α -SMA positivas se distribuyeron en áreas perivasculares y dentro de los septos de fibrosis. Después de tres días, el grupo fibrótico control mostró una reducción rápida en la expresión de α -SMA, con persistencia de los septos fibróticos. Tras la HP70%, el hígado fibrótico mostró una expresión sostenida de α -SMA en las CEH que estaban localizadas en el interior de los septos. Mismos que experimentaron una resolución progresiva. Después de 30 días, el hígado fibrótico con y sin HP70% mostró una expresión mínima de células α -SMA positivas (figura 16).



El análisis de imagen del área de células inmunorreactivas mostró incremento de células α -SMA (+) después la HP70%, con significancia estadística después de 3 días post-HP70% (HP=2.3±0.17 vs CTL=1.5±0.24).

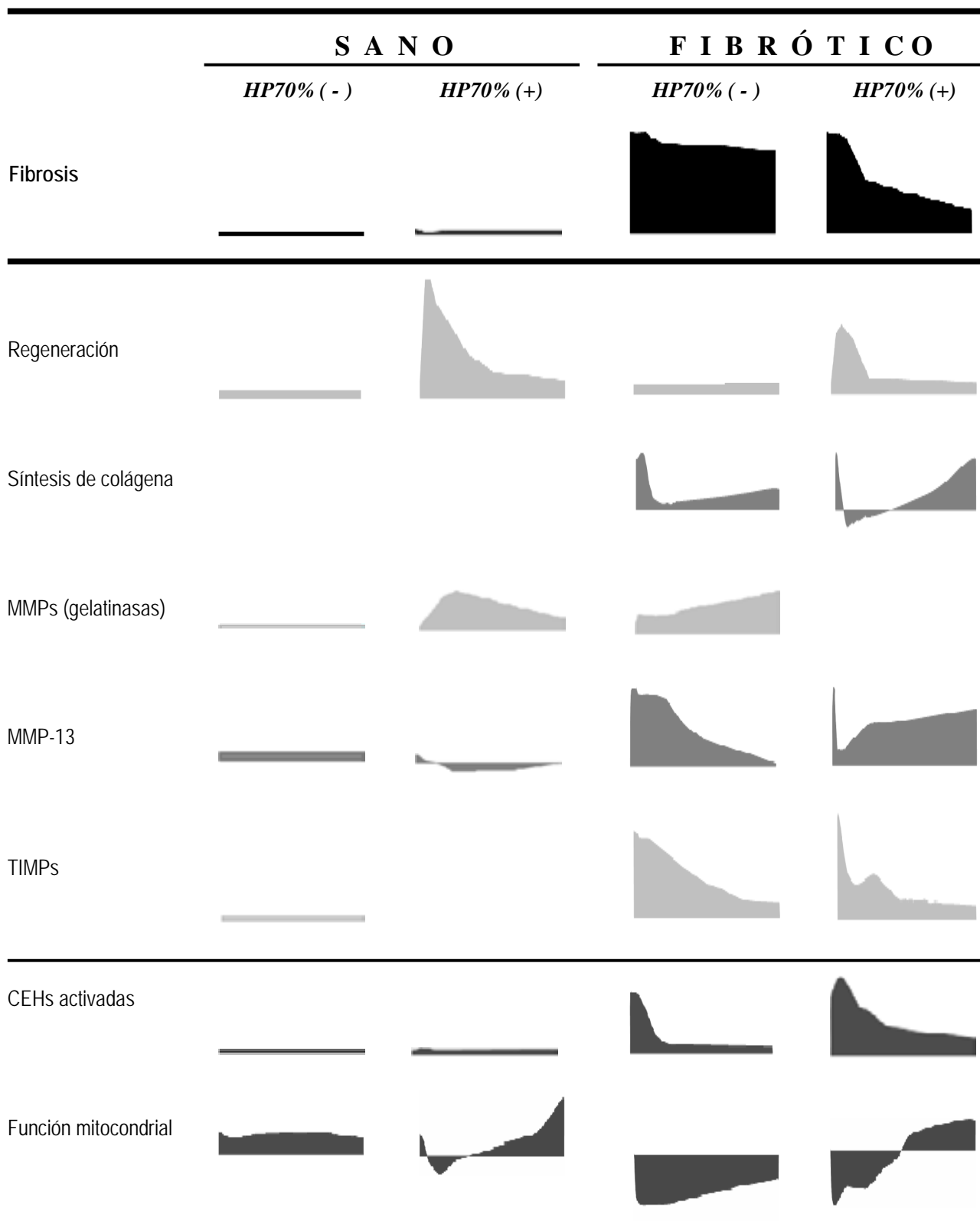
X. DISCUSIÓN

La capacidad de regeneración del hígado fibrótico después de HP70% es limitada y frecuentemente insuficiente en comparación con el hígado sano (5,106,106A). Existen varias posibles explicaciones. A diferencia del hígado sano, la regeneración del hígado fibrótico se caracteriza por: 1) la alteración en la respiración mitocondrial, con repercusión en el estado energético (49), 2) la disminución de marcadores de proliferación celular como PCNA y ciclina D1, probablemente relacionada a una expresión temprana de TGF- β 1 (75,77,78,106), y 3) la reducción del número de receptores hepáticos para factores de crecimiento (78). A pesar de estas limitantes, el hígado fibrótico es capaz de incrementar su potencial regenerativo en respuesta a la estimulación de citocinas y factores de crecimiento como HGF, VEGF y ALR (93,95,96).

Independientemente de su capacidad regenerativa, es claro que tanto el hígado fibrótico como el hígado sano presentan modificaciones en la MEC después de un estímulo regenerativo como es la HP70%. Se sabe que estos cambios matriciales son variables y que tienen implicaciones reguladoras en procesos como la proliferación, la adhesión celular, la migración, la diferenciación, la apoptosis y la fibrogénesis (6,117). Por lo que la identificación de los mecanismos involucrados en tal remodelación permitirá un mejor entendimiento del proceso, y podrá sugerir nuevos blancos potenciales, más específicos, para la intervención orientada a la prevención y reversión de la respuesta fibrogénica en la enfermedad hepática crónica, el estímulo a la regeneración hepática y/o la limitación del crecimiento e invasión del carcinoma hepatocelular asociado a un hígado fibrótico.

Este trabajo evaluó el recambio metabólico de la colágena durante la remodelación de la MEC fibrótica del hígado, que ocurre en tras la HP70%. Según nuestra hipótesis, la regeneración hepática estimula una re-adaptación del equilibrio entre la síntesis y la degradación matricial, que puede favorecer características tisulares más similares a las del tejido sano.

Para facilitar la interpretación, a continuación se ofrece una síntesis de los resultados más relevantes del presente estudio.



Síntesis de los resultados obtenidos en el hígado fibrótico post-HP70%. Se muestra la tendencia de las variables de interés principal a lo largo de 30 días. En la etapa temprana prevalece el estímulo proliferativo sobre el fibrogénico. En la etapa tardía disminuye el estímulo proliferativo e incrementa el recambio de la MEC, caracterizado la estimulación tanto de la fibrogénesis como de la colagenolisis. En este escenario, se sugiere el papel regulador de las CEH activadas, los hepatocitos y/o el estímulo de la función mitocondrial.

Conforme a nuestro primer objetivo, se indujo la fibrosis hepática en la rata mediante la administración de suero heterólogo. Las características histológicas obtenidas fueron semejantes a las descritas en el modelo original, y ofrecieron algunas ventajas para nuestro estudio: una fibrosis muy lentamente reversible, la escasa necrosis del parénquima y un potencial regenerativo conservado (107), permitiendo la evaluación confiable de las modificaciones de la fibrosis tras la HP70%. Este trabajo muestra la resolución progresiva y casi completa de la fibrosis hepática después de 30 días post-HP70%, que no sucede en los animales con operación falsa. Esta es la primera descripción de los cambios matriciales durante la regeneración hepática en este modelo, puesto que no existían antecedentes al respecto. Dichos cambios parecen ser particulares de este tipo de fibrosis hepática, ya que otros modelos, por ejemplo el de cirrosis inducida con CCl_4 en ratas, muestran una reducción variable del tejido fibrótico tras la HP70%, existiendo una relación indirecta entre el grado de fibrosis y la magnitud de reversión fibrótica post-HP70% (80,81,89). Esta diferencia probablemente se deba a que otros agentes hepatotóxicos inducen un daño tisular más intenso, con mayor fibrosis, distorsión de la arquitectura y cambios necro-inflamatorios, donde el reajuste en la remodelación matricial sea insuficiente (118,119).

De acuerdo con el segundo objetivo, se determinó la colágena depositada en el hígado fibrótico post-HP70%. Tanto el contenido de colágena estimado bioquímicamente, como la proteína detectada por inmunoblot, mostraron una reducción de casi un tercio del valor inicial de la colágena, después de 30 días post-HP70% (5.9 ± 0.7 tiempo cero vs 2.1 ± 0.3 mg colágena/g de hígado; $p < 0.001$). Los mecanismos responsables de este efecto no son muy claros. Se ha propuesto que el incremento de la masa de hepatocitos en proliferación, sin una modificación verdadera del mesenquima, podrían explicar la reducción relativa de la MEC mediante una modificación "pasiva" o "efecto de dilución" (16). Para probar si esta teoría podía explicar los cambios observados en este modelo, se realizó el análisis morfométrico en laminillas teñidas con tricrómico de Masson. Se encontró que las variaciones tempranas del parénquima (25 ± 0.3 , 23 ± 0.4 y 24 ± 0.5 , en los tres primeros días post-HP70%, respectivamente) no se asociaron a modificación del área del mesénquima (4.9 ± 0.22 , 4.8 ± 0.23 y 4.7 ± 0.33 , a los mismos días post-HP70%); además de que la reducción matricial progresiva no se limitaba exclusivamente a las áreas donde predominaban las figuras mitóticas. Es decir, a las áreas de proliferación del parénquima; y la reducción del contenido de colágena hepática determinada bioquímicamente, se conservó aún después de normalizar los resultados con los marcadores de proliferación. Lo anterior sugiere que la HP70% provocó una disminución real y progresiva del depósito de MEC en este modelo de fibrosis hepática.

El siguiente objetivo fue el estudio del recambio matricial, para investigar si los procesos de síntesis y/o degradación son capaces de explicar la remodelación de la MEC fibrótica post-HP70%. Sabiendo que el recambio matricial se regula por la síntesis de colágena y la actividad del sistema fibrinolítico, a través de proteínas como urocinasa, plasmina, MMPs y TIMPs (34,71,72,74,120), nuestro estudio se orientó hacia el metabolismo de la colágena después de la HP70%, como reflejo del recambio de la MEC (13,121-123).

Para evaluar la síntesis de la colágena se determinaron 1) los niveles RNAm del gen de colágena tipo I, 2) la posa hepática de prolina y su oxidación, así como 3) la tasa de incorporación de este aminoácido a la proteína colagénica. El hígado fibrótico mostró un estímulo fibrogénico sostenido, que parece regularse a diferentes niveles de la síntesis proteica. Éste, se caracterizó por la escasa oxidación de prolina y el aumento en la incorporación de prolina a colágena, a pesar de la disminución temprana del RNAm de colágena I. Por otro lado, la HP70% indujo un estímulo fibrogénico completo, tanto en el hígado sano como en el fibrótico. Dicho estímulo se caracterizó por el aumento del RNAm de colágena I y la incorporación de prolina, así como el aumento de la posa de prolina y también de su oxidación. A pesar de esta tendencia fibrogénica, la HP70% no condicionó un estado fibrosante, pero sí se asoció a la regeneración del órgano. Este último efecto ha sido poco estudiado, debido a la consideración que un estímulo fibrogénico, en el hígado adulto, acompaña por lo general a un estado pro-fibrótico. Inclusive, se ha sugerido que la regeneración del hígado cirrótico es mejor si la síntesis colagénica está inhibida (94,124). El contraste de nuestros resultados sugiere que un estímulo fibrogénico puede ser realmente pro-fibrótico dependiendo de factores como el grado de daño hepático, la progresión fibrótica, el tipo de estímulo fibrogénico y el equilibrio general al considerar la degradación (125,126).

Adicionalmente, el estudio de la biodisponibilidad tisular de la prolina permitió hacer otras interpretaciones. La escasa oxidación hepática de prolina en el hígado fibrótico se restauró tras la HP70%. Esto llama la atención debido a que la oxidación de la prolina es un reflejo de la actividad mitocondrial, por lo que se infiere que este modelo conserva la función mitocondrial y es posible su estimulación mediante la HP70%, como ocurre en el animal sano. Esto concuerda con otros trabajos en el modelo de cirrosis hepática inducida por CCl₄, que sugieren el papel de la actividad mitocondrial y el estado redox NAD/NADH como reguladores de la síntesis y de la degradación de la colágena (55).

Tal efecto podría estar mediado a través de: 1) las enzimas limitantes de la oxidación de la prolina, 2) la regulación de la expresión y la actividad de MMPs y TIMPs, o bien 3) la comunicación intercelular y el estímulo de la apoptosis de CEH (55,127,126).

Para evaluar la degradación de la colágena, el primer abordaje fue determinar la actividad de colagenasa total. Se observó que la HP70% estimuló la actividad de colagenasa tanto en el hígado sano como en el hígado fibrótico, pero en este último la respuesta colagenolítica fue discretamente menor. Esto sugiere que la degradación de la MEC fibrótica en el hígado es susceptible de estimulación, aunque la respuesta pueda ser limitada. El siguiente paso fue caracterizar dicha actividad de colagenasa a través de la expresión de MMPs y TIMPs, ya que tanto el(los) tipo(s) de MMPs y TIMPs involucrado(s), como su equilibrio particular, parecen tener un papel importante en el recambio matricial, la remodelación de la fibrosis y la regeneración hepática (34,40,94-96). La actividad colagenolítica que mostró el hígado fibrótico durante la regeneración se asoció a la expresión temprana de gelatinasas, particularmente pro-MMP-9 y MMP-2, que precedió a un estímulo en la expresión de colagenasa (MMP-13) y a la disminución en la expresión de TIMP-1 y TIMP-2; mientras que la reversión espontánea en el hígado fibrótico se asoció al incremento lento y progresivo en la expresión de MMP-2 junto a la escasa expresión MMP-13 y TIMPs. La dinámica de MMPs y TIMPs que mostró el hígado fibrótico post-HP70% concuerda con el incremento en la expresión tanto de MMP-2 (gelatinasa) como de MMP-14 (colagenasa) observada en modelos de resolución de la fibrosis hepática; además de que ambas enzimas pueden ser activadas por el sistema plasminógeno-plasmina, presente durante la regeneración hepática (72,129,130). Por otro lado, la expresión de los TIMPs, y de la MMP-2 durante la reversión espontánea de la fibrosis está de acuerdo con otros trabajos, y sugiere la participación de las células de Kupffer bajo el estímulo de citocinas como TGF β 1 (54,129,131). El incremento aislado de esta gelatinasa se acompañó de la degradación lenta de la MEC fibrótica, sugiriendo que probablemente se requiere la acción secuencial de las gelatinasas y las colagenasas para una degradación matricial más eficiente, estable y prolongada, dado que las proenzimas de las gelatinasas y las colagenasas forman un complejo proenzimático que estabiliza su unión a la colágena (130,132).

