



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Facultad de Medicina**

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS *IN VITRO* DE LA  
COLÁGENA-POLIVINILPIRROLIDONA SOBRE  
LAS CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS  
MURINAS.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**P R E S E N T A**

**NELLY RAQUEL GONZÁLEZ ARENAS**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:  
DR. FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ**

**COMITÉ TUTOR:  
DRA. MARINA MACÍAS SILVA  
DR. DAVID GARCÍADIEGO CÁZARES**



**MÉXICO, D.F.**

**JUNIO, 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de abril de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **GONZÁLEZ ARENAS NELLY RAQUEL** con número de cuenta **400073468** con la tesis titulada: **"ESTUDIO DE LOS EFECTOS *IN VITRO* DE LA COLÁGENA-POLIVINILPIRROLIDONA SOBRE LAS CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS MURINAS"** realizada bajo la dirección de : **DR FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ**

Presidente: DR. DAVID KESHENOBICH STALINIKOWITZ  
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA DE LEÓN  
Secretario: DRA. MARINA MACÍAS SILVA  
Suplente: DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ  
Suplente: DR. DAVID GARCÍADIEGO CÁZARES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de mayo de 2011

*M. del Coro Arizmendi*  
DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

## AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, a todo el personal que en el participa, gracias por brindar los servicios adecuados y ofrecer estudios de calidad.
- A CONACYT por la beca que me fue otorgada durante 2 años correspondientes al programa de la Maestría en Ciencias Biológicas. Numero de beca:262058/220301 (cvu/becario).
- A los miembros del comité tutorial: Dr. Edgar Kröttsch, Dra. Marina Macías Silva y Dr. David Garciadiego Cázares, gracias por sus asesorías oportunas en las diferentes etapas del proyecto.
- Al Dr. David Kershenobich Stalnikowitz, Dra. Marina Macías Silva, Dra. María del Carmen García de León, Dr. Rolando Hernández Muñoz y Dr. David Garciadiego Cázares, miembros del jurado evaluador.

## AGRADECIMIENTOS

- Se agradece la asesoría del Biólogo Saúl Cano Colín. Se reconoce su participación en el proceso de todo este proyecto.
- Gracias al Dr. Enrique Pinzón Estrada, jefe de la unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina UNAM, por la donación de ratas de más de 500g, fundamentales para el desarrollo experimental de este trabajo.
- Gracias a la Genetista Martha Orozco Quiyono por proporcionar parte de los reactivos e insumos necesarios para la parte experimental.
- Se agradece la asesoría técnica de la Bióloga Marcela Sosa y al Pas de Doc. Genaro Vázquez en la obtención de HSC.
- Se agradece la asesoría técnica de la Q.F.B. Rosa María Salgado y Bióloga Gabriela Espinosa en la cuantificación de colágena.

...y me ha dicho: Bástate mi gracia;  
porque mi poder se perfecciona en la debilidad.

(2 corintios 12:9)

## Índice.

Resumen.....	8
Abstract.....	9
I. Introducción.....	10
I.1 Anatomía y fisiología del hígado.....	10
I.2 Fibrosis hepática.....	13
I.2.1 <i>Mecanismo celular de la fibrosis hepática</i> .....	14
I.3 Células Estelares Hepáticas (HSC).....	16
I.3.1 <i>HSC y fibrosis hepática</i> .....	17
I.3.2 <i>Regulación de la actividad fisiológica de las HSC</i> .....	18
I.4 Las HSC son blanco terapéutico contra la fibrosis hepática.....	19
I.4.1 <i>Remoción del agente agresor</i> .....	19
I.4.2 <i>Supresión de la inflamación hepática</i> .....	20
I.4.3 <i>Inhibición de la activación y proliferación de las HSC</i> .....	20
I.4.4 <i>Modulación de síntesis y degradación de MEC</i> .....	22
II. Antecedentes.....	23
III. Justificación.....	25
IV. Hipótesis.....	25
IV. Objetivo general.....	25
VI. Objetivos particulares.....	26
VII. Estrategia experimental.....	26
VIII. Métodos.....	28
VIII.1 Aislamiento de HSC.....	28
VIII.2 Preparación de medio D-MEM con colágena-PVP al 1% y 5%.....	28
VIII.3 Preparación de la mezcla MDI.....	29
VIII.4 Actividad metabólica (reducción del MTT).....	29
VIII.5 Ensayos de proliferación celular.....	30
VIII.6 Detección de $\alpha$ -SMA y procolágena $\alpha$ 1(I) por inmunocitoquímica.....	31
VIII.7 Purificación de RNA total.....	31
VIII.8 Reacción de transcripción inversa (RT-PCR).....	31
VIII.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	32

VIII.10 Electroforesis y análisis semicuantitativo.....	32
IX. Resultados.....	33
IX.1 Validación del modelo experimental.....	33
IX.2 Efecto de la colágena-PVP en el metabolismo celular.....	35
IX.3 Efecto de la colágena-PVP en la reversión al estado quiescente de las HSC activadas.....	36
IX.4 Efecto de la colágena-PVP en la proliferación de las HSC.....	40
X. Discusión.....	41
XI. Conclusión.....	43
XII. Referencias.....	44



## Índice de figuras y tablas.

<b>Figura 1.</b> Anatomía del Hígado.....	10
<b>Figura 2.</b> Componentes celulares, vasculares y biliares del hígado.....	11
<b>Figura 3.</b> Mecanismo celular de la fibrosis hepática.....	15
<b>Figura 4.</b> Ubicación de las HSC.....	16
<b>Figura 5.</b> Células estelares hepáticas.....	18
<b>Figura 6.</b> Activación de las HSC.....	19
<b>Figura 7.</b> Condiciones de cultivo para probar el efecto de la colágena-PVP en la reversión al estado quiescente.....	27
<b>Figura 8.</b> Condiciones de cultivo para probar el efecto de la colágena-PVP en la proliferación celular.....	27
<b>Figura 9.</b> Activación de las HSC después de 7 días de cultivo en condiciones estándares...33	
<b>Figura 10.</b> Establecimiento del control positivo de la reversión al estado quiescente de Las HSC.....	34
<b>Figura 11.</b> Efecto de la colágena-PVP en el metabolismo de las HSC.....	35
<b>Figura 12.</b> Inmunocitoquímica para detectar la proteína $\alpha$ -SMA en HSC activadas, después de 3 o 7 días de tratamiento.....	36
<b>Figura 13.</b> Inmunocitoquímica para detectar la proteína procolágena $\alpha$ 1(I) en HSC activadas, después de 3 o 7 días de tratamiento.....	37
<b>Figura 14.</b> Electroforesis en gel de agarosa.....	38
<b>Figura 15.</b> Expresión de $\alpha$ -sma en HCS después de 3 y 7 días de tratamiento posteriores a su activación.....	39
<b>Figura 16.</b> Expresión $coll\alpha$ 1 en HCS después de 3 y 7 días de tratamiento posteriores a su activación.....	39
<b>Figura 17.</b> Evaluación del efecto de la colágena-PVP en la proliferación celular por incorporación de BrdU.....	40
<b>Tabla 1.</b> Blancos terapéuticos en la fibrosis hepática.....	20
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR.....	32

## Resumen

La fibrosis es una respuesta común del hígado hacia un daño constante, se caracteriza por la acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular (MEC), principalmente colágena tipo I. Surge cuando los procesos normales de homeostasis y reparación del tejido quedan fuera de control como consecuencia de un daño hepático crónico. Las células estelares hepáticas (HSC) son las principales productoras de MEC en el proceso de la fibrosis. Una vez que han salido de su estado de quiescencia (después de un daño en el hígado) las HSC se activan o transdiferencian a células parecidas a miofibroblastos aumentando su adhesión, migración, y proliferación celular; también pierden la capacidad de almacenar vitamina A y expresan  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y colágena I, es decir adquieren propiedades fibrogénicas. Actualmente existe un interés médico en investigar y probar métodos que permitan revertir el estado activado de las HSC. La colágena-polivinilpirrolidona (colágena-PVP) es un biofármaco cuyo efecto en la resolución de procesos fibrosantes se ha comprobado, incluso se ha observado la disminución de la fibrosis hepática en un modelo murino. En el presente estudio se evaluó el efecto de la colágena-PVP en la reversión del estado activado de las HSC de rata al estado quiescente, a través de la detección por inmunocitoquímica de las proteínas  $\alpha$ -SMA y procolágena  $\alpha 1(I)$ , y por los niveles de expresión de sus mRNA, determinados por transcripción inversa y la amplificación de sus productos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). También se evaluó el efecto de la colágena-PVP en el metabolismo y proliferación de las HSC activadas. Los resultados de la prueba metabólica (reducción de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-1-il] ó MTT) indicaron que el biofármaco no es tóxico para las HCS. Los ensayos inmunocitoquímicos y las RT-PCR mostraron que los tratamientos con colágena-PVP al 1% y al 5% administrados durante 3 y 7 días en los cultivos celulares, no tuvieron un efecto directo en la reversión al estado quiescente de las HSC, ya que las proteínas  $\alpha$ -SMA y procolágena  $\alpha 1(I)$  continuaron siendo detectadas, e incluso la expresión de *colla1* aumentó en las células tratadas con colágena-PVP al 5% durante 7 días. Por otro lado, se observó a través de la incorporación de BrdU que las HSC cultivadas con colágena-PVP al 1% disminuyeron su proliferación. Por lo anterior, concluimos que la colágena-PVP no tiene un efecto directo en la reversión al estado quiescente de las HSC, pero sí disminuye su proliferación.

## **Abstract.**

The excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins, mainly collagen type I, is a condition known as hepatic fibrosis. This state is caused when the homeostasis and tissue regeneration are disturbed due to severe liver injury. The ECM present in the development of hepatic fibrosis is mainly generated by hepatic stellate cells (HSCs). Once the HSCs have left a quiescent state (after liver injury), they get activated and increase cell adhesion, migration and proliferation; also, they loss vitamin A accumulation capacity and transdifferentiate into a myofibroblast-like cell, express  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and collagen type I, acquiring fibrogenic properties. These facts have created such enormous interest in the medical research community; thus research is been conducted in order to revert the hepatic fibrosis condition. The collagen-polyvinylpyrrolidone (collagen-PVP) biopharmaceutical agent has been proven to have positive effects in the fibrogenetic processes resolution, even with a decrease hepatic fibrosis in a murine model. The aim of this work was the evaluation of the effect of collagen-PVP on the reversion of murine HSCs from activated to quiescent state by means of detection of  $\alpha$ -SMA and  $\alpha 1(I)$  procollagen proteins by immunocytochemistry and the evaluation of the expression levels of their own messenger RNA (mRNA) through reversal transcription and specific product amplification using polymerase chain reaction (RT-PCR). The effect of collagen-PVP on proliferation and metabolism of activated HSC was also evaluated. The results of the metabolic test (MTT reduction) suggest that the biopharmaceutical agent is not toxic to HSCs. The immunocytochemistry and RT-PCR tests showed that the collagen-PVP 1% and 5% treatment, supplied for 3 and 7 days on cultured cells did not have effect on reversion of the HSC to the quiescent state since the  $\alpha$ -SMA and  $\alpha 1(I)$  procollagen proteins were still expressed. In fact, the expression level of *coll1a1* increased in cultured cells treated with collagen-PVP 5% during 7 days. On the other hand, the BrdU assay indicates a decrease in cell proliferation with collagen-PVP 1% treatment. Based on those observations, we suggest that collagen-PVP has no direct effect on the reversion of HSCs to quiescent state. However, collagen-PVP decreases cell proliferation levels.

## I. Introducción.

### I.1. Anatomía y fisiología del hígado

El hígado es un órgano situado en la parte alta de la cavidad torácica orientándose hacia la derecha por debajo del diafragma. El hígado de rata está dividido en 4 lóbulos conectados uno con otro a través del hilum (vena porta, arteria hepática y tracto biliar), en cambio en el humano, el hígado se divide en dos lóbulos, el derecho y el izquierdo (figura 1). Cada lóbulo se organiza en 4 segmentos funcionales que reciben sangre de las ramificaciones de la vena porta, en el lóbulo izquierdo se encuentran los segmentos I a IV y en el lóbulo derecho los segmentos V a VIII (1).

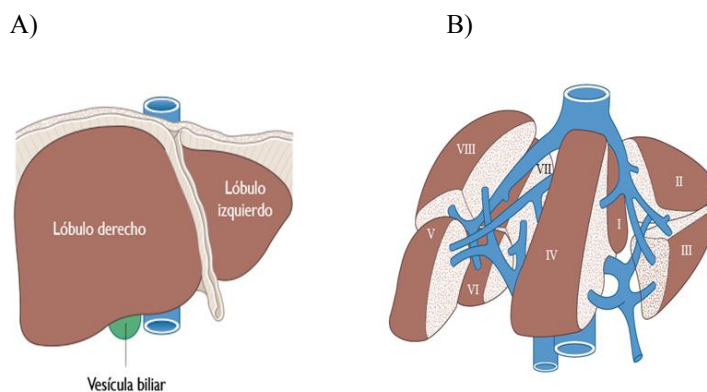


Figura 1. Anatomía general del hígado. En A se muestra los dos lóbulos hepáticos y en B se muestra la división en segmentos funcionales (tomado de Nelson, 2002).