Finalmente, el patrón de expresión de MMPs inducido en el hígado fibrótico tras la HP70% se caracterizó por el aumento de actividad de pro-MMP-9, sin mucha variación de MMP-2, sugiriendo la participación predominante de un tipo celular. De acuerdo con los modelos de resolución de fibrosis hepática, se ha sugerido que la MMP-9 es producida principalmente por las CEH, mientras que la expresión de MMP-2 sugiere la participación de las células de Kupffer (133), por lo que evaluamos la presencia de las CEH activadas en este modelo.

Se observó el aumento de las CEH activadas al final del periodo de inducción de la fibrosis hepática, y persistieron activadas durante el periodo post-HP70%, sugiriendo su papel tanto en la progresión fibrótica como en la regeneración hepática en este modelo. Cabe señalar que, la presencia de las CEH activadas que acompañan a una regeneración hepática donde se observa la reducción de la MEC fibrótica, no concuerda con el papel predominantemente fibrogénico que se le ha atribuido a estas células. Esto podría deberse al reemplazo de clonas de CEH activadas menos fibrogénicas (134,135), o a la participación de otras poblaciones celulares. En esta última consideración, los hepatocitos, las células de Kupffer y las células endoteliales sinusoidales, pueden jugar un papel clave ya que también sintetizan las MMPs y los TIMPs requeridos para la remodelación de la MEC fibrótica (66,67), y su contribución no se evaluó en el presente trabajo. Particularmente los hepatocitos cuentan con un gran potencial de degradación matricial (10,66), lo cual se ha confirmado en varios trabajos (136,137). Además, su población celular y su potencial proliferativo sugieren una participación potencial en la remodelación de la MEC fibrótica durante el daño hepático crónico y la regeneración hepática (138).

Cada vez existe más información de interacciones y procesos poco reconocidos para los hepatocitos, las CEH, las células de Kupffer, las células endoteliales sinusoidales e inclusive algunas células extrahepáticas con influencia hepática. Una explicación atractiva para los hallazgos en este modelo es la interacción entre los hepatocitos y las CEH a través de sistema de regulación de NGF y su receptor $p^{75}NTR$. NGF es una neurotrofina producida por los hepatocitos en regeneración, cuyo receptor $p^{75}NTR$ se expresa en las CEH. Dicha interacción molecular es dinámica y se regula en función del exceso de la MEC y la regeneración hepática, habiendo una modulación recíproca entre la proliferación de hepatocitos y la activación de CEH, su potencial fibrogénico y apoptosis (68,69,139,). Finalmente, es posible que algunas citocinas como HGF, $TGF\beta 1$, VEGF, trombopoyetina y enzimas como la heparanasa puedan participar en este modelo, dado su efecto regulador de la remodelación de la MEC cirrótica y al mismo tiempo de la regeneración hepática (140-142).

Con base en los resultados obtenidos, el presente estudio sugiere que el hígado fibrótico posee un metabolismo matricial dinámico y adaptativo. Esto se hace más evidente ante un estímulo regenerativo como la HP70%, donde se induce un nuevo equilibrio entre síntesis y degradación de los componentes matriciales, siendo posiblemente un mecanismo clave para la reorganización de la MEC fibrótica. En el modelo estudiado parece que las CEH activadas y una función mitocondrial preservada juegan un papel regulador principal, aunque no se puede excluir la participación de otras células y procesos con potencial de remodelación de la MEC fibrótica.

XI. CONCLUSIONES

- La HP70% induce la regeneración del hígado con fibrosis de tipo inmunológico en la rata, pero su capacidad regenerativa es limitada en comparación con la del hígado sano.
- La regeneración del hígado fibrótico, inducida por la HP70%, se acompañó de la reducción significativa de la MEC fibrótica, estimada a través del contenido de colágena y la determinación morfométrica del área de fibrosis.
- El hígado fibrótico en regeneración mostró una fibrogénesis estimulada, que se caracterizó por el aumento de: 1) el RNAm de colágena tipo I, 2) la poza de prolina libre y 3) su incorporación a la proteína colagénica.
- La HP70% indujo al mismo tiempo la estimulación de la actividad degradativa matricial, que se asoció a la expresión de MMP-2, proMMP-9, MMP-13 y a la reducción de los niveles de TIMP-1 y TIMP-2 en el hígado fibrótico.
- Se sugiere que la HP70% indujo un equilibrio particular entre la síntesis y la degradación matricial, que condicionó un estímulo fibrogénico “no fibrosante”, que incluso favoreció la reducción de la MEC fibrótica.
- Aunque la evidencia es indirecta, los datos sugieren la participación de una función mitocondrial conservada en el recambio metabólico de la colágena, así como el papel de las CEH activadas, tanto en la progresión fibrótica como en la proliferación hepatocelular, aunque el papel de otras poblaciones celulares no se puede excluir.

XII. REFERENCIAS

1. Nahum Méndez-Sánchez, Antonio R. Villa, Norberto C. Chávez-Tapia, Guadalupe Ponciano-Rodríguez, Paloma Almeda-Valdés, Daniela González, Misael Uribe. Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. *Ann Hepatol* 2005;4:52-55.
2. <http://www.salud.gob.mx/apps/htdocs/estadisticas/mortalidad/2004/mortalidadc052004.xls>
3. Rodríguez-Hernández H, Jacobo-Karam JS, Castanon-Santillan Mdel C, Arambula-Chavez M, Martínez-Aguilar G. Survival in patients with liver cirrhosis at the Durango, IMSS Regional General Hospital. *Gac Med Méx* 2002;138:325-330.
4. Serfaty L, Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes Metab* 2008;34:634-637.
5. Andiran F, Kilinc K, Renda N, Ayhan A, Tanyel FC. Lipid peroxidation and extracellular matrix in normal and cirrhotic rat livers following 70% hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2003;50:805-808.
6. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001;3:351-372.
7. Issa R, Zhou X, Trim N, Millward-Sadler H, Krane S, Benyon C, Iredale J. Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl₄-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration. *FASEB J* 2003;17:47-49.
8. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-218.
9. Rappaport AM and Wanless IR. Physioanatomic Considerations. In: Schiff L, Schiff ER. *Diseases of the Liver*, seventh ed. Lippincott Company, Philadelphia, 1993.
10. García de León M del C, Montfort I, Tello Montes E, López Vancell R, Olivos García A, González Canto A, Nequiz-Avendaño M, Pérez-Tamayo R. Hepatocyte production of modulators of extracellular liver matrix in normal and cirrhotic rat liver. *Exp Mol Pathol* 2006;80:97-108.
11. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001;161:1-151.
12. Hayasaka A, Saisho H. Serum markers as tools to monitor liver fibrosis. *Digestion* 1998;59:381-384.
13. Guañabens N, Parés A, Alvarez L, Martínez de Osaba MJ, Monegal A, Peris P, Ballesta AM, Rodés J. Collagen-related markers of bone turnover reflect the severity of liver fibrosis in patients with primary biliary cirrhosis. *J Bone Miner Res* 1998;13 :731-738.

14. 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.
15. Roskams T, Rosenbaum J, De Vos R, David G, Desmet V. Heparan sulfate proteoglycan expression in chronic cholestatic human liver disease. *Hepatology* 1992;24:524-532.
16. Martínez-Hernández A. and Sebastián-Amenta P. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *Faseb J* 1995;9:1401-1410.
17. Rojkind M and Mourelle M. The liver as a Bioecological System: Modifications during Regeneration and Repair. In: Nimni ME. *Collagen Vol. II*. Ed. CRC Press Inc. Florida, 1988.
18. Rojkind M and Greenwel Patricia. Animal Models of Liver Fibrosis. *Adv Vet Sci Comp Med* 1993;37:333-335.
19. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. Minireview. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250.
20. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:728-735.
21. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001;11:S37-S43.
22. Rockey DC. Pathophysiology of Liver Disease. *Clinics in Liver Disease* 2000;4:1-36.
23. Arthur MJP. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Phys Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G245-G249.
24. Perez-Tamayo R. *Patología Molecular en: Perez-Tamayo Ruy. Mecanismos de la Enfermedad. Una introducción a la patología. 2ª. Ed. Year book medical publishers Chicago 1985.*
25. Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MD, Sands E, Suliman I, Trim N, Knorr A, Arthur MJ, Benyon RC, Iredale JP. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 2004;126:1795-1808.
26. Woessner, JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-2154.
27. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:221-233.
28. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562-573.

29. Yong VW. Metalloproteinases: Mediators of Pathology and Regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:931-944.
30. Sounni NE, Janssen M, Foidart JM, Noel A. Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biology* 2003;22:55–61.
31. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267-283.
32. Melendez-Zajgla J, Del Pozo L, Ceballos G, Maldonado V. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4. The road less traveled. *Mol Cancer* 2008;7:85-96.
33. Aliño SF, Herrero MJ, Noguera I, Dasí F, Sánchez M. Pig liver gene therapy by noninvasive interventionist catheterism. *Gene Ther* 2007;14:334-343.
34. Diehl AM. Liver regeneration. *Front Biosci* 2002;7:e301-e314.
35. Roselli HT, Su M, Washington K, Kerins DM, Vaughan DE, Russell WE. Liver regeneration is transiently impaired in urokinase-deficient mice. *Am J Physiol* 1998;275:G1472-G1479.
36. Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi H, Okamoto E, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999;5:226-230.
37. Mourelle M and Rubalcava V. Regeneration of the liver after carbon tetrachloride. *J Biol Chem* 1981;256:1656-1660.
38. Court FR, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Med* 2002;89:1089-1095.
39. Werlich T, Stiller JK, Machnik G. Experimental studies on the stem cell concept of liver regeneration. *Exp Toxicol Pathol* 1998;50:73-77.
40. Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000;113:443-453.
41. Swindle CS, Tran KT, Johnson TD, Banerjee P, Mayes AM, Griffith L, Wells A. Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *J Cell Biol* 2001;154:459-468.
42. Filla MS, Dam P, Rapraeger AC. The cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates fibroblast growth factor-2 binding and activity. *J Cell Physiol* 1998;174:310-321.
43. Akerman PP, Cote SQ, Yang C, McClain S, Nelson G, Bagby J, Diehl AM. Antibodies to tumor necrosis factor alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol* 1992;263:G579-G585.

44. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto EE, Furth V, Tabú R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996;274:1379-1383.
45. Saad BK, Frei FA, Scholl F, Fontana A, Maier P. Hepatocyte-derived interleukin-6 and tumor-necrosis factor alpha mediate the lipopolysaccharide-induced acute-phase response and nitric oxide release by cultured rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1995;229:349-354.
46. Liu Y, Michalapoulos GK, Zarnegar R. Structural and functional characterization of the mouse hepatocyte growth factor gene promoter. *J Biol Chem* 1994;269:4152-4157.
47. Simpson KJ, Lukas NW, Colletti L, Strieter RM, Kunkel S. Cytokines and the liver. *J Hepatol* 1997;27:1120-1132.
48. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43:S45-53.
49. Pinzani M, Rombouts K, Colagrande S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *J Hepatol* 2005;42:S22-S36.
50. Kossakowska AE, Edwards DR, Lee, SS, Urbanski LS, Stabbler AL, et al. Altered Balance between Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors. *Am J Pathol* 1998;153:1895-1902.
51. Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJP, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clarck N, and Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996;24:176-182.
52. Iredale JP, Goddard S, Murphy G, Benyon RC, and Arthur MJP. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepatitis and activated human hepatic lipocytes. *Clin Sci (Colch)* 1995;89:75-81.
53. Albanis E. and Friedman SL. Hepatic Fibrosis. Pathogenesis and Principles of Therapy. *Clinics in Liver Disease*. 2001;5:1-17.
54. Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and nonparenchymal cells of the rat liver: regulation by TNF- α and TGF- β 1. *J Hepatol* 1999;30:48-53.
55. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Chagoya de Sánchez V. Possible role of cell redox state on collagen metabolism in carbon tetrachloride-induced cirrhosis as evidenced by adenosine administration to rats. *Biochim Biophys Acta* 1994;1200:93-99.
56. Krahenbuhl L, Ledermann M, Lang C, Krahenbuhl S. Relationship between hepatic mitochondrial functions in vivo and in vitro in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *J Hepatol* 2000;33:216-223.
57. Morimoto T, Isselhard W. Absence of mitochondrial enhancement in the remnant liver after partial hepatectomy in cirrhotic rats. *Res Exp Med (Berl)* 1992;192:89-97.

58. Hashimoto M, Watanabe G. Functional capacity of the cirrhotic liver after partial hepatectomy in the rat. *Surgery* 1999;126:541-547.
- 58A. Hashimoto M, Watanabe G. Functional restoration of cirrhotic liver after partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 2005;52:897-902.
59. Llorente L, Richaud Y, Alcocer N. Cytokine gene expression in cirrhotic and non-cirrhotic human liver. *Journal of Hepatology* 1997;24:555-563.
60. Friedman SL. Stellate cell activation in alcoholic fibrosis - an overview. *Alcoholism: clinical and experimental research* 1999;23:904-910.
61. Greenbaum LE. Cell cycle regulation and hepatocarcinogenesis. *Cancer Biol Ther* 2004;3:1200-1207.
62. Rojkind M. and Greenwel P. Pathophysiology of liver fibrosis. En: McIntyre N, Benhamou J-P, Bircher J, Rizzeto M and Rodes J. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. New York, Oxford Medical Publication. 1991;375-380.
63. Cheng K, Ye Z, Guntaka RV, Mahato RI. Biodistribution and hepatic uptake of triplex-forming oligonucleotides against type alpha1(I) collagen gene promoter in normal and fibrotic rats. *Mol Pharm* 2005;2:206-217.
64. Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* 2007;27:413-426.
65. Gressner OA, Rizk MS, Kovalenko E, Weiskirchen R, Gressner AM. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go?. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1024-1035.
- 65A. Friedman SL. Mac the knife? Macrophages- the double-edged sword of hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:29-32.
66. Monfort I, Pérez-Tamayo R, Alvizouri AM, Tello E. Collagenase of hepatocytes and sinusoidal liver cells in the reversibility of experimental cirrhosis of the liver. *Virchows Archiv - B Cell Pathology Including Molecular Pathology* 1990;59:281-289.
67. Upadhyya AG, Harvey RP, Howard TK, Lowell JA, Shenoy S, Strasberg SM. Evidence of a role for matrix metalloproteinases in cold preservation injury of the liver in humans and in the rat. *Hepatology* 1997;26:922-928.
68. Kendall TJ, Henedige S, Aucott RL, Hartland SN, Vernon MA, Benyon RC, Iredale JP. p75 neurotrophin receptor signaling regulates hepatic myofibroblast proliferation and apoptosis in recovery from rodent liver fibrosis. *Hepatology.* 2009;49:000-000.
69. Passino MA, Adams RA, Sikorski SL, Akassoglou K. Regulation of hepatic stellate cell differentiation by the neurotrophin receptor p75NTR. *Science* 2007;315:1853-1856.
70. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008;134:1655-1669.