El hígado está constituido por varios tipos celulares (figura 2). Los hepatocitos, también conocidos como células parenquimatosas, constituyen el 60% de la población celular y debido a su gran tamaño representan aproximadamente el 90% de la masa celular total. Las células que delimitan los ductos biliares representan aproximadamente el 5%, y el resto de la población celular está constituida por células endoteliales sinusoidales que limitan los espacios vasculares en el hígado (sinusoides); células de Kupffer (macrófagos hepáticos); células asesinas naturales (NK) y linfocitos asociados al hígado (células Pit) y las células estelares hepáticas (HSC por sus siglas en inglés Hepatic Stellate Cells), las cuales en su estado quiescente almacenan retinol y cuando se activan producen citocinas y componentes de matriz extracelular (2).

El tejido hepático, a nivel microscópico, se organiza en zonas de tamaño y forma irregular denominadas acinos. Los vasos sanguíneos, vena porta y arteria hepática se dividen en pequeñas ramificaciones que pueden ser detectadas en las secciones histológicas, estas áreas son llamadas tracto portal, espacio portal o triada portal. El tracto portal y la vena central constituyen el límite que define al lobulillo o acino hepático. Los acinos son unidades hexagonales o pentagonales cuyas esquinas están marcadas por el tracto portal y el centro por la vena central. En el acino los hepatocitos están dispuestos en hileras que se extienden desde la zona porta hasta la vena central, el espacio entre hilera e hilera contiene a los sinusoides hepáticos (3). En el lumen del sinusoides se encuentran las células de Kuffer y en la zona perisinusoidal (espacio de Disse) se encuentran las HSC (figura 2).

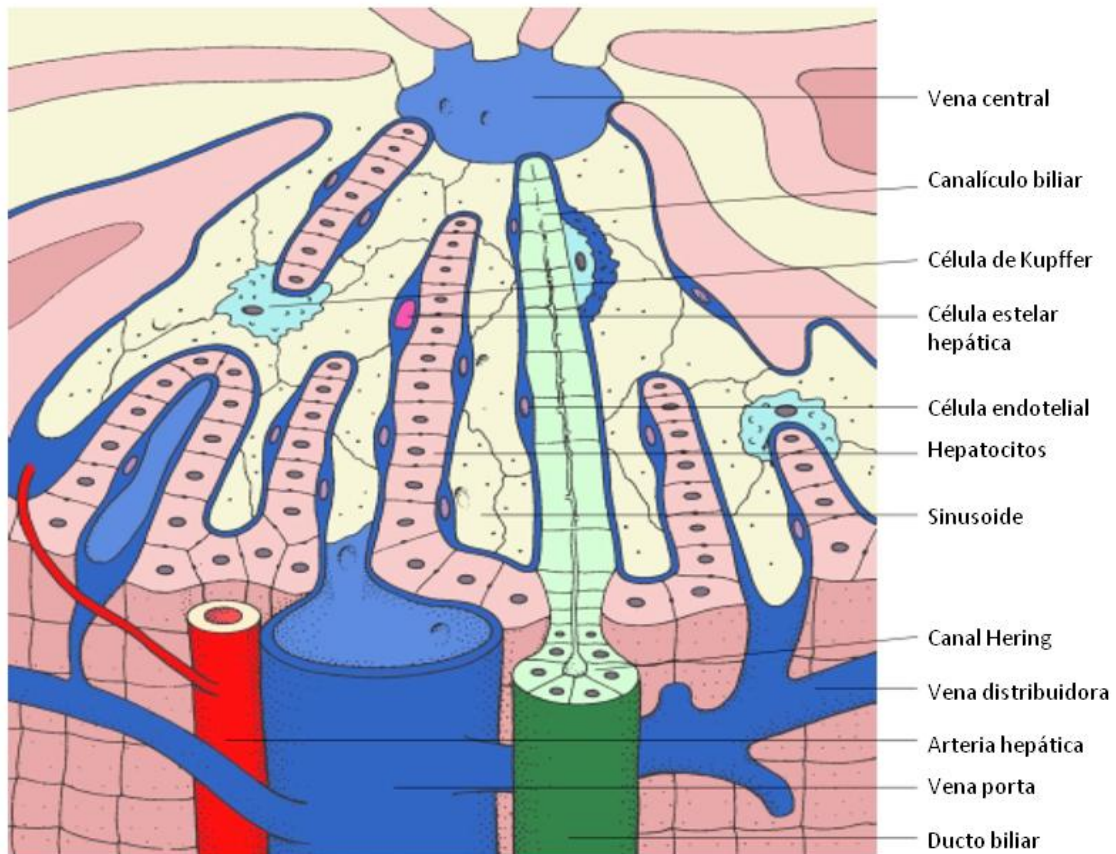


Figura 2. Componentes celulares, vasculares y biliares del hígado. Los hepatocitos son las células principales del hígado, se apilan formando columnas separadas por el sinusoides el cual está formado por las células endoteliales (Tomado de Nelson, 2002).

El tejido libre de células constituye el 20% del volumen hepático y está constituido por la matriz extracelular formada principalmente por colágena. El hígado sano presenta varios tipos de colágenas fibrilares (I, III, IV) (3,4 y 5) y no fibrilares (V, VI y XIV). En menor proporción existen otros componentes como fibronectina, laminina, elastina, proteoglicanos y glicosaminoglicanos (6,7).

Además de una estructura compleja, el hígado tiene una intensa y diversa actividad fisiológica. Dentro del metabolismo de los carbohidratos, el hígado regula los niveles de glucosa en la sangre, almacenando, sintetizando y degradando el glucógeno, así que, el hígado resulta decisivo para mantener la glucemia dentro de los límites normales. En este órgano se lleva a cabo el metabolismo de los lípidos y la oxidación de ácidos grasos para proveer energía, se sintetiza el colesterol, las lipoproteínas y los fosfolípidos. También se sintetizan lípidos a partir de hidratos de carbono y una vez que se forman son transportados por lipoproteínas hacia el tejido adiposo para su almacenamiento. Las funciones principales del hígado en el metabolismo de las proteínas son la desaminación, la formación de urea para eliminar el amoníaco de los líquidos corporales, formación de proteínas plasmáticas como la albumina y elementos necesarios para la coagulación sanguínea (fibrinógeno y protrombina) y la síntesis e interconversión de distintos aminoácidos, por ejemplo los aminoácidos no esenciales (1).

El hígado tiene además otras funciones, es el almacén de materiales de reserva como vitaminas (A, D y B<sub>12</sub>) y hierro, en forma de ferritina que libera cuando el organismo lo requiere, actuando como un amortiguador del hierro sanguíneo. En el hígado se secreta la bilis, útil en el metabolismo de las grasas y en la absorción de minerales; además, este órgano tiene un papel fundamental en los procesos de desintoxicación de compuestos endógenos como el amonio y exógenos como el alcohol u otras drogas. Cada población celular que conforma el tejido hepático cumple su función en el mantenimiento de la homeostasis y conservan la estructura y función del órgano (1).

## I.2. Fibrosis hepática

Las alteraciones en el equilibrio homeostático del hígado pueden inducir una respuesta regenerativa y la restauración del órgano; por ejemplo, después de una lesión aguda intensa en la que hay destrucción celular y disminución de la capacidad funcional se estimula la regeneración hepática, que conlleva a la proliferación de hepatocitos seguida del incremento de células no parenquimatosas y de la síntesis de componentes normales de matriz extracelular (MEC) (8). Pero si por el contrario, el daño es repetitivo y crónico surge la fibrosis como un mecanismo compensatorio para recuperar la homeostasis (9).

La fibrosis es una respuesta del hígado hacia un daño constante, se caracteriza por la acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular (MEC), principalmente colágena tipo I (2). Es el resultado de la pérdida del equilibrio entre la síntesis y degradación de los componentes de la matriz, de manera que ésta se ve afectada tanto en la cantidad como en su composición. En la etapa de fibrosis avanzada, el hígado contiene aproximadamente 6 veces más cantidad de MEC que un hígado sano (7), incluyendo colágenas (I, III y VI), fibronectina, ondulina, elastina, laminina, ácido hialurónico y proteoglicanos. Ante el incremento en la síntesis de componentes de la matriz hepática, la síntesis de metaloproteasas (MMP) resulta insuficiente favoreciendo la acumulación del tejido fibroso, aunada a la disminución de la actividad de las MMP, debido a la sobreexpresión de sus inhibidores específicos (TIMP) (7).

La acumulación de MEC a través del sinusoides desde la vena central hasta el espacio portal interfiere con la hemodinamia hepática normal causando hipertensión portal; conjuntamente, la acumulación de tejido conectivo en el espacio de Disse puede impedir el flujo bidireccional normal de sangre del endotelio hacia el parénquima hepático y viceversa, llevando a la disfunción del órgano (10).

Los agentes causales de la fibrosis son principalmente la infección crónica por HVC (virus de la hepatitis C), enfermedades metabólicas, el abuso en la ingesta de alcohol, drogas, la esteatohepatitis no alcohólica, el ataque autoinmune a los hepatocitos y anomalías

congénitas, pero independientemente del estímulo que origine el daño, la respuesta fibrogénica es la misma y en su desarrollo existen características comunes tales como:

- a) Daño tisular constante.
- b) Movilización de células inflamatorias que liberan citocinas moduladoras de la respuesta fibrogénica como IL-6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , contribuyendo a la activación de las HSC.
- c) Acumulación de células fibrogénicas que incrementan el depósito de colágenas fibrilares y la expresión de los inhibidores de las metaloproteasas.

I.2.1 *Mecanismo celular de la fibrosis*. Durante el proceso de fibrogénesis se da una intercomunicación entre los diferentes tipos celulares del hígado. Los hepatocitos son el blanco de muchos agentes hepatotóxicos como los virus de la hepatitis o los metabolitos derivados del alcohol o drogas. Los hepatocitos dañados liberan mediadores fibrogénicos que inducen la invasión de “células blancas”. Los linfocitos activan a las HSC las cuales aumentan la síntesis de colágena, citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión e inducen la activación de linfocitos, generando un círculo “vicioso” en el que las HSC activan a los linfocitos y viceversa (11) (figura 3).

El desarrollo de la fibrosis está también influenciado por otras células como los linfocitos T cooperadores y los macrófagos residentes (células de Kupffer), incluso la fibrosis causada por alteraciones biliares se ve influenciada por las citocinas liberadas por células endoteliales sinusoidales quienes estimulan a los miofibroblastos portales a iniciar el depósito de colágena alrededor del ducto biliar. Los cambios en la composición de la MEC pueden directamente estimular la fibrogénesis, por ejemplo, la colágena I, estimula la activación de las HSC (12).

La fibrosis crónica conduce lentamente a la cirrosis y en algunos casos al desarrollo de carcinoma hepático; a la fecha no se ha podido establecer si la cirrosis humana es reversible o no, no obstante la fibrosis si se considera un proceso reversible (13), para lo cual se



requiere entre otras cosas, del aumento de la actividad de las MMPs y la disminución de las HSC activadas, principales células productoras de MEC en el hígado.