71. Serandour AL, Loyer P, Garnier D, Courselaud B, Theret N, Glaise D, Guguen-Guillouzo C, Corlu A. TNFalpha-mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology* 2005;41:478-486.
72. Drixler TA, Vogten JM, Gebbink MF, Carmeliet P, Voest EE, Borel Rinkes IH. Plasminogen mediates liver regeneration and angiogenesis after experimental partial hepatectomy. *Br J Surg* 2003;90:1384-1390.
73. Mohammed FF, Pennington CJ, Kassiri Z, Rubin JS, Soloway PD, Ruther U, Edwards DR, Khokha R. Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration. *Hepatology* 2005;41:857-867.
74. Steer C. Liver Regeneration. *FASEB J* 1995;9:1396-1400.
75. Mitsue S, Hamanoue M, Tanabe G, Ogura Y, Yoshidome S, Aikou T, Nakamura T. Expression of HGF and TGF- β 1 mRNA after partial hepatectomy in rats with liver cirrhosis. *Surg Today* 1995;25:237-243.
76. Chen MF, Hwang TL. The regeneration of cirrhotic liver after partial hepatectomy: a study using the rat carbon tetrachloride-induced cirrhotic model. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 1994;18:71-75.
77. Andiran F, Ayhan Ayse, Tanyel C, Abbasoglu O, Iskender S. Regenerative capacities of normal and cirrhotic livers following 70% hepatectomy in rats and the effect of alpha-tocopherol on cirrhotic regeneration. *Journal Surg Res* 2000;89:184-188.
78. Masson S, Scotté M, François A, Coeffier M, Provot F, Hiron M, Ténrière P, Fallu J, Salier JP, Daveau M. Changes in growth factor and cytokine mRNA levels after hepatectomy in rat with CCl(4)-induced cirrhosis. *Am J Physiol* 1999;277:G838-G846.
79. Masson S, Scotté M, Garnier S, François A, Hiron M, Ténrière P, Fallu J, Salier JP, Daveau M. Differential expression of apoptosis-associated genes post-hepatectomy in cirrhotic vs. normal rats. *Apoptosis* 2000;5:173-179.
80. Maroş T, Seres-Sturm L, Lakatos O, Seres-Sturm M, Mody E, Blazsek V. Data regarding the restorative effects of the partial removal of the liver in advanced stages of toxic cirrhosis. *Morphol Embryol (Bucur)* 1975;21:213-217.
81. Mann FC, Fishback FC, Gay JG, Green GF. Experimental pathology of the liver. V. The effect of cirrhosis on restoration of the liver after partial removal. *Arch Path* 1931;12:792.
82. Solopaev BP, Bobyleva NA. Regeneration of liver with experimental cirrosis after 4 resections. *Biull Eksp Biol Med* 1980;90:483-485.

83. Martynov AI, Kaigorodova NV. Experimental basis of cryogenic and laser destruction of a part of the cirrhotic liver for stimulating regenerative processes. *Vestn Khir Im I Grek* 1979;123:29-33.
84. Kudryavtseva MV, Emelyanov AV, Sakuta GA, Bezborodkina NN, Kudravtsev BN. Glycogen-forming function of hepatocytes in the rat regenerating cirrhotic liver after a partial hepatectomy. *Tissue Cell* 1998;30:261-267.
85. Costa A, Smorlesi L. Il ripristino del fegato e la reversione rapida della cirrosi da CCl₄ dopo asportazione di larga parte del fegato cirrotico. *Arch De Vecchi Anat Path* 1951;16:49.
86. Islami AH, Pack GT, Hubbard JC. Regenerative hyperplasia of the cirrhotic liver following partial hepatectomy. *Cancer* 1958;11:663-686.
87. Solopaev BP, Butnev JP, Kuznecova GG. On the reparative regeneration of the liver with experimentally induced liver cirrhosis. *Biull Eksp Biol Med.* 1961;26:74.
88. Marrano D, Bazzocchi R, Maghetti F. Cirrosi epatica da tetracloruro di carbonio: Possibilita' di reversione a varia distanza dalla epatectomia parziale. *Acta Chir Ital* 1966;3:S8.
89. Olsson R. Partial hepatectomy in experimental carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. A histological and biochemical study in rats. *Acta Chir Scand suppl* 1966;366:3-85.
90. Morsiani E, Cappellari L, Fogli P, Gorini D, Ricci and Mazzoni M. The regeneration of the cirrhotic liver after partial hepatectomy. *Minerva Chir* 1986;41:111-117.
91. Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, Friedman SL. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest.* 2001;108:1369-1378.
92. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J* 1995;309:299-306.
93. Mohammed FF and Khokha R. Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends in Cell Biol* 2005;15:555-563.
94. Spira G, Mawasi N, Paizi M, Anbinder N, Genina O, Alexiev R, Pines M. Halofuginone, a collagen type I inhibitor improves liver regeneration in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2002;37:331-339.
95. Xue F, Takahara T, Yata Y, Kuwabara Y, Shinno E, Nonome K, Minemura M, Takahara S, Li X, Yamato E, Watanabe A. Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy. *Gut* 2003;52:694-700.
96. Li Q, Liu DW, Zhang LM, Zhu B, He YT, Xiao YH. Effects of augmentation of liver regeneration recombinant plasmid on rat hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005;11:2438-2443.

97. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez-Cuenca JA, Trejo-Solís C, López V, Sánchez-Sevilla L, Yáñez L, De Sánchez VC. Adenosine reverses a preestablished CCl₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 2001;34:677-687.
98. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:311-335.
99. Gressner AM. The cell biology of liver fibrogenesis – an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 1998;292:447-452.
100. Tiggelman AMBC, Boers W, Linthorst C, Sala M, Chamuleau RAFM. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblast in culture: evidence for a regulatory role of IL-1b, IL-4, TGF-b and IFN gamma. *J Hepatol* 1995;23:307-317.
101. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:397-416.
102. Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, Weiskirchen R. Inhibitory effect of soluble PDGF-beta receptor in culture-activated hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317:451-462.
103. Casini A, Pinzani M, Milani S, Grappone C, Galli G, Jezequel AM, Schuppan D, Rotella CM, Surrenti C. Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor b1 in human fat-storing cells. *Gastroenterology* 1993;105:245-253.
104. Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999;19:129-140.
105. Rosina F, Alaria P, Castelli S, Dirindin N, Rocca G, Actis GC, Borelli R, Ciancio AL, De Bernardi W, Fornasiero S, Lavezzo B, Lagget M, Martinotti R, Marzano A, Ottobrelli A, Sostegni R, Rizzetto M, Verme G. Effect of patient characteristics on hospital costs for cirrhosis: implications for the disease-related group (DRG) reimbursement system. *Ital J Gastroenterol* 1996; 28:401-405.
106. Kato A, Bamba H, Shinohara M, Yamauchi A, Ota S, Kawamoto C, Yoshida Y. Relationship between expression of cyclin D1 and impaired liver regeneration observed in fibrotic or cirrhotic rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:1198-1205.
- 106A. Chen MF, Hwang TL. The regeneration of cirrhotic liver after partial hepatectomy: a study using the rat carbon tetrachloride-induced cirrhotic model. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 1994;18:71-75.
107. Paronetto F, and Popper C. Chronic liver injury induced by immunologic reactions. Cirrhosis following immunization with heterologous sera. *Am J Pathol* 1966;49:1087-1101.

108. Miyamoto M, Manabe N, Uchio K, Kuramitsu K, Tamura D. Characteristics of lectin staining patterns assessed by a modified sensitive thermo-method in rat livers with heterologous serum-induced fibrosis. *J Vet Med Sci* 1998;60:953-960.
109. Higgins GM, and Anderson RM. Experimental pathology of the liver: the restoration of liver of white rat following surgical removal. *Arch Pathol* 1931;12:186-202.
110. Fukui N. Factors regulating thymidine kinase in regenerating liver. *J Biochem* 1971;69:1074-1082.
111. Burton K. Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods Enzymol* 1968;12:163-165.
112. Fujiwara K, Ogata I, Ohta Y, Hayashi S, Mishiro S, Takatsuki K, Sato Y, Yamada S, Hirata K, Oka H, et al. Decreased collagen accumulation by a prolyl hydroxylase inhibitor in pig serum-induced fibrotic rat liver. *Hepatology* 1988;8:804-807.
113. Rojkind M, González E. An improved method for determining specific radioactivities of proline-¹⁴C and hydroxyproline-¹⁴C in collagen and non-collagenous proteins. *Anal Biochem* 1974;57:1-7.
114. Rojkind M. Inhibition of liver fibrosis by L-azetidine-2-carboxylic acid in rats treated with carbon tetrachloride. *J Clin Invest* 1973;52:2451-2456.
115. Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
116. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Chagoya de Sánchez V. Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Hepatology* 1990;12:242-248.
117. Qin AL, Zhou XQ, Yu H, Xie Q, Zhang W, Guo Q. Effects of growth factors and extracellular matrix on proliferation and differentiation of fetal liver progenitor cell in vitro. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2004;12:406-409.
118. Pérez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. 1983;3:112-120.
119. Perez-Tamayo R, Montfort I, Gonzalez E. Collagenolytic activity in experimental cirrhosis of the liver. *Exp Mol Pathol*. 1987;47:300-308.
120. Michalopoulos GK, DeFrances M: Liver Regeneration. *Adv Biochem Engin Biotechnol* 2005;93:101-134.
121. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, Hubscher S, Roskams T, Pinzani M, Arthur MJ; European Liver Fibrosis Group. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004;127:1704-1713.

122. Tsutsumi M, Takase S, Urashima S, Ueshima Y, Kawahara H, Takada A. Serum markers for hepatic fibrosis in alcoholic liver disease: which is the best marker, type III procollagen, type IV collagen, laminin, tissue inhibitor of metalloproteinase, or prolyl hydroxylase?. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20:1512-1517.
123. Rojkind M, Rojkind MH, Cordero-Hernandez J. In vivo collagen synthesis and deposition in fibrotic and regenerating rat livers. *Coll Relat Res* 1983;3:335-347.
124. Lukivskaya O, Patsenker E, Lis R, Buko VU. Inhibition of inducible nitric oxide synthase activity prevents liver recovery in rat thioacetamide-induced fibrosis reversal. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:317-25.
125. Armendariz-Borunda J, Katai H, Jones CM, Seyer JM, Kang AH, Raghow R. Transforming growth factor beta gene expression is transiently enhanced at a critical stage during liver regeneration after CCl4 treatment. *Lab Invest* 1993;69:283-294.
126. Yamamoto H, Murawaki Y, Kawasaki H. Hepatic collagen synthesis and degradation during liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 1995;21:155-161.
127. Svineng G, Ravuri C, Rikardsen O, Huseby NE, Winberg JO. The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. *Connect Tissue Res* 2008;49:197-202.
128. Langer DA, Das A, Semela D, Kang-Decker N, Hendrickson H, Bronk SF, Katusic ZS, Gores GJ, Shah VH. Nitric oxide promotes caspase-independent hepatic stellate cell apoptosis through the generation of reactive oxygen species. *Hepatology* 2008;47:1983-1993.
129. Zhou X, Hovell CJ, Pawley S, Hutchings MI, Arthur MJ, Iredale JP, Benyon RC. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis. *Liver Int* 2004;24:492-501.
130. Knäuper V, Will H, López-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme *J Biol Chem* 1996;19:17124-17131.
131. Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, Neuhaus P, Gressner AM and Shuppan D. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 1997;150:1647-1659.
132. Crabbe T, O'Connell JP, Smith BJ, Docherty AJ. Reciprocated matrix metalloproteinase activation: a process performed by interstitial collagenase and progelatinase A. *Biochemistry*. 1994;33:14419-14425.

133. Iredale JP, Murphy G, Hembry RM, Friedman SL, and Arthur MJP. Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1): Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest* 1992;90:282-287.
134. Inuzuka S, Uero T, Torimura T, Sata M, Abe H, Tanikawa K. Immunohistochemistry of the hepatic extracellular matrix in acute viral hepatitis. *Hepatology* 1990;12:249-256.
135. Budny T, Palmes D, Stratmann U, Minin E, Herbst H, Spiegel HU. Morphologic features in the regenerating liver--a comparative intravital, lightmicroscopical and ultrastructural analysis with focus on hepatic stellate cells. *Virchows Arch* 2007;451:781-791.
136. Okazaki, I., Watanabe, T., Hozawa, S., Niioka, M., Arai, M., Maruyama, K. Reversibility of hepatic fibrosis: From the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy to recovery. *Keio Journal of Medicine* 2001;50:58-65.
137. Rynnyak, V.V., Gudumak, V.S., Onya, E.S. Electron-histochemical localization of liver collagenase. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 1996;121:90-91.
138. Roderfeld M, Hemmann S, Roeb E. Mechanisms of Fibrolysis in Chronic Liver Injury with Special Emphasis on MMPs and TIMPs. *Z Gastroenterol* 2007;45:25-33.
139. Asai K, Tamakawa S, Yamamoto M, Yoshie M, Tokusashi Y, Yaginuma Y, Kasai S, Ogawa K. Activated hepatic stellate cells overexpress p75NTR after partial hepatectomy and undergo apoptosis on nerve growth factor stimulation. *Liver Int* 2006;26:595-603.
140. Ozawa S, Uchiyama K, Nakamori M, Ueda K, Iwahashi M, Ueno H, Muragaki Y, Ooshima A, Yamaue H. Combination gene therapy of HGF and truncated type II TGF-beta receptor for rat liver cirrhosis after partial hepatectomy *Surgery* 2006;139:563-573.
141. Murata S, Hashimoto I, Nakano Y, Myronovych A, Watanabe M, Ohkohchi N. Single administration of thrombopoietin prevents progression of liver fibrosis and promotes liver regeneration after partial hepatectomy in cirrhotic rats. *Ann Surg* 2008;248:821-828.
142. Ohayon O, Mawasi N, Pevzner A, Tryvitz A, Gildor T, Pines M, Rojkind M, Paizi M, Spira G. Halofuginone upregulates the expression of heparanase in thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Lab Invest* 2008;88:627-633.