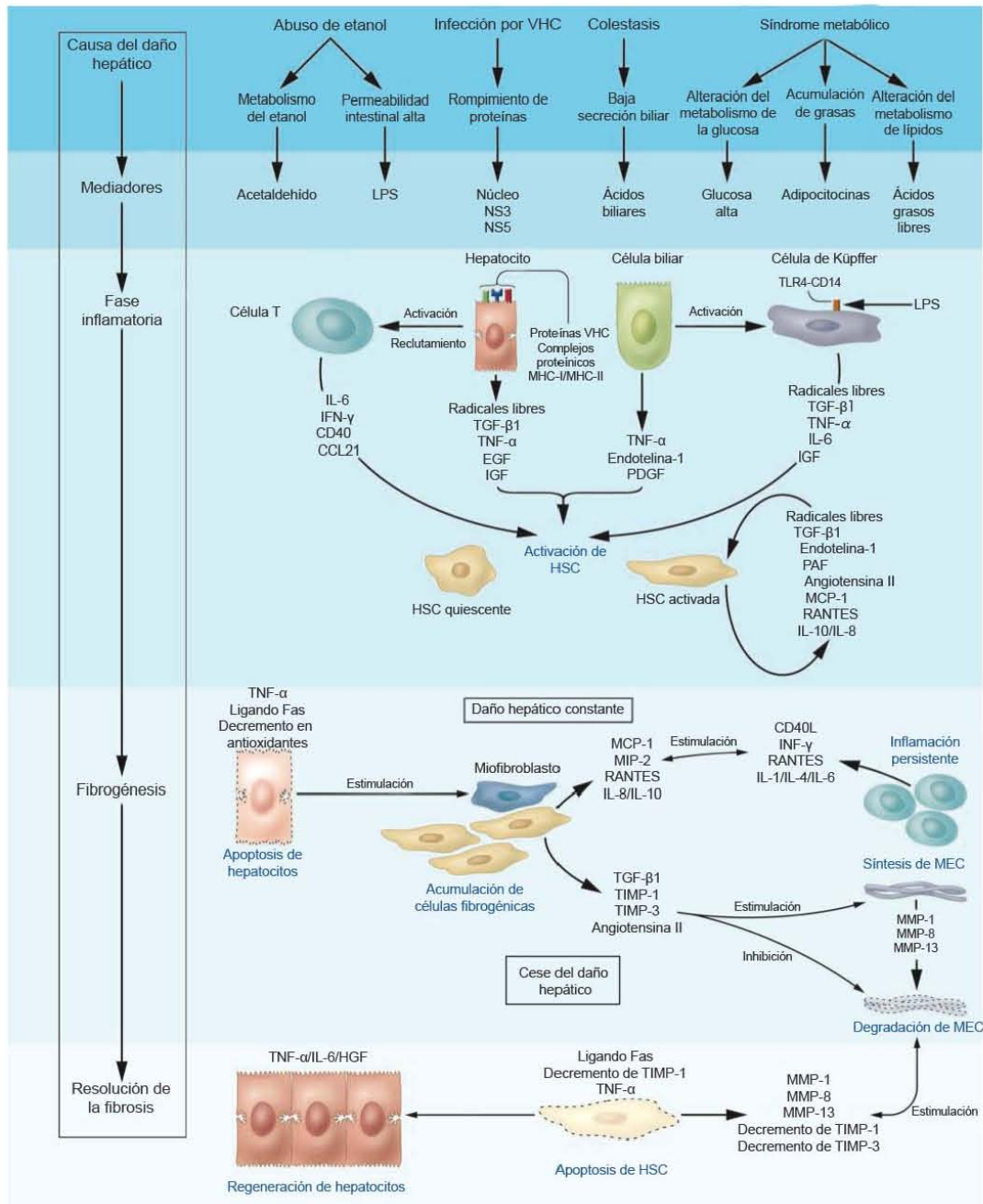


Figura 3. Mecanismo celular de la fibrosis hepática (traducido de R. Bataller y D. A. Brenner, 2005).

### I.3 Células Estelares Hepáticas (HSC).

Las HSC se localizan en el espacio perisinusoidal (espacio de Disse). Representan del 5-8% de las células del hígado y están presentes en una proporción aproximada de 10 células por cada 100 hepatocitos. Tienen una forma semejante a una estrella con gotas de vitamina A en su citoplasma cuyo diámetro varía de acuerdo a diferentes condiciones fisiológicas. Las gotas lipídicas fluorescen al exponerse a la luz (328nm de longitud de onda) y emiten un color verdoso (14). La cantidad de gotitas lipídicas, desmina y proteína glial fibrilar acídica (GFAP) varían dependiendo de la localización de la población de HSC dentro del lóbulo hepático.

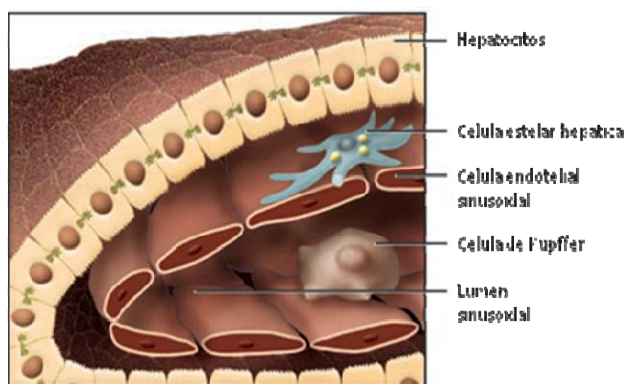


Figura 4. Ubicación de las células estelares hepáticas.

Las HSC expresan proteínas de citoesqueleto características de las células de origen mesenquimal tales como la vimentina y la desmina (15), además presentan marcadores neurales tales como la proteína GFAP, nestina y sinaptofisina que son propias de células de origen ectodérmico (14,15). Recientemente se reportó que una proporción de estas células expresan marcadores característicos de células progenitoras como el receptor de neurofinas p75 (p75NTR), el ligando c-kit (16-19) y las proteínas CD105 y CD133 (19), por lo que su origen embrionario aún es incierto. Las HSC quiescentes expresan marcadores característicos de adipocitos como PPAR $\gamma$ , SREBP-1c y leptina (12, 20,38); mientras que las HSC activadas presentan marcadores miogénicos como  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), c-myb y el factor potenciador 2 de miocitos (14, 21, 22).

Las HSC son capaces de proliferar *in vivo* e *in vitro*. Estudios de proliferación celular basados en la incorporación de bromodesoxiuridina, realizados en ratas sanas, demostraron que la mayoría de estas células permanecen en fase G<sub>0</sub> del ciclo celular y que sólo proliferan después de un daño hepático (14).

Las funciones de las HSC quiescentes son, mantener la homeostasis del hígado a través del almacenamiento y metabolismo de la vitamina A y la remodelación de la matriz extracelular. En el caso del metabolismo de la vitamina A, en las HSC el retinol es transformado a retinaldehído por la enzima retinol deshidrogenasa (RoLDH) y subsecuentemente a ácido retinoico por la retinal deshidrogenasa 1 (RALDH1), el ácido retinoico es un ligando muy importante de los receptores RAR y RXR (receptor de ácido retinoico y receptor X de retinoides) que regulan redes complejas de control transcripcional de genes, manteniendo así el estado quiescente de las células (23, 24). Respecto a la remodelación de la MEC, estas células se encargan de su recambio en el espacio de Disse a través de la síntesis de colágenas tipo III, IV, I y laminina (25) y también a través de la expresión de MMP-1, MMP-13, MMP-2, MMP-10 Y MMP-14 y los inhibidores TIMP-1 y TIMP-2 (4).

I.3.1 *HSC y fibrosis hepática*. Las HSC son las principales productoras de MEC en el proceso de la fibrosis hepática. Después de un daño en el hígado las HSC se activan y se transdiferencian, pierden su capacidad de almacenar vitamina A y adquieren una forma parecida a miofibroblasto (figura 5); además presentan cambios tales como el aumento en la migración, adhesión y proliferación. Aumenta su expresión de colágena tipo I y III, así como de TIMP-1 y TIMP-2 que a su vez provocan que la actividad de las MMPs disminuya (26). El estado activado de las HSC también se caracteriza por que adquieren contractibilidad debido a la expresión de  $\alpha$ -SMA.

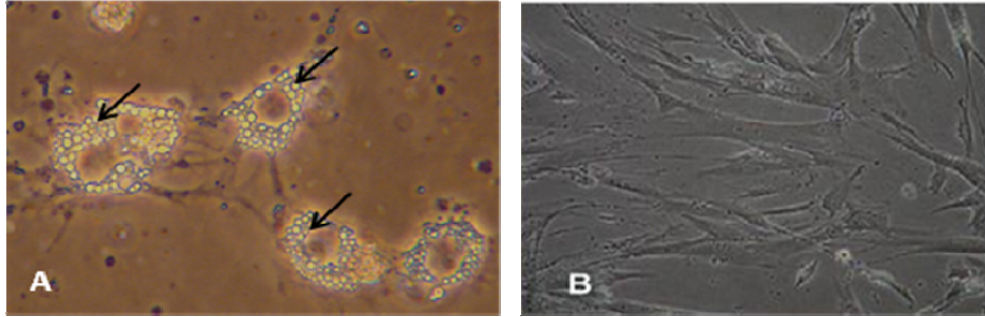


Figura 5. HSC. (A) Forma típica de las células estelares hepáticas, en su citoplasma se observan gotas con vitamina A (flechas). (B) HSC activadas, su morfología cambia, ahora son parecidas a miofibroblastos y han perdido sus gotas lipídicas. (Tomado de R. K. Moreira, 2007)

*I.3.2 Regulación de la actividad fisiológica de las HSC.* El inicio de la activación de las HSC se debe principalmente a señales parácrinas de las células vecinas dañadas (hepatocitos, células de Kupffer, plaquetas, células endoteliales o neutrófilos) las cuales liberan factores de crecimiento, sustancias vasoactivas y radicales libres provocando su activación, una vez activas las HSC perpetúan este estado por medio de señales autócrinas (27).

Se ha identificado al TGF- $\beta$  como la citocina más importante que induce fibrogénesis (28) y al PDGF como el principal activador de la proliferación (29, 30). Otras sustancias que promueven la fibrogénesis son la trombina, arginina, vasopresina y angiotensina II, que aumentan la proliferación de las HSC (31). La proteína quimiotáctica-1 derivada de monocitos (MCP-1) promueve la migración de las HSC al sitio de lesión (32); y se ha observado que moléculas como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), TIMP-1, colágena I e integrinas también tienen acción fibrogénica, ya que inducen la acumulación de MEC (33).

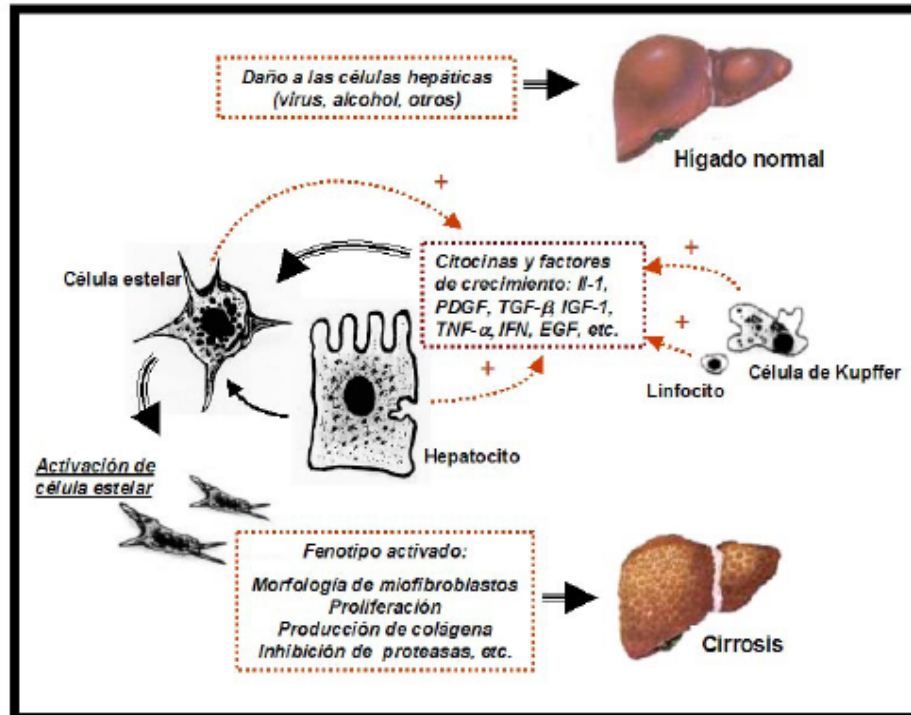


Figura 6. Activación de las HSC. La activación de la célula estelar resulta de su interacción con las diferentes células residentes en el hígado a través de factores de crecimiento e interleucinas que actúan en forma parácrina y autócrina (tomado de A. L. Buitinea, 2006).

#### I.4 Las HSC son blanco terapéutico contra la fibrosis hepática.

La resolución de la fibrosis en modelos experimentales está asociada a la disminución de las HSC activas, por lo que el desarrollo de terapias antifibróticas se centran en evitar la acumulación, modular la activación y proliferación o promover la apoptosis de estas células a través de la aplicación de diversos fármacos (tabla 1).

I.4.1 *Remoción del agente agresor.* Actualmente la terapia más efectiva en la resolución de la fibrosis hepática ha sido la remoción del agente patológico. Este recurso es efectivo para evitar el progreso de la fibrosis y cuando se emplea en una etapa temprana la fibrosis puede revertirse totalmente. En el caso de la fibrosis causada por VHC se administra interferón- $\alpha$  ya que tiene efecto antiviral (34).

Tabla1. Blancos terapéuticos en la fibrosis hepática.

<b>Remoción del agente dañino</b>	
Antivirales: INF $\alpha$ /ribavirina	
<b>Reducción de la inflamación</b>	
TNF $\alpha$ Colchicina Malotilato	Antagonista del receptor de la IL-10 Corticosteroides
<b>Inhibición de la activación del las células estelares</b>	
Citocinas: IFN's HGF Interferony Antioxidantes: Vitamina E Fosfatidilcolina Retinil palmitato Silimarina	Inhibidores de vías de señalización: Antagonista de TGF $\beta$ Camastat mesilato Compuestos herbales : glicirricina Sho-saiko-to IFC305 (derivado de adenosina)
<b>Antiproliferativos de HSC</b>	
Amiloride	Pentoxifilina
<b>Inhibición de la secreción de MEC por las células estelares (antifibróticas)</b>	
HGF Antagonista de los receptores de endotelina Compuesto HOE077	Antagonista de TGF- $\beta$ 1 Transilast Compuesto S4682
<b>Estimulación de la apoptosis de las células estelares</b>	
Gliotoxina	Antagonista de integrinas

(Modificada de A. L. Buitinea, 2006).

I.4.2 *Supresión de la inflamación hepática.* La inflamación hepática precede y promueve el avance de la fibrosis; en contraste, sustancias que inhiben la respuesta inflamatoria en el hígado limitan la fibrogénesis, entre estas sustancias se encuentran los corticoesteroides, la colchicina y el malotilato, las cuales se han empleado en humanos pero su uso frecuente conlleva a efectos adversos. Una estrategia alternativa para disminuir la inflamación es la neutralización de las citocinas proinflamatorias, por ejemplo de IL-1, IL-10 o TNF- $\alpha$  (35).

I.4.3 *Inhibición de la activación y proliferación de las HSC.* Muchos tratamientos que se encuentran bajo evaluación afectan la acumulación de HSC activadas por inhibición de su proliferación o su activación. Estos tratamientos incluyen el uso de antioxidantes, la

modulación de sustancias vasoactivas, el uso de dietas suplementarias o la ingesta de compuestos de hierbas naturales.

Los compuestos antioxidantes no sólo inhiben la activación y la síntesis de colágena de las HSC, sino que también previenen la activación de las células de Kupffer y previenen la apoptosis de los hepatocitos. Un ejemplo es la vitamina E (tocoferol) que disminuye la peroxidación de lípidos, la activación de HSC y la expresión de genes de colágena tipo I, aunque en humanos su eficacia no es la idónea. La silimarina, fosfatidilcolina, S-adenocil-L-metionina y el retinil palmitato son otros ejemplos de compuestos antioxidantes que inhiben la proliferación y activación de HSC en modelos de fibrosis hepática (35).

La modulación de la actividad de citocinas específicas también puede disminuir la fibrosis hepática, tal es el caso de la inhibición de la acción del TGF- $\beta$ , el cual es el principal factor de crecimiento inductor de la fibrosis. Esta citocina favorece la transición del estado quiescente al estado activado de las HSC, estimula la síntesis de proteínas de MEC e inhibe su degradación. Las estrategias enfocadas a bloquear o disminuir la expresión del TGF- $\beta$  conducen a la disminución de la fibrosis hepática en modelos experimentales. Por ejemplo, *Camostat mesilato* reduce la liberación de TGF- $\beta$  en su forma activa, reduciendo la fibrosis hepática en modelos murinos. La desventaja que presenta este tipo de terapias es que la inhibición del TGF- $\beta$  no debe ser prolongada, ya que esta citocina también participa en el control del ciclo celular, manteniendo a las células sin proliferar, así que su atenuación podría llevar a desarrollar cáncer (35).

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) induce la proliferación de las HSC, la formación de colágena y la expresión de TGF- $\beta$ . La aplicación de esta citocina en diferentes modelos experimentales disminuye considerablemente el tejido fibroso, sin embargo, uno de los efectos adversos es que aumenta el riesgo de padecer cáncer (35).

La utilización de compuestos que inhiben vías de transducción de señales que llevan a la fibrogénesis también tiene gran valor terapéutico; por ejemplo, la pentoxifilina y amiloride

son compuestos que disminuyen la proliferación celular inhibiendo la señalización del PDGF.

Diferentes compuestos herbales como el *Sho-saiko-to* y el glicirricina han sido estudiados en la resolución de la fibrosis, y han mostrado resultados benéficos, ya que al administrarlos a cultivos de HSC la proliferación y el depósito de colágena tipo I disminuyen. (36).

Otro compuesto recientemente estudiado es el IFC305, su aplicación en modelos murinos ha mostrado la disminución de la fibrosis y la recuperación del parénquima hepático, aunque aún se desconoce el mecanismo molecular de su efecto, el cual se ha asociado con la prevención de la activación de las células estelares. El compuesto IFC305 presenta la ventaja de que está constituido por adenosina y aspartato los cuales son fácilmente metabolizados por el organismo evitando daños colaterales (37).

I.4.4 *Modulación de síntesis y degradación de MEC.* Muchas investigaciones se han centrado en inhibir la síntesis de colágenas fibrilares las cuales forman el tejido fibroso. Los compuestos HOE077 y S4682 bloquean a la enzima prolil hidroxilasa inhibiendo la formación de moléculas de colágena y por tanto inhiben la activación de las HSC (35).

La mayoría de las estrategias terapéuticas mencionadas sólo han sido probadas en modelos experimentales, y aunque su aplicación ha dado buenos resultados, su uso en humanos no ha sido probada, incluso la utilización de algunas de ellas puede resultar contraproducente, ya que pueden causar cáncer. El desarrollo de nuevos fármacos contra la fibrosis hepática debe ser específico para el órgano blanco, su aplicación tolerada por el sistema inmune y cumplir con los criterios de bioseguridad.



## II. Antecedentes.

Las HSC son las principales responsables de la fibrogénesis así que, conocer su mecanismo de activación o su reversión al estado quiescente es importante y necesario para desarrollar terapias efectivas contra la fibrosis hepática. La disposición de métodos de aislamiento, purificación y su mantenimiento en cultivo han facilitado el estudio de estas células. A través de estas herramientas se ha observado la reversión al estado quiescente de las HSC (*in vivo* no se ha podido estudiar), al sembrar HSC activadas en la matriz Englebret-Holm-Swarm (matrigel), la cual está compuesta de colágena IV, éstas retornan a su estado quiescente, además de que la expresión de proteínas asociadas con la activación como  $\alpha$ -SMA, colágena I y TIMP-1 se ven disminuidas significativamente (35). Otro trabajo en el que se observó la reversión de la activación fue el desarrollado por Hongyun She y colaboradores (38), mediante el tratamiento con la mezcla MDI (metil xantina, dexametasona e insulina) en HSC se alcanza la reversión al estado quiescente observado por la incorporación de gotas lipídicas en el citoplasma de la célula, la disminución en la expresión de  $\alpha$ -SMA, colágena I y disminución de su proliferación.

La colágena-polivinilpirrolidona.

La colágena-polivinilpirrolidona (colágena-PVP), es un compuesto preparado a base de colágena tipo I (obtenida de piel porcina y pepsinizada) y polivinilpirrolidona (un compuesto polimérico inerte de bajo peso molecular), mezclados en una solución de citratos. La mezcla se esteriliza con radiación  $\gamma$  y al final cada ml del producto contiene 141.3 mg de colágena-pvp que equivalen a 8.3 mg de colágena (39).

La colágena-PVP tiene efectos antifibrótico, fibrolítico, hemostático, induce la cicatrización, disminuye la inflamación en padecimientos como osteoartritis y artritis reumatoide, también presenta actividad osteoestimuladora y osteorreparadora, por lo que se ha aplicado ampliamente como biofármaco.

La aplicación de colágena-PVP en la resolución de cicatriz hipertrófica disminuye la expresión de PDGF-AB, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y moléculas de adhesión como ELAM-1 y VCAM-1, llevando a la resolución de la fibrosis, de tal manera que los niveles de estas moléculas

alcanzan parámetros normales a los de un tejido sano (40). A su vez, la colágena-PVP es capaz de inducir la remodelación de la fibrosis peritoneal disminuyendo la inflamación asociada a esta patología a través de la disminución directa de la proliferación de fibroblastos e indirecta de la producción de proteínas de MEC (41).

Por otro lado, en cultivos de sinovia de pacientes con artritis reumatoide, cuya afección principal es la inflamación crónica de las articulaciones, la colágena-PVP regula negativamente la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  (42, 43).

La colágena-PVP también tiene efectos en los procesos reparativos de la piel, cuando en modelos murinos y humanos se aplica intralesionalmente induce el aumento del tejido de granulación y mejora el arreglo tisular que conlleva a una disposición de las fibras de colágena I y III similar a la de piel normal.

Respecto a la acción osteorreparadora, los implantes de colágena-PVP aceleran la formación de hueso nuevo en lesiones óseas ocasionadas experimentalmente a cráneos de rata, en comparación con implantes de colágena sola (44).

Recientemente, se evaluó el efecto de colágena-PVP sobre la fibrosis hepática en ratas (fibrosis inducida por tetracloruro de carbono y dimetil nitrosamina), y se observó disminución del daño hepático determinado por los niveles séricos de LDH, alcanzando niveles normales en ratas fibróticas tratadas con el biofármaco, las cantidades totales de colágena con tendencia a normalizarse, la evaluación histopatológica con una puntuación según Knodell casi normal y los marcadores de estrés oxidativo como la cantidad de lipoperóxidos y la actividad de glutatión reductasa alcanzaron niveles normales (manuscrito en preparación). Como se mencionó anteriormente, los efectos de la colágena-PVP están asociados a la regulación de citocinas proinflamatorias como PDGF, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta_1$ . Estas citocinas son muy importantes para las HSC, ya que su sobreexpresión conduce a la activación de estas células induciendo la fibrosis hepática.

### **III. Justificación.**

La cirrosis es una de las principales causas de muerte en el mundo, tan sólo en México se registran en promedio 28,422 muertes anuales por cirrosis y enfermedades hepáticas, ubicándose en tercer lugar en causas de muerte en la población varonil adulta y en séptimo lugar en la población femenil (Estadísticas de la Dirección General de Información en Salud, 2008).

El desarrollo de este mal es gradual, pero una vez instaurado provoca un deterioro progresivo en la salud del paciente llevándolo rápidamente a la muerte, por lo que detener y revertir este padecimiento en su etapa de fibrosis es necesario. A la fecha, se sabe que las HSC desempeñan el papel central en el desarrollo de la fibrosis, lo que las ubica como clave en la reparación y regeneración del hígado.

Debido a las propiedades ya mencionadas de la colágena-PVP, ésta ha sido empleada como biofármaco en la resolución de procesos fibrosantes, en los cuales el daño ha disminuido e incluso ha mejorado la apariencia o arquitectura del tejido, así que la investigación del efecto de este biofármaco sobre el estado activado de las HSC que conlleva a la fibrosis hepática resulta prometedora.

### **IV. Hipótesis**

El biofármaco colágena-PVP induce la reversión al estado quiescente de las HSC, inhibiendo el fenotipo fibrogénico y su proliferación.

### **V. Objetivo general**

Evaluar *in vitro* el efecto de la colágena-PVP sobre el estado activado de las HSC murinas.

## **VI. Objetivos particulares**

1. Evaluar el efecto de la colágena-PVP en el metabolismo de las HSC activadas.
2. Evaluar el efecto de la colágena-PVP sobre la reversión del estado activado de las HSC en cultivo, determinando la presencia de las proteínas  $\alpha$ -SMA y procolágena  $\alpha$ 1(I) y los niveles de expresión de sus RNA mensajeros.
3. Evaluar *in vitro* el efecto de la colágena-PVP sobre la proliferación de las HSC.

## **VII. Estrategia experimental.**

El estudio se realizó en cultivos primarios de HSC en los cuales se evaluó el efecto de la colágena-PVP sobre la reversión del estado activado. La evaluación se realizó detectando las proteínas, procolágena  $\alpha$ 1(I) y  $\alpha$ -SMA por medio de inmunocitoquímica y la expresión de sus respectivos mRNA mediante RT-PCR. Esta evaluación se llevó a cabo en cuatro grupos que incluyó el control negativo de la reversión al estado quiescente (sin tratamiento), el control positivo de la reversión (MDI) y dos concentraciones del fármaco a probar (1 y 5% de colágena-PVP) (figura 7) a los 3 y 7 días posteriores a su respectivo tratamiento.

La evaluación del efecto del biofármaco en la proliferación de las HSC activadas se llevó a cabo por medio de la detección de la incorporación de BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina) en los cultivos, para lo cual se obtuvieron HSC y se sembraron en placas de 96 pozos durante 7 días (periodo de activación). Enseguida, con el fin de sincronizar su ciclo celular, se cultivaron con medio D-MEM sin suero durante 24 horas. Posteriormente los pozos se organizaron en 4 grupos (figura 8) y se les aplicaron los distintos tratamientos durante 48 horas, finalmente se realizó la medición de la proliferación en cada uno de los cultivos.