XIII. PERSPECTIVAS

Los resultados del presente trabajo contribuyen al mejor entendimiento de la remodelación de la MEC fibrótica ante un estímulo regenerativo. Sin embargo, las características cualitativas de la MEC o su influencia en el equilibrio tisular del hígado no se conocen bien.

El estímulo fibrogénico “no fibrosante”, como resultado del equilibrio particular entre la síntesis y la degradación matricial, merece su estudio a través de otras estrategias de estimulación hepática, tanto en el hígado fibrótico como en el cirrótico. Esto permitiría establecer la participación de la función mitocondrial, el equilibrio de MMPs / TIMPs, las citocinas reguladoras y las principales poblaciones celulares implicadas, así como su interacción, en la remodelación de la MEC fibrótica y cirrótica. Aunado al estudio de la regeneración hepática, dichos elementos de estudio encontrarían una aplicación potencial en procesos como la progresión fibrótica secundaria a daño hepático crónico, la carcinogénesis - metástasis hepáticas y la lesión por isquemia-reperfusión en el trasplante de hígado.

XIV. ARTÍCULO

Partial Hepatectomy–Induced Regeneration Accelerates Reversion of Liver Fibrosis Involving Participation of Hepatic Stellate Cells

JUAN A. SUÁREZ-CUENCA,* VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ,* ALBERTO ARANDA-FRAUSTRO,†
LOURDES SÁNCHEZ-SEVILLA,* LIDIA MARTÍNEZ-PÉREZ,* AND ROLANDO HERNÁNDEZ-MUÑOZ**¹
**Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico 04510, D.F., Mexico; and †Departamento de Patología, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez,” Mexico 14080, D.F., Mexico*

Hepatic fibrosis underlies most types of chronic liver diseases and is characterized by excessive deposition of extracellular matrix (ECM), altered liver architecture, and impaired hepatocyte proliferation; however, the fibrotic liver can still regenerate after partial hepatectomy (PH). Therefore, the present study was aimed at addressing whether a PH-induced regeneration normalizes ECM turnover and the possible involvement of hepatic stellate cells (HSC) during resolution of a pre-established fibrosis. Male Wistar rats were rendered fibrotic by intraperitoneal administration of swine serum for 9 weeks and subjected afterwards to 70% PH or sham-operation. Histological and morphometric analyses were performed, and parameters indicative of cell proliferation, collagen synthesis and degradation, and activation of HSC were determined. Liver collagen content was reduced to 75% after PH in cirrhotic rats when compared with sham-operated cirrhotic rats. The regenerating fibrotic liver oxidized actively free proline and had diminished transcripts for α -1(I) collagen mRNA, resulting in decreased collagen synthesis. PH also increased collagenase activity, accounted for by higher amounts of pro-MMP-9, MMP-2, and MMP-13, which largely coincided with a lower expression of TIMP-1 and TIMP-2. Therefore, an early decreased collagen synthesis, mild ECM degradation, and active liver regeneration were followed by higher collagenolysis and limited deposition of ECM, probably associated with increased mitochondrial activity. Activated HSC readily increased during liver fibrosis and remained activated after liver regeneration, even during fibrosis resolution. In conclusion, stimulation of liver regeneration

through PH restores the balance in ECM synthesis/degradation, leading to ECM remodeling and to an almost complete resolution of liver fibrosis. As a response to the regenerative stimulus, activated HSC seem to play a controlling role on ECM remodeling during experimental cirrhosis in rats. Therefore, pharmacological approaches for the resolution of liver fibrosis by blocking HSC activation should also evaluate possible effects on liver cell proliferation. *Exp Biol Med* 233:827–839, 2008

Key words: Experimental cirrhosis; partial hepatectomy; collagen metabolism; liver mitochondria; MMPs; TIMPs; hepatic stellate cells

Introduction

Remodeling of hepatic extracellular matrix (ECM) plays a key role in processes such as angiogenesis, inflammation, and regeneration, among others (1), through modulating important cellular functions (2, 3). Fibrous components interact with liver cells, matrix metalloproteinases (MMPs), cytokines, and growth factors, thereby maintaining a homeostatic state (“hepatic ecosystem”) and preserving the liver’s morphology and function (4). Such an equilibrium requires specific liver responses against challenging stimuli that normally lead to cell proliferation and tissue healing (5). However, inadequate responses may occur during chronic damage, resulting in an excessive ECM deposit and formation of a fibrous scar (6, 7), even progressing to advanced fibrosis (cirrhosis) and increasing the risk for hepatocellular carcinoma (8, 9).

Accumulation of ECM proteins is a reversible dynamic process (10), since turnover of ECM components depends on a regulated balance between matrix-degrading enzymes, mainly metalloproteinases (MMPs), and their specific inhibitors (TIMPs). Therefore, hepatic fibrosis frequently results from deficient collagen removal by MMPs (11) and TIMPs overexpression (12). In contrast, fibrosis resolution

¹ To whom correspondence should be addressed at Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 70-243, México 04510, D.F., México. E-mail: rhermand@ifc.unam.mx

Received September 16, 2007.
Accepted February 8, 2008.

DOI: 10.3181/0709-RM-247
1535-3702/08/2337-0827\$15.00
Copyright © 2008 by the Society for Experimental Biology and Medicine

will depend mainly on increased collagen breakdown and diminished TIMP activities (13).

It is accepted that either fibrotic or cirrhotic livers maintain the ability to regenerate after partial hepatectomy (PH) (14), as well as to modify ECM components (15); however, there are conflicting data regarding the ability of the liver to regenerate after PH in animals and humans with cirrhosis. In carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats and subjected to PH, DNA synthesis and mitotic activity of hepatocytes are decreased (16), showing that the regenerative capacity of the liver after PH is impaired in these animals (17). In fact, it has been reported that liver tissue regenerated after PH in carbon tetrachloride-induced cirrhotic liver is also cirrhotic, despite that slight decreases have been found in tissue collagens and proteoglycans (15). During thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats, PH promotes functional restoration of the liver without improving morphological alterations (18), although it has been reported that aspirin and enoxaparin seem to stimulate liver regeneration (19). Similarly, rats rendered cirrhotic by chronic dimethylnitrosamine administration depict severe cirrhosis with poor regenerative response after PH. Nonetheless, the combination of HGF and TbetaTR gene therapy, as well as VEGF therapy, might increase the capacity of hepatectomy to improve fibrosis, hepatic function, and hepatocyte regeneration in these animals (20, 21).

Hence, the structural differences in the regenerated tissues between normal and cirrhotic livers could also indicate different regeneration capacities, which opens the question as to whether an effective regenerative stimulus is capable of ECM remodeling in the cirrhotic liver, since modifications of ECM constituents might regulate fibrogenesis and proliferation of the fibrotic liver (12, 22–25).

The presence of α -smooth muscle actin (α -SMA) positive cells in the fibrotic liver suggests phenotypic modulation in hepatic stellate cells (HSC) and their differentiation towards myofibroblast-like cells. Indeed, the expression of α -SMA may be related to events of the fibrotic process, such as tissue contraction or fibrogenesis *per se* (26). HSC could play a key role in normal ECM deposition during liver regeneration, as well as in promoting fibrosis (27), since a transient activation of HSC occurs during liver regeneration. Moreover, a decreased number of activated HSCs has been considered a condition for fibrosis resolution (28).

The aim of the present study was to evaluate ECM turnover and the role of activated HSC during ECM remodeling in the regenerating fibrotic rat liver. For this, we selected a swine serum-induced liver fibrosis, which resembles human posthepatitis fibrosis (29), accompanied by ECM remodeling and cell proliferative events (30). In fact, this experimental model of very low spontaneous reversibility of liver fibrosis reveals clearly an effective regenerative response after PH. Moreover, the minimal parenchyma necrosis and/or liver functional impairment, even after PH, found in the present model represents some

advantages over other animal models of liver fibrosis, such as those of alcohol- and thioacetamide-induced liver cirrhosis (4, 19, 31), where lower regenerative ability after PH has been reported.

Material and Methods

Materials. [3 H-Methyl]-deoxythymidine (specific activity 2.0 Ci/mmol) and L-[14 C]-proline (specific activity 275 mCi/mmol) were purchased from NEN (Boston, MA). 32 P-Collagen α -1(I) was kindly provided by Dr. Francisco Villarreal (University of California, San Diego, CA).

Animals and Treatments. Male Wistar rats, with an initial weight of 100–120 g, had free access to lab chow and water in a 12:12-hr light:dark cycle. Swine serum was injected intraperitoneally (ip) following a slightly modified method (29, 32). Briefly, rats were injected with fresh swine serum (3.5 ml/kg body wt) that had been heat-treated and sterilized by filtration (Millipore Corp., Bedford, MA), achieving a total protein amount of 58 mg/ml (29), twice weekly for 9 weeks, and control animals (saline solution) were done in parallel. Thereafter, control (healthy) and cirrhotic animals were subjected to 70% PH, according to Higgins and Anderson (33), or to a sham operation (laparotomy only). Animals were fasted overnight and killed with sodium pentobarbital overdosing at different times after surgery, following the Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (Ministry of Agriculture, SAGARPA, Mexico).

Fibrosis Score and Morphometric Analysis.

Thin sections of paraffin-embedded liver tissue were stained with Masson's trichrome stain, and a fibrosis score was evaluated under light microscopy (34). A morphometric analysis was done by digitalizing and analyzing 50–40 \times power fields, calculating stromal and parenchymal areas, as well as the stromal/parenchymal index (Image Pro 5.0; Media Cybernetics, Bethesda, MD).

Parameters Indicative of Liver Regeneration.

The rate of liver regeneration was estimated through several approaches: gain of liver mass after PH, determination of thymidine kinase (TK; EC 2.7.1.2) activity in the cytosolic fraction, and estimation of the mitotic index with an optical microscope (Olympus, CH-30; Tokyo, Japan), taking into account the number of mitotic cells present in 10 microscopic fields (40 \times objective). These determinations have been described previously in detail (35).

Collagen Content and Its Turnover.

Total liver collagen was extracted and determined by its content of hydroxyproline, as described by Rojkind and González (36). In addition, collagen content was estimated in liver homogenates by Western blot analysis with specific rabbit anti-rat collagen type I polyclonal antibody (Chemicon, La Jolla, CA) diluted at 1:500, and normalized with β -actin, as described below in detail. The free proline pool was determined in perchloric acid-extracts, as previously described (37). Liver proline oxidation and its incorporation

into collagenous proteins (collagen synthesis) were determined *in vitro*, as described in detail elsewhere; briefly, they consisted in incubating 2 g of liver slices (0.5 mm thickness) in the presence of 0.4 mM proline, containing 2 μ Ci of L-(U-¹⁴C) proline with a specific activity of 275 mCi/mmol (35, 37). Collagen synthesis was also assessed by expression of mRNA for α -1 (I) collagen. Total RNA was extracted from rat liver according to the method of Chomczynski and Sacchi (38), and RNA samples were electrophoresed and transferred to nitrocellulose filters and then hybridized with the ³²P-collagen α -1 (I) probe, as described by Villarreal and Dillmann (39). After film exposure, bands obtained were quantified by image densitometry. A probe for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase was used for normalization purposes. Total collagenolytic activity towards endogenous substrates was determined, as previously described, and expressed as nmol of degraded collagen \cdot hr⁻¹ \cdot mg⁻¹ of liver protein (30, 37); the ratio of collagenase/collagen was calculated also to provide a more reliable picture of collagenase activity under pathologic conditions (30). Additionally, gelatinolytic activity was evaluated by gel zymography, as described by Knittel *et al.* (40). Briefly, 20 μ g of liver protein were mixed with Zymogram Sample Buffer (Bio-Rad, Mexico City, Mexico) and analyzed by 8.5% SDS-PAGE Laemmli gel containing 1 mg/ml gelatin, using standards (Chemicon). Afterwards, gels were stained overnight with Coomassie blue and quantified through image densitometry.

Western Blot Analysis for MMPs/TIMPs. Liver protein levels of MMP13 and of TIMPs (-1 and -2) were analyzed through Western blot assay, essentially as previously described (35). Around 15–40 μ g of liver homogenates were separated in 10% and 15% gels by SDS-PAGE (41). The primary antibodies used were mouse anti-rat MMP-13 monoclonal antibody diluted at 1:300, mouse anti-human TIMP-1 monoclonal antibody diluted at 1:300, and mouse anti-TIMP-2 monoclonal antibody diluted at 1 μ g/ml (all from Chemicon). Mouse anti- β -actin monoclonal antibody (Sigma [St. Louis, MO], diluted at 4 μ g/ml) was additionally tested for normalization. Densitometric analysis was performed using the Collage 2.0 Program in an image photoanalyzer (Fotodyne Inc., foto/Eclipse, New Berlin, WI).

Immunohistochemical Analysis of α -SMA and Electron Microscopy. Deparaffinized and rehydrated (xylol-ethanol) liver samples were subjected to antigen retrieval as previously described (35) and sequentially incubated with peroxidase-blocking solution, monoclonal mouse anti-human α 1(I) smooth muscle actin (DAKO) by ECM remodeling and cell proliferative events (30). In fact, this experimental model of very low spontaneous reversibility of liver fibrosis reveals clearly an effective regenerative response after PH. Moreover, the minimal parenchyma necrosis and/or liver functional impairment, even after PH, found in the present model represents some

cells. Electron microscopy to search for activated HSC was performed following standard procedures.

Statistics. All results are expressed as mean \pm SE and the significance of the differences and their interactions was tested by two-way ANOVA and *post-hoc* Newman's test. Statistical significance is indicated as (*) against time zero, or (**) against the sham control group, throughout this study.

Results

Liver Collagen Content and Morphometric Analysis at the Onset of Fibrosis. Rat liver fibrosis was achieved after 9 weeks of swine serum administration, represented mainly by thin septa linking vascular structures and dividing the whole hepatic parenchyma (Fig. 1A, right). The morphometric analysis revealed increased liver stromal area (Table 1). Accordingly, collagen content was 4-fold enhanced (Fig. 2A), largely coinciding with the detected levels of immunoreactive collagen type I protein (Fig. 2B).