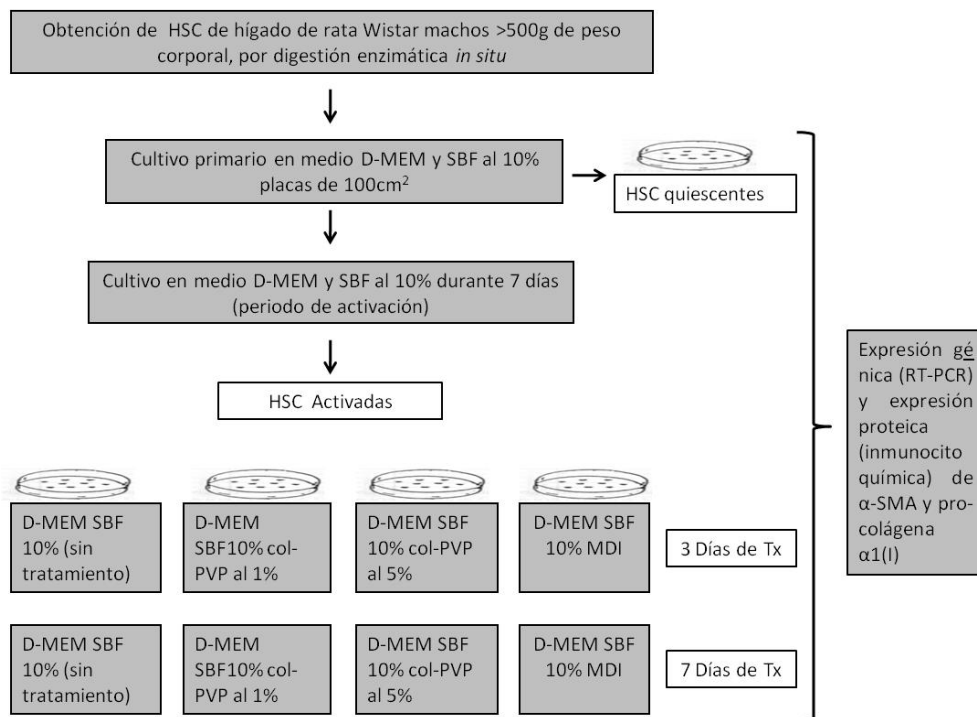


Figura 7. Condiciones de cultivo para probar el efecto del biofármaco colágena-PVP en la reversión al estado quiescente.

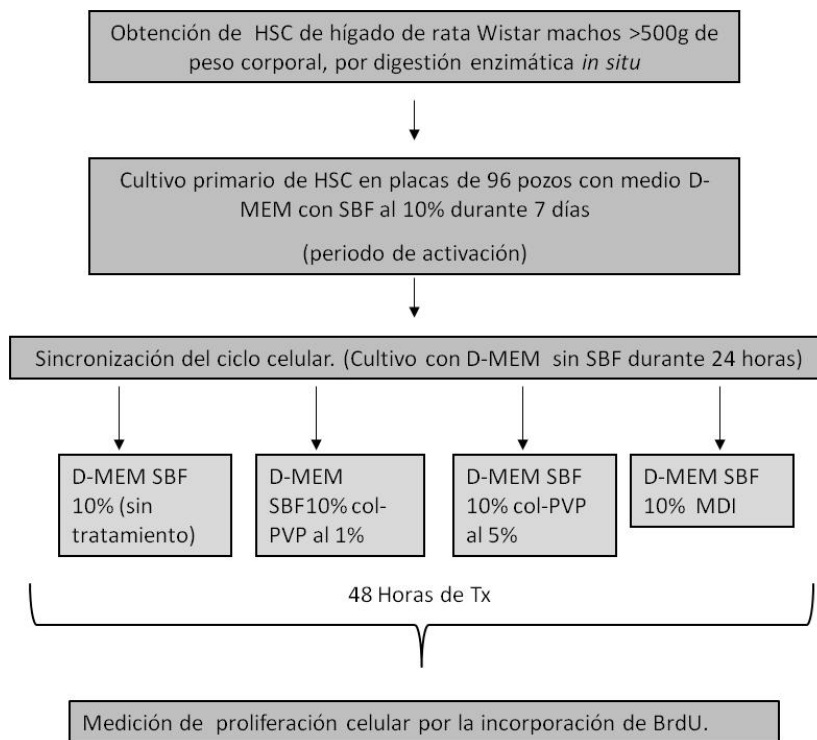


Figura 8. Condiciones de cultivo para evaluar el efecto del biofármaco colágena-PVP en la proliferación celular.

## VIII. Métodos.

### VIII.1 Aislamiento de HSC.

Las HSC se obtuvieron mediante la digestión enzimática *in situ* del hígado de rata Wistar de más de 500g de peso corporal. Se operó a la rata para canular la vena porta y a través de esta se perfundieron 20 mL de pronasa E de *Streptomyces griseus* al 0.25% (Sigma-Aldrich) y 20 ml de colagenasa IV al 0.0175% (sigma-Aldrich) disueltas en buffer L15 con  $\text{Ca}^{2+}$  las cuales se recircularon durante 15 y 20 minutos respectivamente, al término de este tiempo el hígado se terminó de fragmentar con tijeras manteniéndolo en solución de DNasa I 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Roche) disuelta en buffer L15 con  $\text{Ca}^{2+}$ . Posteriormente, el homogenado se filtró en una maya de tul y el filtrado se centrifugó a 55 x g (R.C.F) durante 2 minutos, el sobrenadante se centrifugó nuevamente pero a 704 x g (R.C.F) durante 10 minutos a 10°C, para obtener una capa blanquizca de células, la cual se separó y se colocó en solución de Histodenz al 8.2% (Sigma) en buffer L15 con  $\text{Ca}^{2+}$  y se ultracentrifugó durante 35 minutos a 10°C en una ultracentrífuga XL-100K (Beckman Coulter) y un rotor SW40Ti a 57831 x g (R.C.F) para que a través de la formación de un gradiente de densidad las HSC pudieran ser separadas. Se tomó la fracción de HSC y se lavó con PBS por centrifugación a 595 x g (R.C.F) por 10 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron y se sembraron en medio de cultivo D-MEM suplementado con SBF al 10% y antibióticos y antimicótico, a las 24 horas de cultivo se les cambió el medio por medio fresco y se cultivaron bajo distintas condiciones específicas para cada ensayo.

### VIII.2 Preparación de medio D-MEM con Colágena-PVP al 1% y 5%.

Debido a que la colágena-polivinilpirrolidona (Fibroquel<sup>MR</sup>, Aspid S.A de C.V) está disuelta en una solución de citratos, su aplicación directa en el medio de los cultivos de HSC modificaría considerablemente el pH en los cultivos alterando la fisiología celular. Así que, para eliminar esta mezcla de citratos se procedió de la siguiente manera: 8 ml del biofármaco se colocaron en una membrana de diálisis y se depositó en un recipiente con agua manteniéndose en agitación constante durante 2 horas a 4°C; posteriormente la membrana se transfirió a un recipiente con solución de ácido acético 50mM, se realizaron 2 cambios de esta solución fresca cada 2 horas y un último cambio en el que permaneció en agitación toda una noche a 4°C.

Al término de la diálisis, la colágena-PVP se esterilizó por filtración con filtro millipore (poro de 0.22 $\mu$ m). La cuantificación del contenido de colágena en el biofármaco dializado y esterilizado se realizó por medio de la técnica de Woessner que consiste en hidrolizar la colágena con HCl 6N a 105°C durante 18h, neutralizarla y cuantificar la cantidad de hidroxiprolina a través de su oxidación con cloramina T y su reacción con ácido perclórico 3.5 N y P-dimetilaminobenzaldehído, que al reaccionar generan un color morado proporcional a la cantidad de hidroxiprolina, se mide la absorbancia de esta solución a 557nm de longitud de onda, los valores obtenidos se comparan con una curva estándar cuya concentración de hidroxiprolina es conocida. Conociendo la concentración de colágena en el fármaco dializado se adicionó al medio de cultivo a concentraciones de 1 y 5% respecto a su concentración original (8.3mg/ml), ya que a estas concentraciones es a las que se ha observado el efecto del fármaco en cultivos celulares.

### VIII.3 Preparación de la mezcla MDI.

Se prepararon soluciones concentradas 100X de isobutil metilxantina 0.5mM (sigma), dexametasona 1 $\mu$ m (Sigma) e insulina humana 1 $\mu$ m (sigma) de tal manera que se tomaron 10 $\mu$ l de los stocks por cada mililitro de medio de cultivo. La isobutil metil xantina y la dexametasona se disolvieron en metanol y la insulina se disolvió en ácido acético al 1%; todas las soluciones se esterilizaron por filtración. La aplicación de esta mezcla en los cultivos celulares se realizó a diario durante los días que fue necesario.

### VIII.4 Actividad metabólica (Reducción de MTT).

La actividad metabólica celular se valoró a través de la conversión de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-1-il]) a formazan por la actividad mitocondrial. Para este ensayo se obtuvieron HSC y se sembraron en placas de 24 pozos (8000 células /pozo) y se mantuvieron en condiciones estándares de cultivo durante 7 días. Se sincronizó su ciclo celular cambiándoles el medio por D-MEM sin suero y manteniéndose así durante 24h. Enseguida se retiró el medio y se aplicaron 500 $\mu$ l de los distintos tratamientos por triplicado, manteniéndose en estas condiciones durante 48 horas:

- D-MEM SBF 10% (control negativo de la reversión al estado quiescente)
- D-MEM SBF 10% + colágena-PVP 1%

- D-MEM SBF 10% + colágena-PVP 5%
- D-MEM SBF 10% + mezcla MDI (control positivo de la reversión al estado quiescente)

A continuación, a cada cultivo se le adicionó 50µl de MTT (5mg/ml) previamente disuelto en medio de cultivo y esterilizado por filtración y se incubaron en condiciones estándares de cultivo durante 2.5 horas. Al término de la incubación a cada pozo se le retiró el medio y se lavaron 2 veces con 500µl de PBS. Para solubilizar el precipitado azul de formazán generado por la actividad mitocondrial, se agregaron a cada pozo 500µl de dimetil sulfóxido (DMSO), se agitaron durante 40 minutos y finalmente se midió la absorbancia de la solución obtenida a 570 nm de longitud de onda usando como blanco 500µl de DMSO. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los datos obtenidos en el programa sigma plot versión 11.

#### VIII.5 Ensayos de proliferación celular.

Las células estelares obtenidas por digestión enzimática se contaron con hemocitómetro y se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos a diferentes densidades: 1000, 1400, 1600, 1800 y 2000 células/pozo para determinar el número de células adecuado para el ensayo. Se mantuvieron con medio D-MEM-SBF 10% durante 7 días. Al término de este periodo se eligieron las placas que inicialmente contenían 1600 células/pozo ya que estaban aproximadamente al 60% de confluencia.

Para sincronizar el ciclo celular en los cultivos, se les cambió el medio de cultivo por D-MEM sin suero y se mantuvieron así durante 24h. Transcurridas las 24 horas de sincronización, se procedió a poner los distintos tratamientos por triplicado (figura 8, estrategia experimental).

El efecto en la proliferación celular se midió a las 48 horas de tratamiento con el kit Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System (GE Health care) siguiendo el protocolo del fabricante, el cual se basa en la incorporación del compuesto BrdU (5'-bromo-2'-desoxiuridina) en las células. El tiempo de marcaje con BrdU fue de 12 horas, el tiempo de reacción con el anticuerpo anti-BrdU acoplado a peroxidasa fue de 90 minutos y el tiempo



de reacción con su sustrato (TMB) fue de 15 minutos aproximadamente. La reacción se detuvo con 25 µl de ácido sulfúrico 1M. Finalmente se midió la absorbancia a 450 nm de longitud de onda en un lector para placas de ELISA.

Los datos obtenidos se analizaron con el programa computacional Sigma plot versión 11, estos fueron expresados como medias de los triplicados  $\pm$  una desviación estándar. El nivel de significancia en las diferencias de las medias entre los tratamientos de cada grupo experimental fue calculado con un ANOVA de una vía y por el método de comparación multiple Holm-Sidak con un nivel de significancia de 0.05

#### VIII.6 Detección de $\alpha$ -SMA y procológena $\alpha$ 1(I) por inmunocitoquímica.

Después del periodo de tratamiento en placas de cultivo de 24 pozos las HSC se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos seguido de un lavado con PBS. La detección de las proteínas  $\alpha$ -SMA y procolágena I en las células fijadas se realizó con el kit Zymed immunohistostain sp. (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó el anticuerpo primario anti  $\alpha$ -SMA clona 1A4 de la marca Santa Cruz a una dilución de 1:1000, y el anticuerpo anti procolágena  $\alpha$ 1(I) a una dilución de 1:250, los tiempos de incubación con los anticuerpos fueron de 2 horas y 12 horas respectivamente.

#### VIII.7 Purificación de RNA total.

La purificación de RNA total de las HSC se realizó con el kit RNA easy de la marca Q-agen, siguiendo las instrucciones del fabricante. El contenido de RNA en cada muestra se determinó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm de longitud de onda. La calidad e integridad del RNA purificado se evaluó por electroforesis en gel de agarosa-TBE al 1%.

#### VIII.8 Reacción de transcripción inversa (RT)

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó a partir de 1µg de RNA total obtenido de cada tratamiento (estrategia experimental) empleando oligos (dT). La reacción se realizó con el kit Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante y empleando el termociclador Palm Cycler Corbett Research.

### VIII.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

A partir del cDNA obtenido de cada cultivo (estrategia experimental) se amplificaron por PCR fragmentos de los genes  $\alpha$ -sma (292pb), *coll1a1* (100pb) y  $\beta$ -actina (390pb). Para determinar el número de ciclos en la amplificación de cada gen, a fin de que el producto de PCR correspondiera a la fase exponencial de la reacción, se realizaron reacciones a 15, 20, 25, 30, 35 y 40 ciclos de extensión. Determinado el número de ciclos necesarios, las condiciones de amplificación para cada gen fueron las siguientes: para  $\alpha$ -sma y  $\beta$ -actina, desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto (55°C para  $\beta$ -actina), 72 °C 30 segundos (40 segundos para  $\beta$ -actina) y 72°C por 2 minutos de extensión final. Para *coll1a1*, desnaturalización inicial de 94°C durante 3 minutos, 27 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 54°C por 1 minuto, 72 °C 30 segundos y 72°C por 2 minutos de extensión final. La reacción se realizó con el kit PCR Super Mix (Invitrogen) poniendo 1µl de cDNA como molde en un volumen final de 25µl, los oligonucleótidos empleados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR

OLIGO	SECUENCIA	TAMAÑO (BASES)	Tm	FRAGMENTO A AMPLIFICAR (bp)	REFERENCIA
F-ASMA	TGCTGGACTCTGGAGATG	18	56	292	19
R-ASMA	GTGATCACCTGCCCATC	17	54		
F-COL1A1	TGGATTCCCGTTTCGAGTACG	20	53	100	37
R-COL1A1	AGGTGATGTTCTGGGAGGCC	20	55		
F-BACT	GCCCTAGACTTCGAGCAAGA	20	53	390	19
F-BACT	CAGTGAGGCCAGGATAGAGC	20	55		

### VIII.10 Electroforesis y análisis semicuantitativo.

Los productos de PCR se analizaron en geles electroforéticos de agarosa-TBE al 2.5% y se visualizaron con bromuro de etidio. Las imágenes de los geles se capturaron con equipo Dolphin-Doc Waltec System (Waltec Corp, USA) y la densidad de la banda se midió con el software Dolphin 1-D gel Analysis. Los niveles de expresión de  $\alpha$ -sma y *coll1a1* se

calcularon como la relación de la densidad de la banda correspondiente a cada gen comparado con la densidad de la banda de  $\beta$ -actina. Los datos obtenidos de 3 experimentos independientes se analizaron en el programa computacional Sigma plot versión 11 realizando análisis de varianza (ANOVA) y la prueba a posteriori Holm Sidalk para discernir las diferencias significativas entre los tratamientos y grupo control.

## IX. Resultados.

### IX.1 Validación del modelo experimental.

Se aislaron HSC y se sembraron en placas de cultivo de 24 pozos, en ellos se observó la transición del estado quiescente al estado activado de las HSC a través de la detección de las proteínas  $\alpha$ -SMA y procolágena  $\alpha$ 1(I) por inmunocitoquímica. En el día uno de cultivo las HSC no expresan ambas proteínas y se observó la presencia de gotas lipídicas. Al día 7 de cultivo la células perdieron las gotas lipídicas, y se detectó la expresión de las proteínas  $\alpha$ -SMA y procolágena tipo I (figura 9), confirmando la diferenciación de las HSC hacia miofibroblastos.

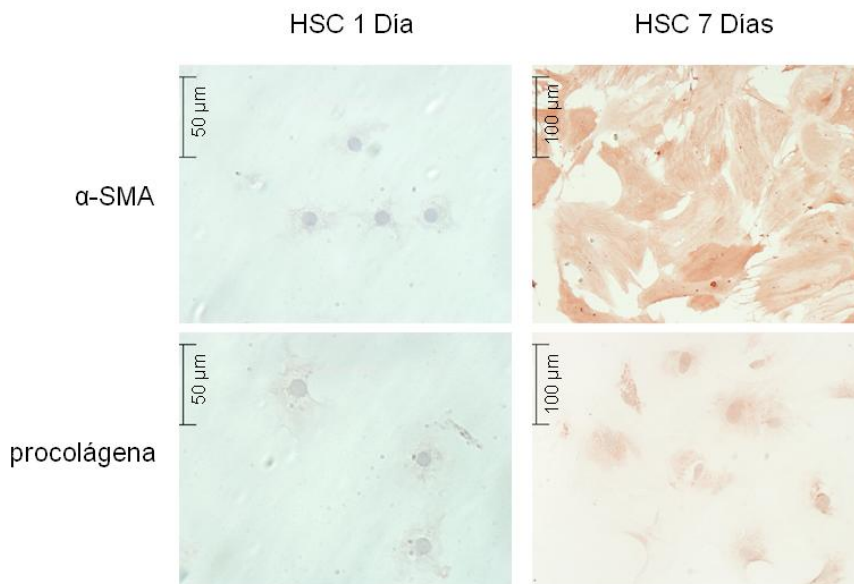


Figura 9. Activación de las HSC después de 7 días de cultivo en condiciones estándares. Las HSC al día 1 de cultivo no presentan  $\alpha$ -SMA ni procolágena I mientras que al día 7 de cultivo si se detectaron.

Para evaluar el efecto de la colágena-PVP en las HSC activadas, fue necesario un control positivo que nos indicó la capacidad de las células estelares de regresar a su estado quiescente. Para ello se indujo la reversión a este estado por medio de la aplicación de MDI en los cultivos. El efecto de esta mezcla como inductor de la reversión al estado quiescente ya había sido reportado por Hongyun She y colaboradores (38) por tanto, siguiendo el modelo que ellos reportan, se aplicó esta mezcla a cultivos de HSC durante 3 ó 7 días posteriores al periodo de activación.

Al término del tratamiento, se detecto por inmunocitoquímica las proteínas  $\alpha$ -SMA y procolágena  $\alpha$ 1(I). Estas proteínas estuvieron presentes tanto en las células tratadas con MDI como en las células cultivadas sólo con D-MEM y SBF10% (figura 10), pero los cultivos tratados con MDI presentaron menos células teñidas tanto a 3 como a 7 días de tratamiento que los cultivos sin tratamiento, lo cual nos indicó que las células estaban regresando al estado quiescente, además desde el día uno de tratamiento con MDI se observó un cambio en la forma de las células, ya que éstas se empezaron a contraer y disminuyeron sus fibras de estrés.

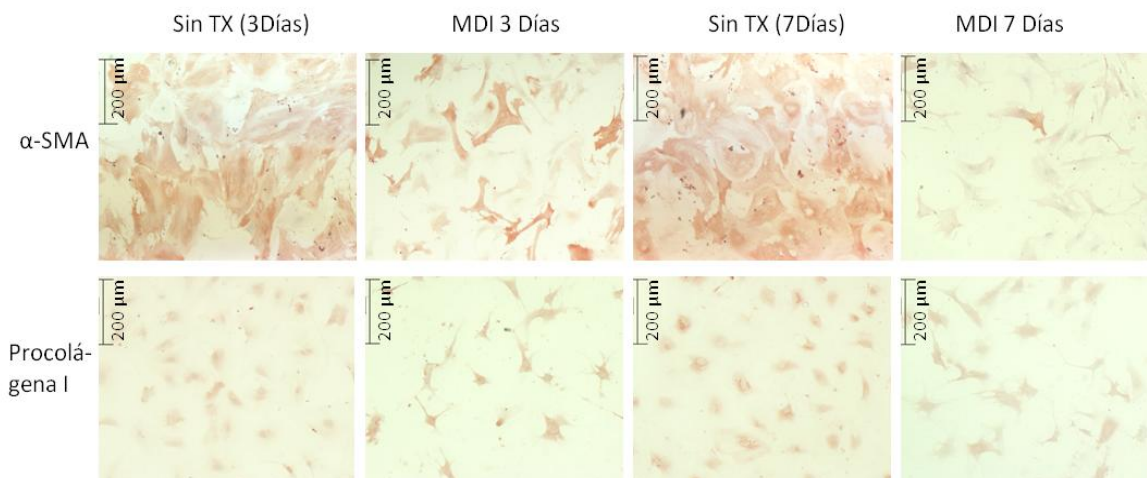


Figura 10. Establecimiento del control positivo de la reversión al estado quiescente de las HSC (aplicación de MDI). En los cultivos de HSC tratados con MDI durante 3 y 7 días disminuyeron las células que expresan  $\alpha$ -SMA y procolágena  $\alpha$ 1(I) proteínas características de las HSC activadas.

Teniendo establecidos los controles negativos y positivos de la reversión al estado quiescente de las HSC, se continuó con evaluar el efecto del biofármaco en las células activadas a nivel metabólico, en la inducción al estado quiescente y el efecto en su proliferación.

### IX.2 Efecto de colágena-PVP en el metabolismo celular.

Esta evaluación se realizó a través de la medición de la reducción de MTT a formazán, por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa para detectar algún efecto metabólico adverso de la colágena-PVP al 1 y al 5% en las HSC. Los valores de absorbancia obtenidos y su análisis indicaron que el fármaco no afectó metabólicamente a las células, ya que las diferencias entre cada tratamiento respecto al cultivo control (sin tratamiento) no fue estadísticamente significativa ( $p=0.589$ , figura 11).

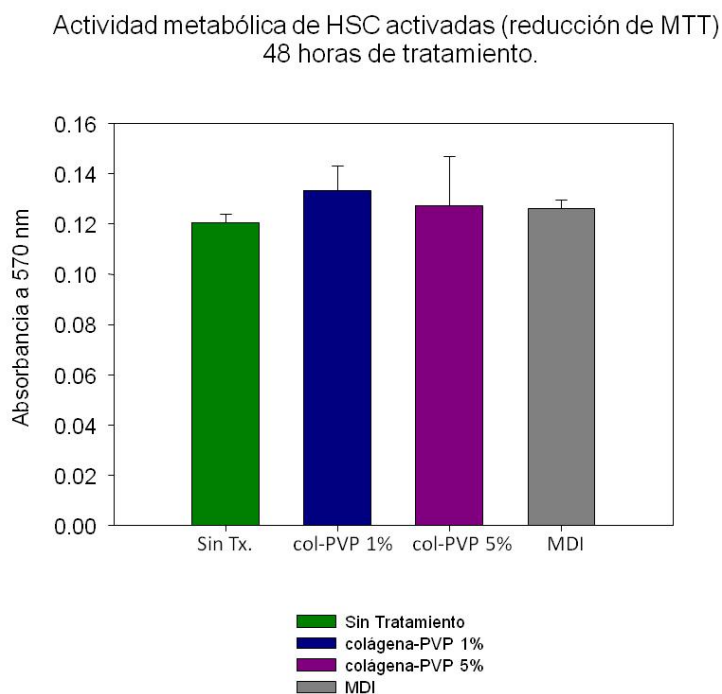


Figura 11. Efecto de la colágena-PVP en el metabolismo de las HSC, las barras indican el promedio del triplicado de cada tratamiento  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). El análisis de varianza mostró que las diferencias entre los tratamientos no son estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$   $p=0.587$ )

### IX.3 Efecto de la colágena-PVP en la reversión al estado quiescente de las HSC activadas.

El efecto de la colágena-PVP en la reversión de HSC activadas al estado quiescente se evaluó detectando las proteínas  $\alpha$ -SMA y procolágena  $\alpha$ 1(I) así como la expresión de sus respectivos mRNA.

Después de su periodo de activación las HSC se cultivaron durante 3 o 7 días con medio suplementado con colágena-PVP al 1%, colágena-PVP al 5%, MDI (control positivo de la reversión) o sólo con D-MEM y SBF 10% (control negativo de la reversión). Al término de cada tratamiento se detectaron las proteínas  $\alpha$ -SMA y procolágena  $\alpha$ 1(I), proteínas expresadas por las HSC activadas. Ambas proteínas se detectaron por inmunocitoquímica en todos los cultivos (figuras 12 y 13), pero estas se observaron disminuidas sólo en los cultivos que fueron suplementados con MDI, siendo menor su detección a los 7 días de tratamiento. En los cultivos suplementados con colágena-PVP al 1 o 5% estas proteínas se siguieron detectando, igual que en los cultivos sin tratamiento.

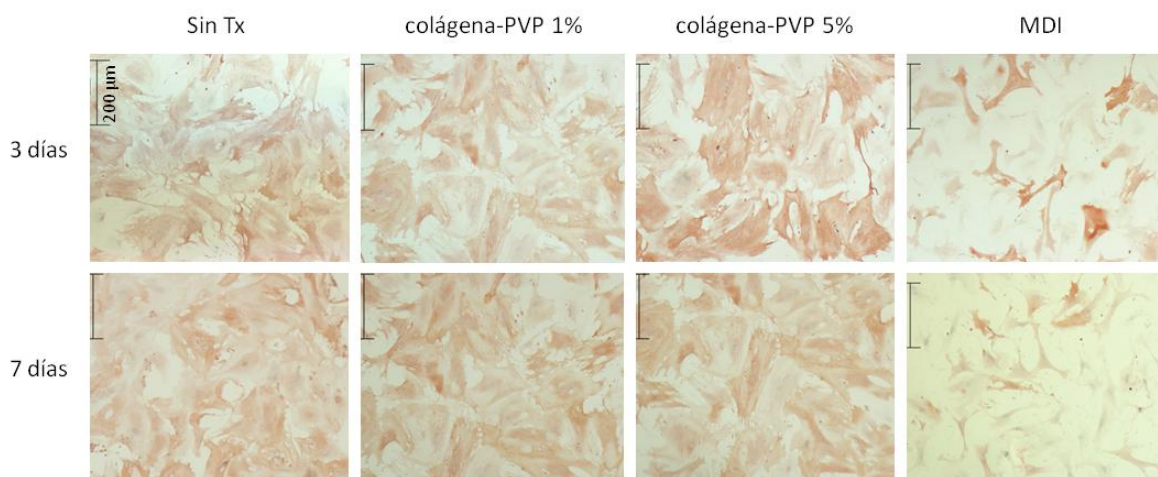


Figura 12. Inmunocitoquímica para detectar la proteína  $\alpha$ -SMA en HSC activadas, después de 3 o 7 días de tratamiento.