Regeneration of the Fibrotic Liver After PH. Fibrotic livers recovered up to 80% of the original mass within 30 days after PH, when compared with nonfibrotic PH controls (Fig. 3, left). Additionally, liver DNA synthesis (TK activity) was augmented by the 70% PH in both control and liver fibrosis rats, peaking at 24 hrs after surgery (Fig. 3, right top); whereas TK activity remained enhanced up to Day 3 post-PH in controls, cirrhotic animals showed a smaller amount of enzyme activity. Mitotic index was similarly enhanced in both experimental groups, but it was always lower in the fibrotic liver (Fig. 3, right bottom).

Modifications of Deposited ECM During PH-Induced Regeneration of Fibrotic Liver. Sham-operated animals showed a very slow and slight reversibility of fibrosis (Fig. 1B, micrographs 1–4), achieving only 20% reduction of the calculated stroma/parenchyma index (30 days postsurgery; Table 1), and 80% of these animals remained in Grade 4 of fibrosis (abundant septa; Table 2). On the contrary, the 70%-PH-fibrotic rats had a significant reduction in liver fibrosis (Fig. 1B, micrographs 5–8), with a 50% and 75% reduction of the fibrotic stroma (7 and 30 days post-PH; Table 1), and 60% of these animals were classified in Grade 2, and none in Grade 4 (Table 2). This PH-induced reduction of the stroma/parenchyma index was mainly attributed to changes in stromal area rather than to those occurring in the parenchyma (Table 1), since in the 70%-PH-fibrotic animals significantly decreased (over 70%) liver collagen content was found (Fig. 2A). In sham-operated fibrotic rats, liver collagen content did not significantly diminish even after 30 days of recovery. The homogenates by Western blot analysis with specific rabbit anti-rat collagen type I polyclonal antibody (Chemicon, La Jolla, CA) diluted at 1:500, and normalized with β -actin, as described below in detail. The free proline pool was determined in perchloric acid-extracts, as previously described (37). Liver proline oxidation and its incorporation

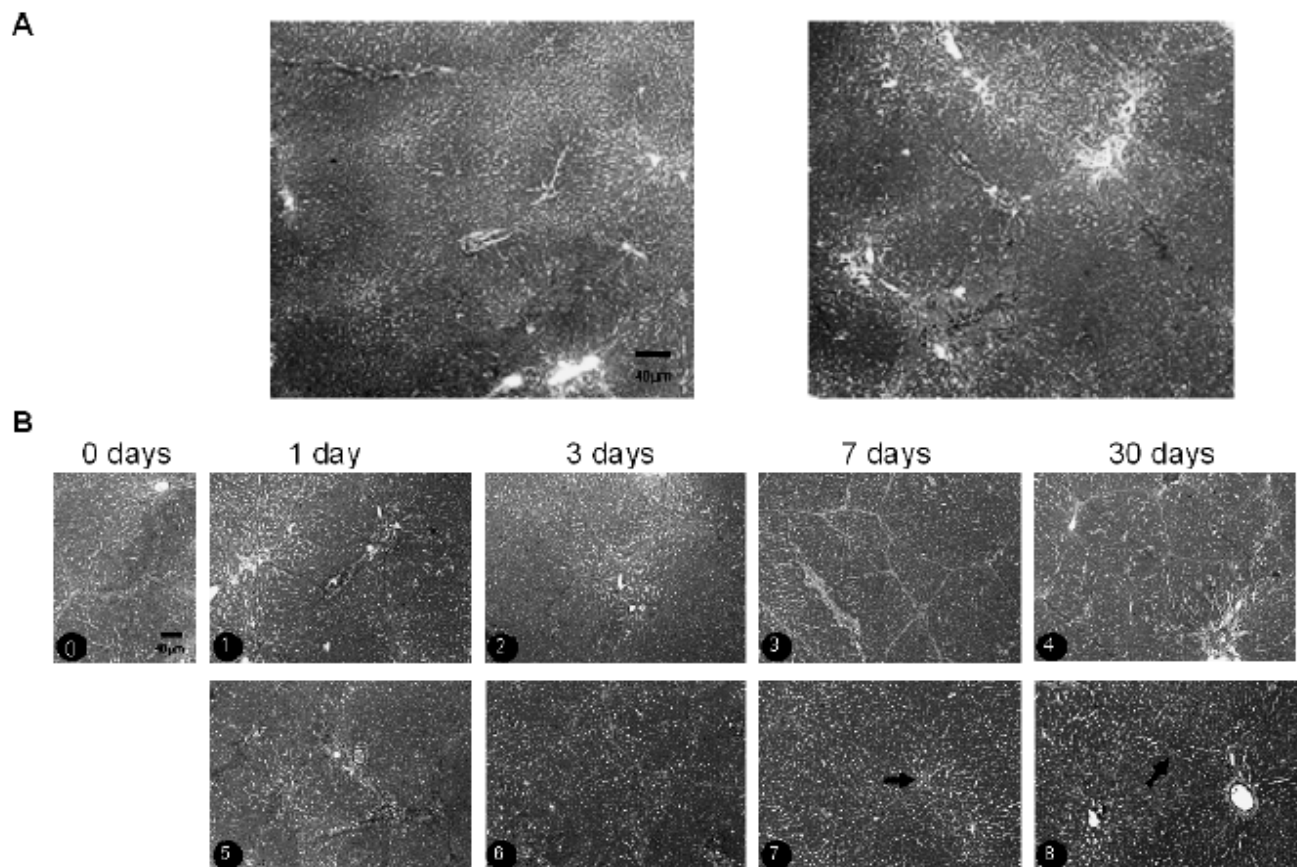


Figure 1. Histological changes of the fibrotic liver after PH. (A) Light microscopy. 2.5 \times power field images of tissue sections stained with Masson's trichrome, from rat liver non-fibrotic control (left) injected with saline solution, and fibrotic control (right) treated with swine serum. (B) 10 \times power field images from rat fibrotic liver collected at time zero (image 0) and after 1, 3, 7, and 30 days from either sham-operated controls (images 1–4, respectively) or 70% PH (images 5–8, respectively). Arrows indicate scanty fibrotic tissue remaining after 7 and 30 days post-PH.

Table 1. Image Analysis of Liver Tissue after 70% PH^a

Time from 70% PH	Nonfibrotic liver			Fibrotic liver		
	Stromal area	Parenchymal area	Stroma/Parenchyma Index ^b	Stromal area	Parenchymal area	Stroma/Parenchyma Index ^b
–PH						
0 days	0.3 \pm 0.03	29 \pm 0.2	0.10 \pm 0.006	5.0 \pm 0.25	24 \pm 0.3	2.03 \pm 0.15
1 day	0.3 \pm 0.02	29 \pm 0.2	0.10 \pm 0.010	5.1 \pm 0.29	25 \pm 0.3	2.06 \pm 0.14
3 days	0.3 \pm 0.02	29 \pm 0.1	0.09 \pm 0.008	4.9 \pm 0.29	24 \pm 0.2	2.09 \pm 0.14
7 days	0.3 \pm 0.01	29 \pm 0.1	0.09 \pm 0.005	4.4 \pm 0.24	24 \pm 0.3	1.83 \pm 0.11
30 days	0.3 \pm 0.02	28 \pm 0.2	0.10 \pm 0.009	3.9 \pm 0.41*	25 \pm 0.4	1.59 \pm 0.19*
+PH						
0 days	0.3 \pm 0.02	29 \pm 0.2	0.10 \pm 0.007	4.9 \pm 0.22	25 \pm 0.3	2.06 \pm 0.11
1 day	0.1 \pm 0.02*/**	28 \pm 0.3*/**	0.05 \pm 0.006*/**	4.8 \pm 0.23	23 \pm 0.4**	2.04 \pm 0.12
3 days	0.1 \pm 0.01*/**	28 \pm 0.3**	0.05 \pm 0.005*/**	4.7 \pm 0.33	24 \pm 0.5	1.95 \pm 0.16
7 days	0.2 \pm 0.02	28 \pm 0.2*/**	0.09 \pm 0.006	2.3 \pm 0.3*/**	26 \pm 0.5*/**	0.90 \pm 0.12*/**
30 days	0.2 \pm 0.01	28 \pm 0.1*/**	0.09 \pm 0.004	1.2 \pm 0.1*/**	27 \pm 0.3*/**	0.47 \pm 0.04*/**

^a Results are expressed as mean \pm SE of 4 animals per group, analyzed as fifty 40 \times power fields per animal. Statistically significant against time zero (*), and against his control of group (**). –PH = without partial hepatectomy, +PH = with partial hepatectomy.

^b The stroma/parenchyma index = (stromal area/parenchymal area) \times 10¹.

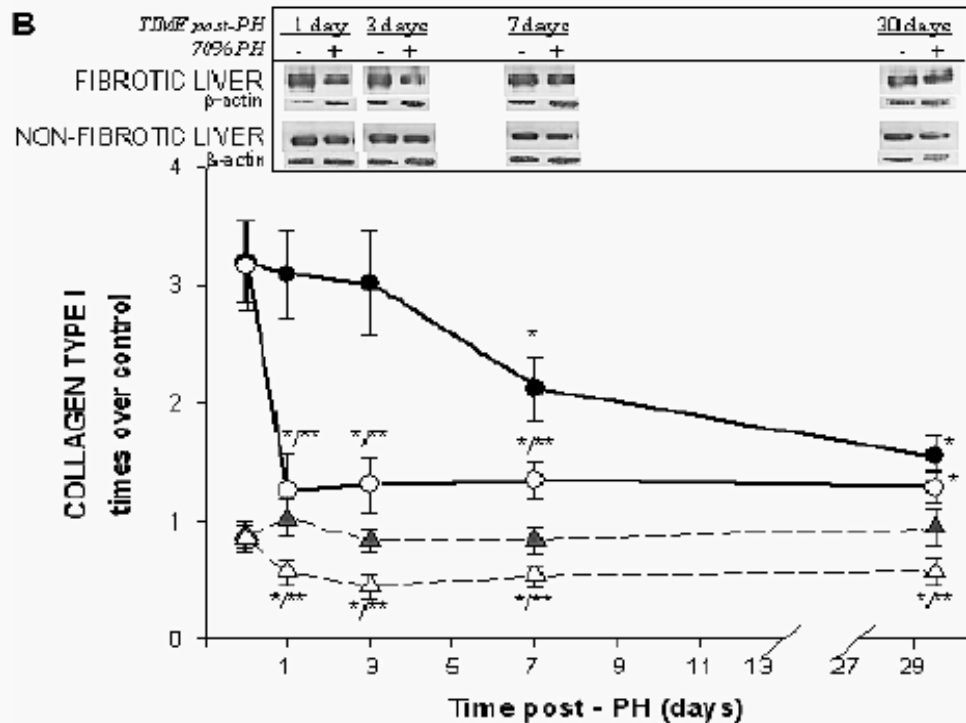
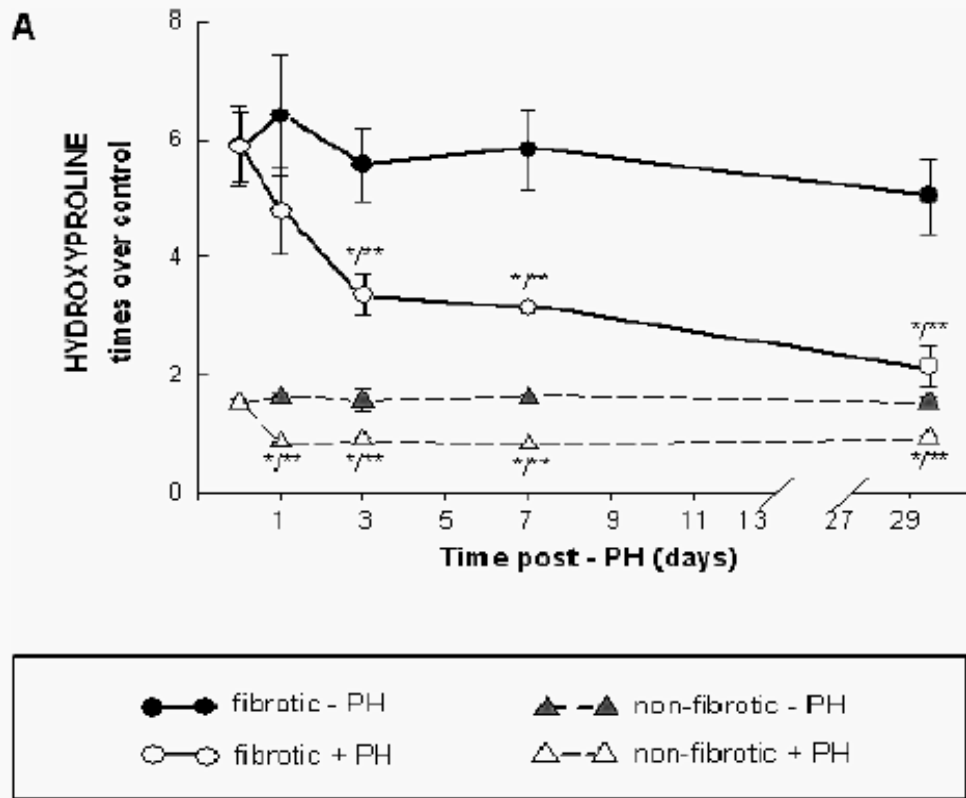


Figure 2. Total collagen reduction in the fibrotic liver after PH. Results are the mean \pm SE of at least five independent observations per experimental group, and are expressed as times over control for panel A, hydroxyproline content ($1.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of liver), and in panel B, Western blot for collagen type I (15,500 arbitrary units, controls). β -Actin was used to normalize final results. Statistical significance: *, $P < 0.025$ against respective time zero control, and **, $P < 0.025$ versus sham-operated controls, at each time point.