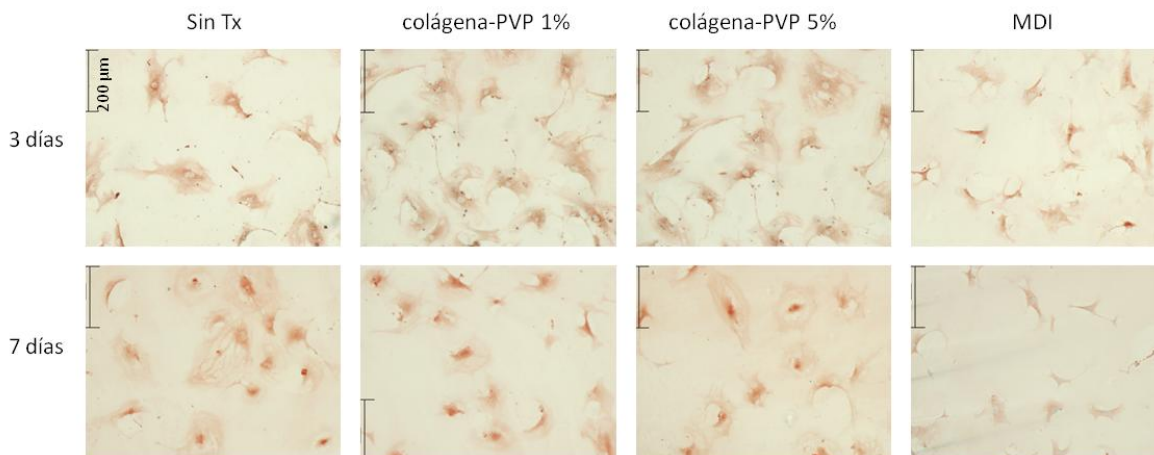


Figura 13. Inmunocitoquímica para detectar la proteína procolágena  $\alpha 1(I)$  en HSC activadas, después de 3 o 7 días de tratamiento.

La evaluación de los niveles de expresión de los mRNA de  *$\alpha$ -sma* y *colla1* se realizó por medio de la técnica de RT-PCR. Las determinaciones también se realizaron después de 3 o 7 días de tratamiento en HSC activadas; cabe mencionar que como control negativo de la expresión de  *$\alpha$ -sma* y *colla1* se empleó cDNA de HSC quiescentes (un día de cultivo). El análisis de la expresión de  *$\alpha$ -sma* mostró que después de 3 y 7 días de tratamiento la expresión de este gen disminuyó 40 y 60% en las células tratadas con MDI respecto al su control negativo ( $P= 0.006$  y  $P= 0.001$  respectivamente). Mientras que no se observaron cambios significativos en la expresión de  *$\alpha$ -sma* en las células tratadas durante 3 y 7 días con 1% ó 5% de colágena-PVP (figuras 14A y 15). Esto mostró que sólo hubo cambios significativos de la reversión en el control positivo (células tratadas con MDI).

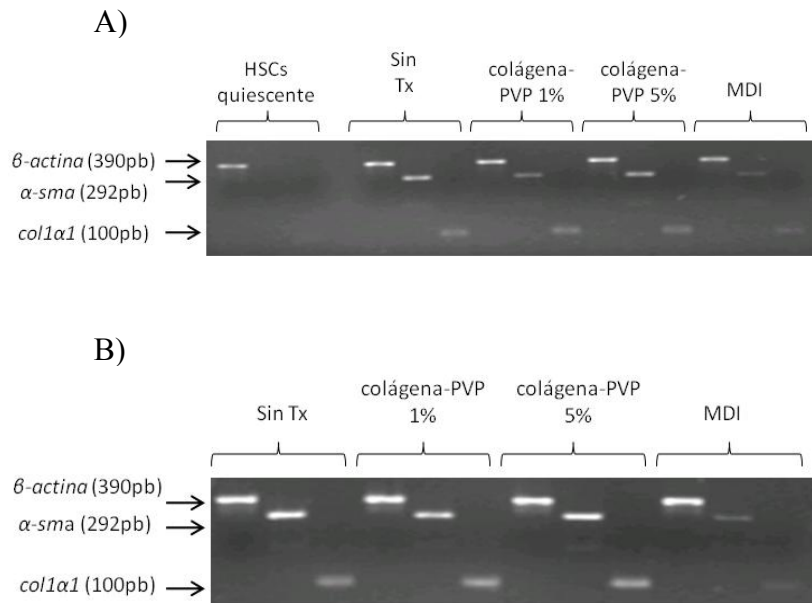


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa. A) productos de PCR de  $\alpha$ -sma, *colla1* y  $\beta$ -actina, después de 3 días de tratamiento a las HCS activadas. B) después de 7 días de tratamiento.

En cuanto a la expresión de *colla1*, se observó que disminuyó en el control positivo de la reversión, tanto a 3 y 7 días de tratamiento en un 35% y 57% con respecto al control negativo ( $P=0.003$  y  $P=0.008$  respectivamente). En las HSC tratadas durante 3 días con colágena-PVP al 1 o 5% no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de este gen respecto al control negativo. Después de 7 días de tratamiento con el biofármaco al 1% tampoco se encontró un cambio en la expresión; sin embargo, en las células tratadas con colágena-PVP al 5% se observó un incremento de aproximadamente 20% en la expresión *colla1*; dicho incremento fue estadísticamente significativo respecto al control negativo de la reversión ( $P = 0.008$ ) (figuras 14B y 16).



Expresión de mRNA de  $\alpha$ -SMA en HSC después de 3 y 7 días de tratamiento posteriores a su activación.

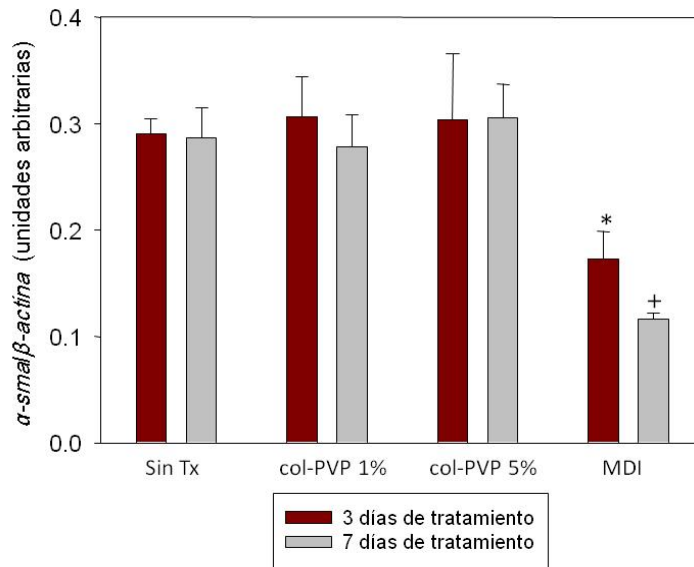


Figura 15. Expresión de  $\alpha$ -sma en HCS después de 3 y 7 días de tratamiento posteriores a su activación. Las barras representan el valor de la media de los triplicados  $\pm$  desviación estándar (n=3). \*P=0.006 MDI 3 días vs Sin Tx 3 días, +P=0.001 MDI 7 días vs Sin Tx 7 días.

Expresión de mRNA de  $col1\alpha1$  en HSC después de 3 y 7 días de tratamiento posteriores a su activación.

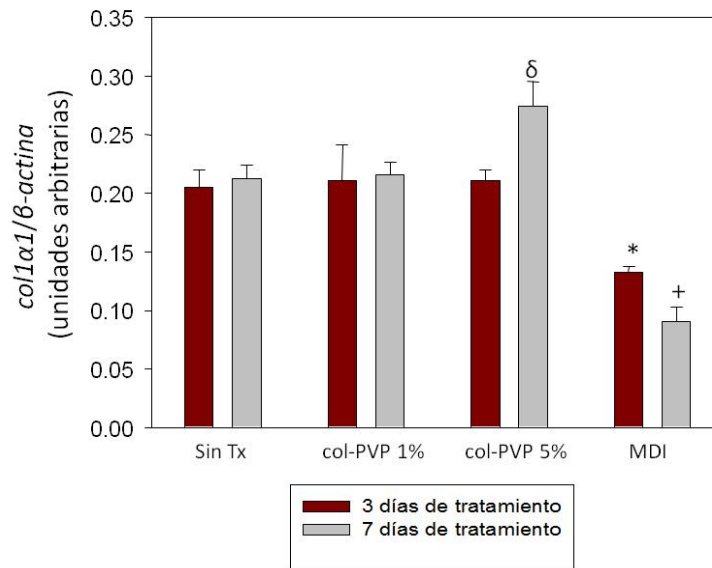


Figura 16. Expresión  $col1\alpha1$  en HCS después de 3 y 7 días de tratamiento posteriores a su activación. Las barras representan el valor de la media de los triplicados  $\pm$  desviación estándar (n=3). \*P=0.012 MDI 3 días vs Sin Tx 3 días, +P=0.003 MDI 7 días vs Sin Tx 7 días,  $\delta$ =0.001 colágena-PVP 5% 7 días vs Sin Tx 7 días.

#### IX.4 Efecto de la colágena-PVP en la proliferación de las HSC activadas.

El efecto del biofármaco sobre la proliferación celular se evaluó con un método colorimétrico, detectando la incorporación de la base análoga de pirimidina BrdU en el DNA de las HSC activadas. El análisis de la variación entre las medias (ANOVA) de cada tratamiento mostró que estas fueron estadísticamente significativas ( $p= 0.009$   $\alpha=0.05$ ). El análisis a posteriori con la prueba estadística de comparación múltiple contra el control (Holm Sidalk) indicó que la diferencia de las medias entre el grupo sin tratamiento (control negativo) y los tratamientos colágena-PVP 1% y MDI (control positivo) fueron estadísticamente significativas ( $p= 0.002$  y  $0.012$  respectivamente), pero no hubo una diferencia significativa entre el grupo control y colágena-PVP 5% ( $p=0.118$ ), es decir, la aplicación de colágena-PVP al 1% y la mezcla MDI reducen la proliferación de las HSC activadas, en una proporción de 15 y 11% respectivamente comparados con el control sin tratamiento (figura 17).

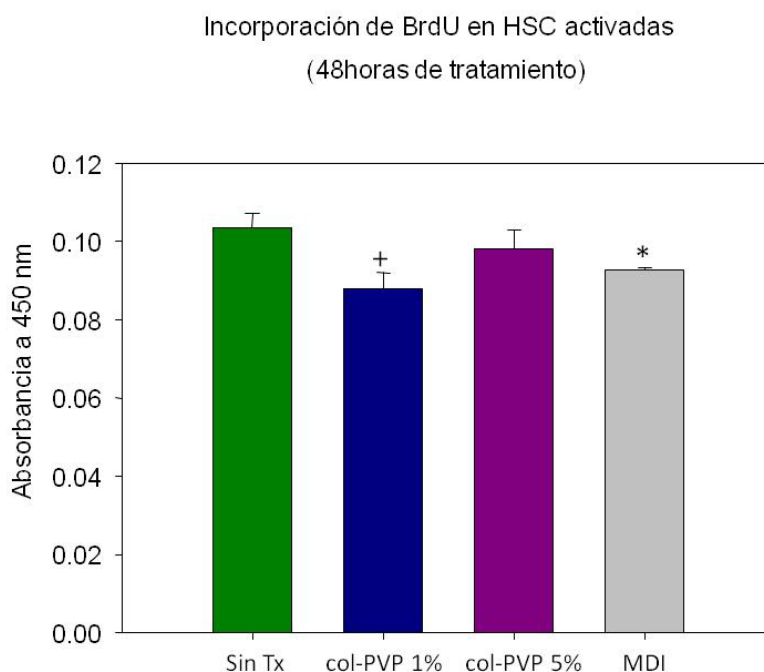


Figura 17. Evaluación del efecto de la colágena-PVP en la proliferación celular por incorporación de BrdU. +  $P=0.002$  colágena-PVP al 1% vs Sin Tx, \*  $P=0.012$  MDI vs Sin Tx.  $n=3$

## **X. Discusión.**

En la fibrosis hepática las HSC son las principales sintetizadoras de MEC. En el hígado sano, estas células permanecen en un estado quiescente, pero después de un daño constante se transdiferencian hacia miofibroblastos, expresando la proteína  $\alpha$ -SMA e inician la excesiva síntesis de MEC, principalmente colágena I, esta característica de las HSC las ha ubicado como blanco terapéutico contra la fibrosis hepática.