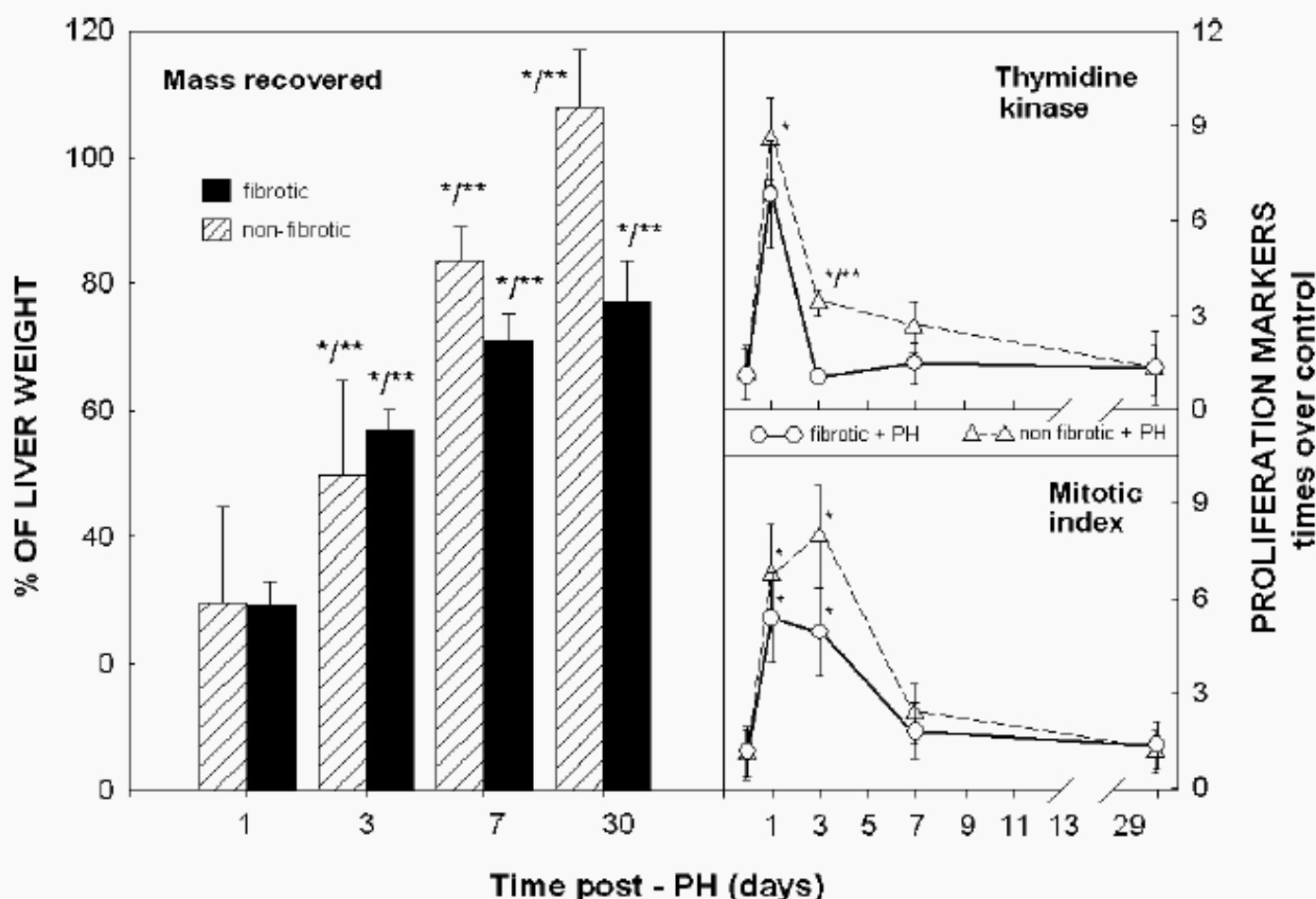


Figure 3. PH-induced cell regeneration in the fibrotic liver. Results are expressed as mean \pm SE for percent of recovery of hepatic mass after PH (left panel), and as times over controls (right panel) for TK activity (top), and mitotic index (bottom). Estimations were performed in fibrotic and non-fibrotic controls after PH. Control values: TK activity, 0.18 ± 0.07 nmols of formed $[^3\text{H}]\text{-TMP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of cytosolic protein; mitotic index of 0.4 ± 0.1 mitotic figures per field in fifty $40\times$ -power fields. Statistical significance as in Figure 2.

precursor) that correlated with a diminished rate of proline oxidation (Fig. 4A, right). The fibrotic liver also presented an augmented free proline pool (Fig. 4, left), probably due to its decreased oxidation, which was more evident after stopping swine serum administration; PH also enhanced proline availability even though liver proline oxidation was

largely stimulated by PH (Fig. 4, left). Expression of mRNA for α -1 (I) collagen showed a rapid decrease early after discontinuation of swine serum administration (Fig. 4B), but the 70% PH accelerated the reduction of α -1 (I) collagen mRNA transcripts; however, an unexpected increase in expression of α -1 (I) collagen was noted at 30 days post-PH.

Table 2. Histological Assessment of Hepatic Fibrosis^a

Fibrotic score ^b	Fibrotic -PH				Fibrotic +PH			
	1 day	3 days	7 days	30 days	1 day	3 days	7 days	30 days
Grade 1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5 (20)
Grade 2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5 (60)
Grade 3	0/5	0/5	0/5	1/5 (20)	0/5	0/5	2/5 (40)	1/5 (20)
Grade 4	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	4/5 (80)	5/5 (100)	5/5 (100)	3/5 (60)	0/5
	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++ / +++	-

^a Includes frequency of distribution of animals n (%) according to fibrosis score number and evaluation of septa thickness expressed as "+".
^b Fibrotic score (24): Grade 0: no fibrosis. Grade 1: short collagenous septa extended from central veins. Grade 2: slender septa link the central veins, but lobular architecture is preserved. Grade 3: pseudolobuli are formed by thin septa. Grade 4: parenchyma is subdivided into smaller pseudolobuli by thin septa.

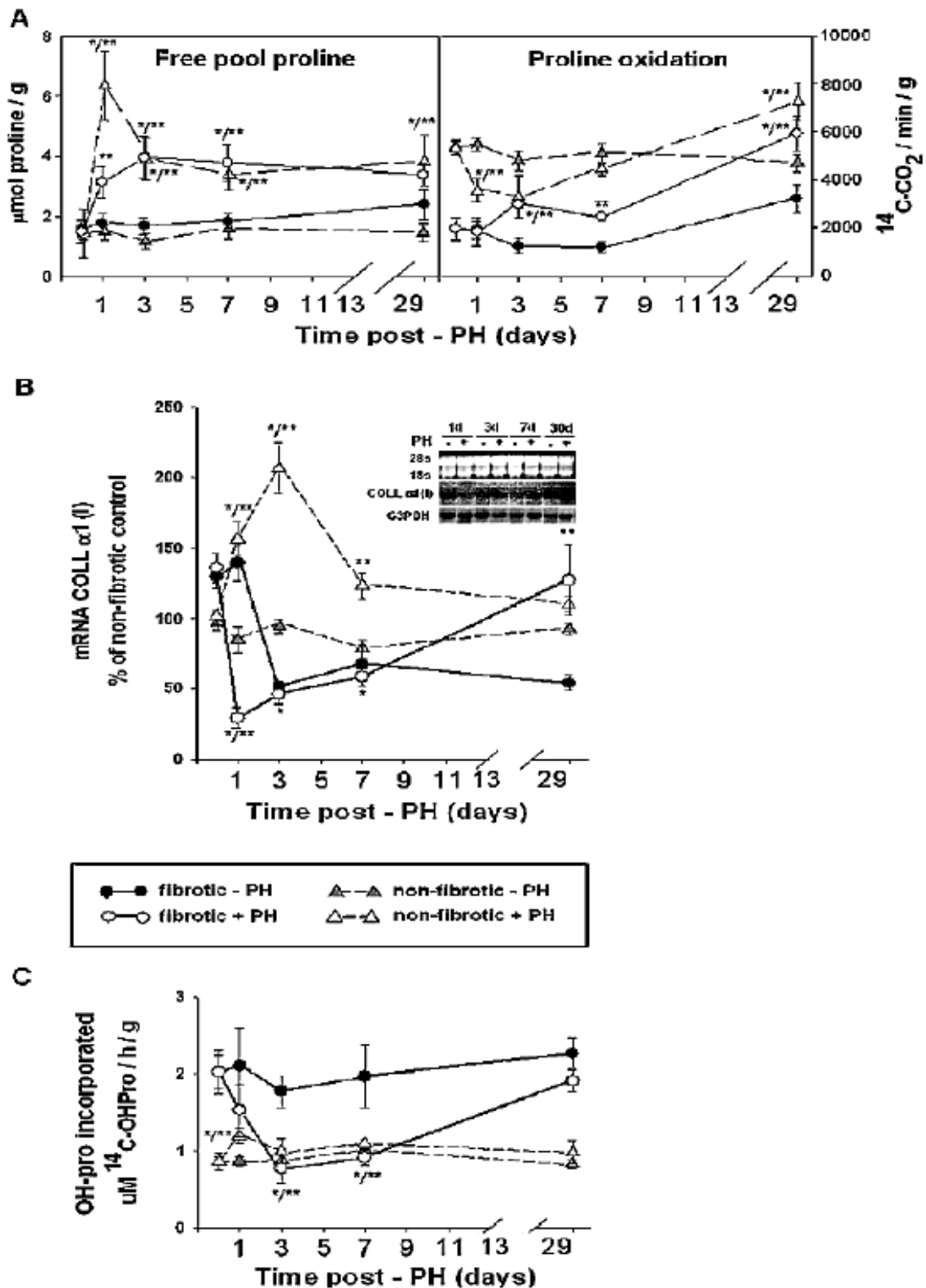


Figure 4. Proline metabolism and rate of collagen synthesis in the regenerating fibrotic liver. Results are expressed as mean \pm SE for $n = 5$ animals per experimental group, for panel A, free proline pool (left panel) and its rate of oxidation (right panel). In panel B, expression of mRNA for type I collagen (COLL α -1(I)) determined by Northern blot assay. Here, mRNA for G3PDH was used as standard to normalize the final results, shown as percentage of the non-fibrotic sham control, here considered as 100%. Gel electrophoresis of RNA samples, and bands obtained after probe hybridization in fibrotic livers, either sham or 70% PH, are provided. mRNA from G3PDH was used as standard to normalize the final results, panel C, incorporation of ^{14}C -proline into ^{14}C -hydroxyproline to collagen (synthesis) by liver slices. Symbols for experimental groups, as indicated at the top of panel C. Statistical significance as in Figure 2. OH-pro, hydroxyproline.

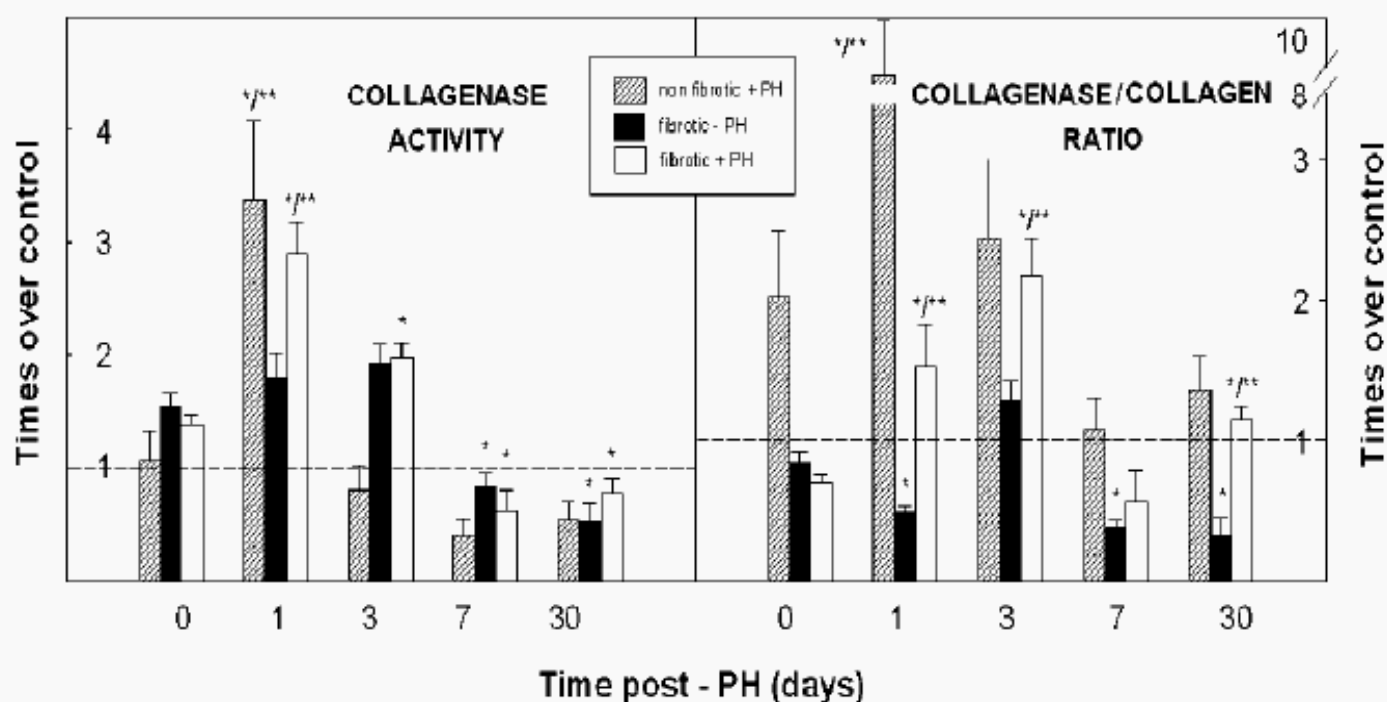


Figure 5. Total collagenase activity during regeneration of the fibrotic liver. Results are the mean \pm SE of 5 independent observations per experimental group, and are expressed as times over controls for collagenase activity (left panel, 0.25 ± 0.03 nmols of degraded collagen \cdot h $^{-1}$ \cdot mg $^{-1}$ of protein, in controls), and for a calculated collagenase/collagen ratio (right panel, 0.05 ± 0.01 , in controls). Symbols at the top and statistical significance are as indicated in Figure 2.

Although reduced transcription of α -1 (I) collagen mRNA was found after sham-operation in fibrotic animals (Fig. 4B), they still had increased collagen synthesis, as indicated by the sustained enhancement of proline incorporation into collagen (Fig. 4C). The 70% PH decreased liver collagen synthesis in cirrhotic rats, but it increased thereafter (30 days), similarly to control fibrotic rats (Fig. 4C), which also coincided with increased collagen type I gene transcription (Fig. 4B).

ECM Degradation Increases During PH-Induced Regeneration of the Fibrotic Liver. At the onset of liver fibrosis, total liver collagenase activity remained without significant modification, but expression of MMP-13, TIMP-1, and TIMP-2 were increased. Early after PH, total liver collagenase activity was increased in fibrotic animals (Fig. 5, left), and the collagenolytic activity (collagenase/collagen ratio) was increased from 0.04 to 0.07 (Fig. 5, right). Stimulated collagenase activity was associated to a persistent increase in the levels of gelatinases, mainly pro-MMP-9 and MMP-2, and lower expression of both TIMPs, as well as accompanied by an unexpected transient fall in MMP-13 expression (Fig. 6). Similar patterns of collagenase activity, gelatinases, MMP-13, and TIMPs were found after 70% PH. Total collagenase activity in sham-operated fibrotic controls continuously decreased after 3 days postsurgery (Fig. 5, left), while expression of MMP-13 and TIMPs was gradually normalized (7 to 30 days post-PH; Fig. 6).

Activated HSC Are Maintained Along PH-

Induced Regeneration of Fibrotic Liver. The amount of α -SMA-expressing cells, presumably activated HSC, was assessed by immunohistochemistry and morphometric analysis (Fig. 7). In the fibrotic liver, activated HSC were mainly distributed in the perivascular area and inside the fibrotic septa (Fig. 7, images A, a). After 3 days of swine serum discontinuation, the control fibrotic group showed a rapid reduction in α -SMA expression, despite the persistence of the fibrotic septa (Fig. 7C, c and Fig. 7D, d). Conversely, there was a sustained expression of α -SMA by activated HSC in the regenerating fibrotic liver, distributed inside the reduced fibrotic septa 7 days after PH (Fig. 7 F, f to H, h), similarly to the findings in healthy animals (data not shown). At Day 30, both control and the regenerating fibrotic liver showed minimal HSC expression (Fig. 7E, e and I, i). Additionally, electron microscopy images from representative fibrotic liver sections after swine serum discontinuation, depicted a high amount of ECM production at the area of interest of fibrous septa, characteristic of activated HSC (Fig. 7, images 1–3).

Discussion

Attaining cirrhosis reversion or resolution through controlling fibrosis progression remains a main goal in the field of hepatogastroenterology. Hence, the present study is an attempt to assess whether the PH-induced regenerative response of the fibrotic liver is able to restore the liver's ECM to normal characteristics, reestablishing the balance between ECM synthesis and degradation, as well as to

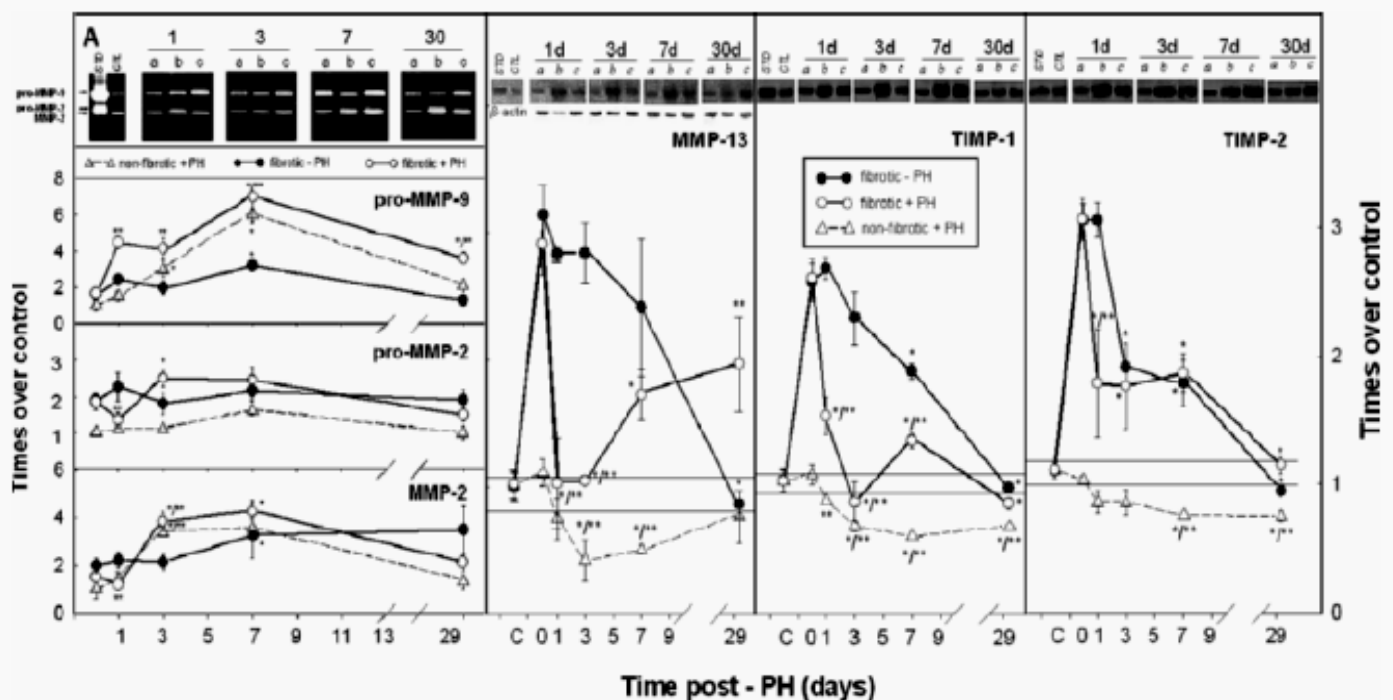


Figure 6. Gelatinase activities, MMP-13, and TIMP protein amount in the fibrotic liver during regeneration. Results are expressed as mean \pm SE of times over the control values ($n = 5$ animals per experimental group), for gel zymography from a time-course of 1, 3, 7, and 30 days after PH (panel A) in (a) non-fibrotic with PH, (b) fibrotic sham, and (c) fibrotic PH animals. CTL = nonfibrotic sham-operated control. Below, densitometric analysis of activity bands corresponding to pro-MMP-9, pro-MMP-2, and MMP-2 in fibrotic sham-operated (\bullet — \bullet) and PH-operated animals (\circ — \circ), as well as in controls subjected to PH (Δ — Δ); STD = zymography standard. Western blot analysis for MMP-13, TIMP-1, and TIMP-2 protein expression for the same time course (right panels). STD = positive control, and CTL = nonfibrotic sham control. Densitometric analysis and normalization by β -actin were carried out. Control range as indicated by the horizontal bar. Statistical significance as noted in Figure 2.

explore a putative role of HSC in modulating these processes. For this purpose, a swine serum-induced experimental liver fibrosis was chosen as a suitable model for studying liver regeneration and ECM modifications, since it is characterized by scanty parenchyma necrosis and very slow fibrosis reversibility (14). In this model, PH readily induced a regenerative response in a similar fashion to what occurs in the regenerating normal liver (Fig. 3). Thus, this fibrotic liver preserves an adequate regenerative potential, probably due to the absence of cell necrosis and conserved liver function.

Associated to the aforementioned, there were significant ECM modifications (Fig. 2A and B) that progressively led to an almost complete resolution of the liver fibrosis after PH, which did not occur in sham-operated fibrotic rats, at least during the time period evaluated here. Although the mechanisms underlying reduction of deposited ECM in the proliferating liver are unknown, an increased liver cells/ECM ratio due to enhancement of hepatocyte mass, without concomitant increase of ECM, could occur in the normal liver (3). This was not the case with the present results, since the morphometric analysis and the normalization of our results by proliferative markers and the hepatocyte area determined in imaging analysis revealed an actual reduction of fibrosis that agreed with the actual diminution of the total collagen amount in PH-subjected fibrotic rats (Figs. 1 and 3, Tables 1 and 2). This argues against a reduction of fibrotic

stroma exclusively due to a "diluting" effect exerted by parenchymal proliferation. Then, the PH-induced decrease in ECM comprised the whole remnant organ, rather to be localized in "areas of regeneration."

Having demonstrated that PH elicited a resolution of a swine serum-induced liver fibrosis, the question arises concerning the mechanism(s) involved in ECM remodeling. Liver regeneration affects ECM through mechanisms that include increased collagen synthesis, activation of urokinase, plasmin, and MMPs (42, 43). Mitochondrial oxidation of proline was restored in the fibrotic livers, which agrees with the proposed involvement of mitochondrial function and NAD/NADH redox state in regulating collagen synthesis and breakdown in the cirrhotic rat liver (35, 44), indicating that mitochondrial function is still preserved in the cirrhotic animals and is susceptible to stimulation by PH, as occurs in the normal rat liver (45). In addition, the 70% PH stimulated collagen breakdown, as indicated by the increased total collagenase activity and by the relative collagenolytic activity (collagenase/collagen ratio; Fig. 5). In this context, it is well documented that MMP/TIMP balance is a determinant for ECM turnover and collagen deposition (41). Increased expression of MMPs and TIMPs at the onset of liver fibrosis can play a major role in the dynamic ECM remodeling, and their imbalance would result in excessive ECM deposition (Fig. 6), similar to that found in other fibrotic models (46). Indeed, there is a large body of

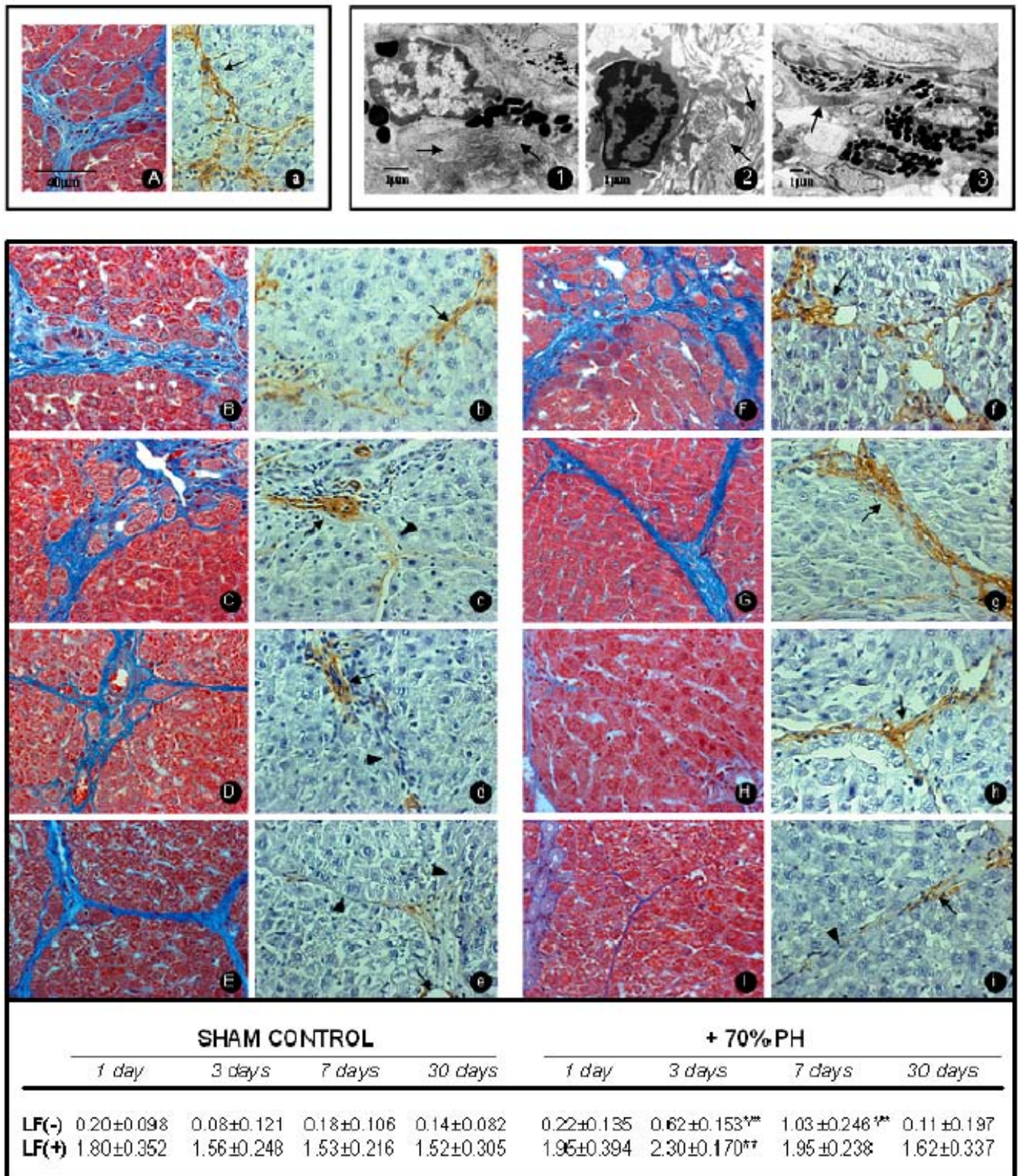


Figure 7. Expression of alpha smooth muscle actin (α -SMA) in activated HSC during regeneration of the fibrotic liver. Immunohistochemical determination of α -SMA-positive cells (activated HSC) is depicted. Representative 40 \times power field samples from fibrotic rat liver at time zero (image a) and after 1, 3, 7, and 30 days from either sham controls (images B–E, respectively) or 70% PH (images F–I, respectively). Masson stain was used to identify the presence of fibrotic tissue at onset of liver fibrosis (image A) and after 1, 3, 7, and 30 days in both, sham-operated (images B–E, respectively) or regenerating fibrotic liver (images F–I, respectively). Arrows indicate positive reaction, including hepatic vascular endothelium, as internal control. Arrowheads indicate amorphous material, corresponding to fibrotic tissue, containing α -SMA negative cells. Electron microscopy at tissue septa level, showing activated HSC (lower lipid drops and higher ECM production) are included (images 1–3).

literature on activated HSC contributing to fibrosis; a critical event in fibrogenesis is activation of resident perisinusoidal cells (HSC). Stellate-cell activation is characterized by many important phenotypes, including enhanced extracellular matrix synthesis and prominent contractility (47). It is accepted that the profibrogenic effect of ethanol metabolites is mediated by the stimulation of a complex network of cytokine actions, which also culminates with activation of HSC. Hence, the development of several animal models of liver fibrosis, as well as isolation and cultivation of hepatic stellate cells, has led to propose that activation of HSC is a key event in the fibrogenic process and many details on this finely tuned mechanism are now available (48, 49).

From here, we propose two possible mechanisms probably mediating PH actions on liver fibrosis: 1) by preparing ECM structure for further collagenase degradation, involving mainly gelatinase activities (50) and 2) by participating in the so-called hepatocyte priming, since ECM remodeling by MMPs could also foster the release of mitogenic cytokines and growth factors (51, 52). Furthermore, the apparent upregulation of MMP-9 and the lack of increase in the activity of MMP-2, elicited by PH in animals with liver fibrosis, seem to indicate the cell types involved in this PH-mediated effect. Indeed, MMP-9 could be expressed mainly by HSCs, whereas MMP-2 could be expressed by Kupffer (macrophage) cells. This whole picture seems to have failed in sham-operated fibrotic rats, where the balance between collagen synthesis and degradation seems to have been insufficient.

The regeneration of the remnant liver in the presence of cirrhosis accelerates immediately after PH, but the extent of regeneration is frequently insufficient. Several features have been claimed to be involved in the diminished regenerative capacity shown by the cirrhotic liver. For instance, PH-induced lipid peroxidation in massive resection of the cirrhotic liver may inhibit activation of mitochondrial respiration, decreasing the energy status (53). In addition, little activation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) has been noted in cirrhotic livers after PH (54), probably related to an early expression of TGF- β 1 (55). Moreover, impaired regeneration of the cirrhotic liver seems to be associated not only with a lower level of proliferating signals but also with a strong decrease in receptors for growth factors (56). Nonetheless, experimental cirrhotic livers could effectively respond to HGF supply after PH, as well as to the injection of recombinant adenoviral vectors encoding VEGF and HGF (57–59). Altogether, evidence indicates that the cirrhotic liver still possesses a variable capacity for responding to proliferative stimulus, but the amount of variability remains unknown.

It is feasible that activated HSC are responsible for ECM remodeling in this model (Fig. 7). The role of HSC during ECM remodeling has been largely documented in experimental models of hepatic fibrosis, regeneration and reversion of fibrosis (3, 42, 60). HSC became activated during liver fibrosis, and remained activated during regeneration of the fibrotic organ, where significant ECM remodeling was observed; whereas they rapidly decreased in sham-operated fibrotic controls. This suggests the possible role of activated HSC in fibrogenesis and ECM reduction in this experimental model. An attractive explanation, although not tested here, is that functional changes in the population of activated HSC or of new clones, showing different features of ECM production, participate during liver regeneration in this experimental model. A sustained or new activation of HSC, occurring during liver regeneration and coinciding with reduction of deposited ECM, disagrees with the attributed role of HSC in fibrogenesis (61), and rather indicates that activated HSC play a major role during PH-induced liver regeneration (62). Indeed, the stimulus for activation may arise from a controlled lipid peroxidation that occurs during rat liver regeneration (63, 64), whereas a decrease in the number of activated HSC may occur by either reversion to a quiescent phenotype or by apoptosis, as well as by interactions with Kupffer cells that are mediated by various cytokines and growth factors (65). It is obvious that the induced liver fibrosis occurred with evident inflammation, and that liver regeneration, induced by PH, could impose additional and characteristic inflammatory events. However, since the outcome was quite different between sham-operated and cirrhotic animals subjected to PH, regarding reversion of liver fibrosis, the response to regeneration in cirrhotic livers seems to be different from that of normal livers. In conclusion, swine serum-induced rat fibrotic liver showed a high proliferative ability after PH, as well as significant variations in ECM content. Although the evidence is still indirect, preservation of mitochondrial function could play a key role in the remodeling of ECM, as evidenced by a recovered balance between collagen synthesis and ECM degradation. Activated HSC are proposed as responsible for regulating such an ECM production/degradation balance, partially controlling liver cell proliferation. Therefore, pharmacological approaches for the resolution of liver fibrosis by blocking HSC activation should also evaluate possible effects on liver cell proliferation. We are not proposing large liver resections as a therapeutic approach for treating cirrhosis, but the present results could have a meaning in the response of the cirrhotic liver in the event of surgical removal of small well circumscribed hepatocellular cancer.

Below the images, area of α -SMA immunoreactive cells was calculated as [(total immunostained area – immunostained vessels and non-specific areas) \times 100] / whole image area. Arbitrary units from software Image-Pro v5.0 were used. LF = Liver fibrosis. Controls at time zero: LF (-) = 0.15 ± 0.085 ; LF (+) = 1.8 ± 0.295 . Results are expressed as mean \pm SE of 5 animals per group, and fifty 40 \times power fields per liver sample. Statistically significant against time zero (*), and against his control of group (**).

We thank the technical assistance of MS Benito Chávez (Departamento de Patología, Instituto Nacional Cardiología, "Ignacio Chávez"). Juan A. Suárez-Cuenca was a recipient of a PhD program fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), and from Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEPE, UNAM) during the development of the present work.

1. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11:S37-S43, 2001.
2. Shuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 21:351-372, 2001.
3. Martínez-Hernández A, Sebastián-Amenta P. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* 9:1401-1410, 1995.
4. Rojkind M, Greenwel P. Animal models of liver fibrosis. *Adv Vet Sci Comp Med* 37:333-335, 1993.
5. Chanda S, Mangipudy RS, Warbritton A, Bucci TJ, Mehendale HM. Stimulated hepatic tissue repair underlies heteroprotection by thioacetamide against acetaminophen-induced lethality. *Hepatology* 21:477-486, 1995.
6. Rojkind M, Greenwel P. Pathophysiology of liver fibrosis. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. Edited by McIntyre N, Benhamou J-P, Bircher J, Rizzeto M and Rodes J. New York, Oxford Medical Publication, p. 375-380, 1991.
7. Friedman SL. Molecular Regulation of hepatic fibrosis, and integrated cellular response to tissue injury. Minireview. *J Biol Chem* 275:2247-2250, 2000.
8. Pinzani M, Rombouts K, Colagrande S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *J Hepatol* 42:S22-S36, 2005.
9. Gines P, Cardenas A, Arroyo V, Rodes J. Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med* 350:1646-1654, 2004.
10. Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 5:315-334, 2001.
11. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G245-G249, 2000.
12. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115:209-218, 2005.
13. Bruck R, Genina O, Aeed H, Alexiev R, Nagler A, Avni Y, Pines M. Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology* 33:379-386, 2001.
14. Kato A, Bamba H, Shinohara M, Yamauchi A, Ota S, Kawamoto C, Yoshida Y. Relationship between expression of cyclin D1 and impaired liver regeneration observed in fibrotic or cirrhotic rats. *J Gastroenterol Hepatol* 20:1198-1205, 2005.
15. Andiran F, Kilinc K, Renda N, Ayhan A, Tanyel FC. Lipid peroxidation and extracellular matrix in normal and cirrhotic rat livers following 70% hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 50:805-808, 2003.
16. Kanta J, Chlumská A. Regenerative ability of hepatocytes is inhibited in early stages of liver fibrosis. *Physiol Res* 40:453-458, 1991.
17. Rozga J, Foss A, Alumets J, Ahren B, Jeppsson B, Bengmark S. Liver cirrhosis in rats: regeneration and assessment of the role of phenobarbital. *J Surg Res* 51:329-335, 1991.
18. Hashimoto M, Watanabe G. Functional restoration of cirrhotic liver after partial hepatectomy in the rat. *Hepatogastroenterology* 52:897-902, 2005.
19. Assy N, Hussein O, Khalil A, Luder A, Szvalb S, Paizi M, Spira G. The beneficial effect of aspirin and enoxaparin on fibrosis progression and regenerative activity in a rat model of cirrhosis. *Dig Dis Sci* 52:1187-1193, 2007.
20. Ozawa S, Uchiyama K, Nakamori M, Ueda K, Iwahashi M, Ueno H, Muragaki Y, Ooshima A, Yamaue H. Combination gene therapy of HGF and truncated type II TGF-beta receptor for rat liver cirrhosis after partial hepatectomy. *Surgery* 139:563-573, 2006.
21. Oe H, Kaido T, Furuyama H, Mori A, Imamura M. Simultaneous transfer of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor genes effectively promotes liver regeneration after hepatectomy in cirrhotic rats. *Hepatogastroenterology* 51:1641-1647, 2004.
22. Mohammed FF, Khokha R. Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends Cell Biol* 15:555-563, 2005.
23. Roselli HT, Su M, Washington K, Kerins DM, Vaughan DE, Russell WE. Liver regeneration is transiently impaired in urokinase-deficient mice. *Am J Physiol* 275:G1472-G1479, 1998.
24. Issa R, Zhou X, Trim N, Millward-Sadler H, Krane S, Benyon C, Iredale J. Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl4-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration. *FASEB J* 17:47-49, 2003.
25. Mohammed FF, Pennington CJ, Kassiri Z, Rubin JS, Soloway PD, Ruther U, Edwards DR, Khokha R. Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration. *Hepatology* 41:857-867, 2005.
26. Tanaka Y, Nouchi T, Yamane M, Irie T, Miyakawa H, Sato C, Marumo F. Phenotypic modulation in Iyocytes in experimental liver fibrosis. *J Pathol* 164:273-278, 1991.
27. Arthur MJ. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 122:1525-1528, 2002.
28. Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med* 40:267-281, 1997.
29. Paronetto F, Popper C. Chronic liver injury induced by immunologic reactions. Cirrhosis following immunization with heterologous sera. *Am J Pathol* 49:1087-1101, 1966.
30. Montfort I, Perez-Tamayo R, Alvizouri AM, Tello E. Collagenase of hepatocytes and sinusoidal liver cells in the reversibility of experimental cirrhosis of the liver. *Virchows Arch B Cell Pathol Mol Pathol* 59:281-289, 1990.
31. Zhao G, Nakano K, Chijiwa K, Ueda J, Tanaka M. Inhibited activities in CCAAT/enhancer-binding protein, activating protein-1 and cyclins after hepatectomy in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun* 292:474-481, 2002.
32. Miyamoto M, Manabe N, Uchio K, Kuramitsu K, Tamura D. Characteristics of lectin staining patterns assessed by a modified sensitive thermo-method in rat livers with heterologous serum-induced fibrosis. *J Vet Med Sci* 60:953-960, 1998.
33. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: the restoration of liver of white rat following surgical removal. *Arch Pathol* 12:186-202, 1931.
34. Fujiwara K, Ogata I, Ohta Y, Hayashi S, Mishiro S, Takatsuki K, Sato Y, Yamada S, Hirata K, Oka H. Decreased collagen accumulation by a prolyl hydroxylase inhibitor in pig serum-induced fibrotic rat liver. *Hepatology* 8:804-807, 1988.
35. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez-Cuenca JA, Trejo-Solís C, López V, Sánchez-Sevilla L, Yañez L, Chagoya de Sánchez V. Adenosine reverses a preestablished CCl4-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 34:677-687, 2001.
36. Rojkind M, González E. An improved method for determining specific radioactivities of proline-¹⁴C and hydroxyproline-¹⁴C in collagen and non-collagenous proteins. *Anal Biochem* 57:1-7, 1974.
37. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Chagoya de Sánchez V. Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Hepatology* 12:242-248, 1990.
38. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
39. Villarreal FJ, Dillmann WH. Cardiac hypertrophy-induced changes in

- mRNA levels of TGF β , fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* 262: H1860–H1866, 1992.
40. Knittel H, Mehde M, Grundmann B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 113:443–453, 2000.
 41. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the headbacteriophage T4. *Nature* 227:680–685, 1970.
 42. Michalopoulos GK, DeFrances M. Liver regeneration. *Adv Biochem Engin Biotechnol* 93:101–134, 2005.
 43. Rojkind M, Rojkind MH, Cordero-Hernandez J. In vivo collagen synthesis and deposition in fibrotic and regenerating rat livers. *Coll Relat Res* 3:335–347, 1983.
 44. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Chagoya de Sánchez V. Possible role of cell redox state on collagen metabolism in carbon tetrachloride-induced cirrhosis as evidenced by adenosine administration to rats. *Biochim Biophys Acta* 1200:93–99, 1994.
 45. Hernández-Muñoz R, Sánchez-Sevilla L, Martínez-Gómez A, Dent MA. Changes in mitochondrial adenine nucleotides and in permeability transition in two models of rat liver regeneration. *Hepatology* 37:842–851, 2003.
 46. Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis* 10:459–479, 2006.
 47. Siegmund SV, Dooley S, Brenner DA. Molecular mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Dig Dis* 23:264–274, 2005.
 48. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 200:504–515, 2003.
 49. Zheng WD, Zhang LJ, Shi MN, Chen ZX, Chen YX, Huang YH, Wang XZ. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10. *World J Gastroenterol* 11:1753–1758, 2005.
 50. Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmor BL. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* 267:4583–4591, 1992.
 51. Serandour AL, Loyer P, Garnier D, Courselaud B, Theret N, Glaise D, Guguen-Guillouzo C, Corlu A. TNF α -mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology* 41:478–486, 2005.
 52. Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Petersen BE, Michalopoulos GK. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* 26:896–904, 1997.
 53. Morimoto T, Isselhard W. Absence of mitochondrial enhancement in the remnant liver after partial hepatectomy in cirrhotic rats. *Res Exp Med (Berl)* 192:89–97, 1992.
 54. Chijiwa K, Nakano K, Kameoka N, Nagai E, Tanaka M. Proliferating cell nuclear antigen, plasma fibronectin, and liver regeneration rate after seventy percent hepatectomy in normal and cirrhotic rats. *Surgery* 116: 544–549, 1994.
 55. Mitsue S, Hamanoue M, Tanabe G, Ogura Y, Yoshidome S, Aikou T, Nakamura T. Expression of HGF and TGF- β 1 mRNA after partial hepatectomy in rats with liver cirrhosis. *Surg Today* 25:237–243, 1995.
 56. Masson S, Scotté M, François A, Coeffier M, Provot F, Hiron M, Ténière P, Fallu J, Salier JP, Daveau M. Changes in growth factor in cytokine mRNA levels after hepatectomy in rat with CCl $_4$ -induced cirrhosis. *Am J Physiol* 277:G838–G846, 1999.
 57. Kaido T, Yoshikawa A, Seto S, Yamaoka S, Sato M, Ishii T, Imamura M. Portal branch ligation with a continuous hepatocyte growth factor supply makes extensive hepatectomy possible in cirrhotic rats. *Hepatology* 28:756–760, 1998.
 58. Oe H, Kaido T, Furuyama H, Mori A, Imamura M. Simultaneous transfer of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor genes effectively promotes liver regeneration after hepatectomy in cirrhotic rats. *Hepatogastroenterology* 51:1641–1647, 2004.
 59. Ozawa S, Uchiyama K, Nakamori M, Ueda K, Iwahashi M, Ueno H, Muragaki Y, Ooshima A, Yamaue H. Combination gene therapy of HGF and truncated type II TGF- β receptor for rat liver cirrhosis after partial hepatectomy. *Surgery* 139:563–573, 2006.
 60. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 200:504–515, 2003.
 61. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5060–5065, 2006.
 62. Mabuchi A, Mullaney I, Sheard PW, Hessian PA, Mallard BL, Tawadrous MN, Zimmermann A, Senoo H, Wheatley AM. Role of hepatic stellate cell/hepatocyte interaction and activation of hepatic stellate cells in the early phase of liver regeneration in the rat. *J Hepatol* 40:910–916, 2004.
 63. Aguilar-Delfin I, Lopez-Barrera F, Hernandez-Munoz R. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CCl $_4$ administration. *Hepatology* 24:657–662, 1996.
 64. Trejo-Solis C, Chagoya de Sanchez V, Aranda-Fraustro A, Sanchez-Sevilla L, Gomez-Ruiz C, Hernandez-Munoz R. Inhibitory effect of vitamin E administration on the progression of liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *Lab Invest* 83:1669–1679, 2003.
 65. Vollmar B, Siegmund S, Richter S, Menger MD. Microvascular consequences of Kupffer cell modulation in rat liver fibrogenesis. *J Pathol* 189:85–91, 1999.