La colagéna-PVP es un biofármaco que ha sido probado en la resolución de diferentes formas de fibrosis incluyendo la inducida por CCl<sub>4</sub>, donde se observó la disminución en el daño hepático (57 y manuscrito en preparación), por lo que en el presente trabajo se investigó si el efecto favorable del biofármaco en la resolución de la fibrosis hepática inducida en ratas, estaba directamente relacionado con la reversión al estado quiescente de las HSC.

Para demostrar la inocuidad del compuesto en este modelo celular se probaron dos concentraciones experimentales de la colagéna-PVP (1 y 5%) en cultivos de HSC activadas, lo cual se evaluó por el método de reducción de MTT; encontrándose que el biofármaco no fue tóxico para las células. Aunque esto ya se había estudiado para otros tipos celulares como fibroblastos (45) y hepatocitos (manuscrito en preparación), en los que no se observó daño alguno, su efecto sobre el metabolismo celular en las HSC no había sido evaluado.

Las HSC activadas se caracterizan por que expresan las proteínas  $\alpha$ -SMA y colágena I, mientras que las quiescentes no las expresan, así que dichas proteínas son dos marcadores utilizados para validar el estado activado de las HSC (47). En el presente trabajo, se detectaron estas proteínas por inmunocitoquímica en HSC activadas y tratadas durante 3 o 7 días de cultivo con colagéna-PVP al 1 y 5%; encontrándose que el biofármaco no tuvo efecto en la reversión al estado quiescente de las HSC. Esta observación se apoya en el análisis de la expresión de  *$\alpha$ -sma* y *coll1a1*, ya que se encontró que a tres días de cultivo los niveles de los mRNA permanecieron constantes. Más aún, el nivel de expresión de *coll1a1*

aumentó después de 7 días de cultivo en el tratamiento con colágena PVP al 5%. El aumento en la expresión de esta proteína también se ha observado en cultivos de fibroblastos cultivados con colágena-PVP pero a concentración del 2% (46).

Las propiedades de la colágena cambian al entrecruzarse con el polímero PVP, al agregarse en el medio de cultivo (pH neutro y 37°C de temperatura) no forman geles como sucede con la colágena, sino que queda disuelta en el medio (46). Estas moléculas solubles a concentración de 5%, probablemente estén activando receptores de la MEC (colágena I) en la superficie de la célula que no está en contacto con el sustrato de cultivo (fondo de la caja de petri), activando cascadas de señalización que llevan al aumento en la expresión de colágena a nivel de mRNA.

La estructura y composición de la MEC tiene gran influencia en procesos celulares como son la diferenciación, proliferación o apoptosis (48, 49 y 50), incluso fragmentos solubles originados por la remodelación de la MEC pueden activar cascadas de señalización celular. Garamszegi et al. (51) demostraron que la colágena soluble a través de su interacción con las integrinas  $\alpha_2\beta_1$  es capaz de activar al receptor de TGF $\beta$  en ausencia de su ligando (52). El TGF $\beta$  es una de las principales citocinas que promueven la activación de las HSC y la expresión de esta citocina se ha encontrado disminuida en células tratadas con colágena-PVP (40). Por lo tanto, quizá el incremento de la procolágena  $\alpha_1(I)$  observado en las células tratadas con colágena-PVP al 5% se deba a la activación de los receptores para TGF $\beta$ , causada por la interacción de integrinas y la colágena-PVP; sin embargo, evaluado por la técnica de inmunofluorescencia, se ha descartado la interacción del biofármaco con integrinas  $\alpha_2\beta_1$  en cultivos tridimensionales de fibroblastos (52); falta estudiar la interacción con las integrinas  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_6\beta_1$  expresadas por HSC activadas (56). Otros receptores poco estudiados para la colágena son los llamados DDR (por sus siglas en inglés, Discoidin Domine Reseptors), que son una familia de receptores (DDR1 y DDR2) con actividad de cinasa de tirosina (RTKs) (53, 54 y 55). Se ha observado que el DDR2 se expresa en HSC activadas y que al interactuar con la colágena I incrementan su expresión (56). Con base en estas observaciones, cabe la posibilidad de que la colágena-PVP al 5% aplicada durante 7 días podría unirse al receptor DDR2 en los cultivos de HSC y provocar el aumento de la

expresión de *colla1*, pero aún no se han realizado las pruebas necesarias para comprobar esta posibilidad.

Una característica clave en la reversión al estado quiescente y además necesaria para la resolución de la fibrosis es la disminución de la proliferación de las HSC (35). En este trabajo se evaluó la proliferación de las células por el método de la incorporación de BrdU en cultivos de HSC activadas, encontrándose que a la concentración de 1% la colágena-PVP disminuye la proliferación de estas células. Se descartó la posibilidad de que la disminución en la incorporación de BrdU observada se haya debido a efectos citotóxicos del biofármaco, pues como se observó en los experimentos de reducción metabólica del MTT, la colágena-PVP no dañó a las HSC.

A pesar de que no se observó un efecto directo de la colágena-PVP en la reversión al estado quiescente de las HSC activadas, probablemente el resultado previamente observado en la disminución de la fibrosis hepática en ratas puede deberse, en parte, a su efecto en la disminución de la proliferación celular de las HSC; además el efecto de la colágena-PVP en el modelo *in vivo* puede ser más complejo y quizá estén involucradas otras células hepáticas. Por ejemplo, se ha observado que la recuperación de las fenestras de las células endoteliales sinusoidales en el tejido fibroso es suficiente para la disminución de la fibrosis (58). Así, es probable que aunque las HSC son las principales sintetizadoras de MEC, el compuesto actúe, de maneras aún no exploradas, sobre las otras estirpes celulares presentes en el hígado, como los hepatocitos, células de Kupffer o células endoteliales y esta interacción lleve, de una manera dinámica y cooperativa, a la disminución de la fibrosis en el hígado.

## **XI. Conclusión.**

La colágena-PVP no tiene un efecto directo en la reversión al estado quiescente de las HSC, este biofármaco no afecta metabólicamente a las HSC en cultivo, pero disminuye su proliferación.

## XII. Referencias.

1. A. Guyton y J. Hall. 2001. Tratado de fisiología médica. Decimo primera edición. Ed. Mac Graw Hill.
2. F. Nelson. 2002. Regeneration of liver. Encyclopedia of life sciences. Ed. John Willey and Sons.
3. M.C. García de León. 2005. Biología Molecular y Bioquímica de Metaloproteasas de matriz extracelular y sus inhibidores en hígado de rata normal y Cirrótico. Tesis de doctorado. Doctorado en ciencias biomédicas. Facultad de Medicina, UNAM.
4. S.L. Friedman, F.J. Roll y M.D. Bissell. 1985. Hepatic lipocytes: the principal collagen producing cells of normal rat liver. *Natl Acad Sci USA*. 82:8681-8685.
5. A. Geerts, R. Vrijssen y J. Rauterberg. 1989. In vitro differentiation of fat-storing cells parallels market increase in collagen synthesis and secretion. *J Hepatol*. 9:59-68
6. M.D. Arenson, S.L. Friedman y M.D. Bissell. 1988. Formation of extracellular matrix in normal rat liver: lipocytes as a major source of proteoglycan. *Gastroenterology*. 95:441-447
7. M. J. Arthur. 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 279:G245–G249.
8. N. Fausto. 2000. Liver regeneration. *J Hepatol*. 32:19-31
9. S. L. Friedman. 2003. Liver fibrosis from bench to bedside. *J Hepatol*. 38:s38-s53.
10. H. Reynaert, M.G. Thompson, T. Thomas y A. Geerts. 2002. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 50:571-581.
11. S.L. Friedman. 2004. Mechanism of disease: mechanism of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol and hepatol*. 2:98-104
12. R. Bataller y D. A. Brenner. 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 115:209-218.
13. R. C. Benyon y J. P. Iredale. 2000. Is liver fibrosis reversible? *Gut*. 46:443-446
14. P. D. Geerts. 2001. History, heterogeneity, developmental, biology and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin liver Dis*. 21:311-335
15. K. Asahina, S. Y. Shirley, Peng Li, I. Manuro, R. E. Maxon, H. M. Sucov y H. Tsukamoto. 2009. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology*. 49:998-1011
16. T. Niki, M. Pekny, K. Hellemans, P. De Bleser, K. Van Den Berg, F. Vaeyens, E. Quartier, F. Schutt, A. Geerts. 1999. Class VI intermediate protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 29:520–527.
17. N. Trim, S. Morgan, M. Evans, R. Issa, D.R. Fine, S. A.ord, B. Wilkins, J.P. Iredale. 2001. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol*. 156:1235–1243
18. S. K. Meurer, L. Tihaa, B. Lahme, A.M. Gressner, R. Weiskirchen. 2005. Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem*. 280:3078–3087
19. C. Kordes, I. Sawitzka y A. Müller-Marbach. 2007. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 352:410-417

20. S. Harza, S. Xiong, J. Wang, R.A. Rippe, V. Krishna y K. Chatterjee. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells. *J Biol Chem.* 279:11392-11401
21. T. Knittel, et al. 1999. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 117: 1205-1221
22. D.C. Rockey, J.K. Boyles, G. Gabbiani y S.L. Friedman. 1992. Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and culture. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 24:193-203
23. R. Blomhoff, M.H. Green, T. Berg y K.R. Norum. 1990. Transport and storage of vitamin A. *Science.* 250:399-404.
24. R. Blomhoff y K. Weke. 1991. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J.* 5:272-277
25. R. K. Moreira. 2007. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pahtol Lab Med.* 131: 1728-1734
26. K. Ogawa, J.I. Suzuki. H. Mukai y M. Mori. 1986. Sequential changes of extracellular matrix and proliferation of Ito cells with enhanced expression of desmin and actin in local liver injury. *Am J Pathol.* 125:611-619.
27. Z. Kimiec. 2001. Cooperation of the liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 161: 1-151
28. A. M. Gressner, R. Weiskirchen, K. Breitkopf y S.Dooley. 2002. Roles of TGF- $\beta$  in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 7:d793-d807
29. M. Pinzani, L. Gesualdo, G.M. Sabbah y H.E. Abboud. 1989. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat storing cells. *J Clin Invest.* 84:1786-1793
30. F. Marra, M.C. Arrighi, M. Fazi, A. Caligiuri, M. Pinzani. 1999. Extracellular signals-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat. *Hepatology.* 30:951-958
31. K. Kanno, K. Tmazuma and K. Chayama. 2003. AT1A-deficient mice show less severe progression of liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>(4). *Biochem Biophys Res Commun.* 308:177-183
32. F. Marra, A.J. Valente, M. Pinzani y H.E. Abboud.1993. Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemotactic protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 92:1674-1680
33. R. Issa, X. Zhou, M.C. Constandinous, J. Fallowfield, H. Milward-Sadler, M.D. Gaca y J.P. Iredale. 2004. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology.* 126:1795-1808.
34. A. León-Buitimea, A. Leija-Salas, J. Reyes-Esparza, G. Garrido-Farina y L. Rodríguez-Fragoso. 2006. Tratamiento de la enfermedad hepática crónica inducida por VHC: bases moleculares y celulares. *Rev Biomed.* 17:195-211
35. R. Battaller y D.A. Brenner. 2001. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin liver dis.* 21:437-448
36. I. Shimizu, Yue-Rong Ma, Y. Mizobuchi, F.Liu, T. Miura, Y. Nakai, M. Yusada, M. Shiba, T. Horie, S. Amayaga, N. Kawada, H. Hori y S. Ito. 1999. Effects of Sho-saiko-to, a japanese herbal medicine on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology.* 29:150-160

37. J. I. Pérez-Carreón, et al. 2010. An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCl(4)-induced rat cirrhosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 42:287-296
38. H. She, S. Xiong, S. Hazra y H. Tsukamoto. 2005. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cell. *J Biol Chem.* 280:4959-4967
39. J. Chimal-Monroy, T. Bravo-Ruíz, G.J. Furusawa-Carballeda, J.M. Lira, J.C. De la Cruz, A. Almazán, F.E. Kröttsch-Gómez, G. Arrellin y L. Díaz de León. 1998. Collagen-PVP accelerates new bone formation of experimentally induced bone defects in rat skull and promotes the expression of osteopontin and SPARC during bone repair of rat femora fractures. *Ann NY Acad Sci.* 857:232-236.
40. F.E. Kröttsch-Gómez, J. Furuzawa-Carballeda, R. Reyes-Márquez, E. Quiroz-Hernández y L. Díaz de León. 1998. Cytokine expression is down regulated by collagen-polyvinylpirrolidone in hypertrophic scars. *J Invest Dermatol.* 111:828:834.
41. C.R. Cervantes-Sánchez, E. Olaya, M. Testas, N. García-López, G. Coste, G. Arrellin, A. Luna y F.E. Kröttsch. 2003. Collagen-PVP, a collagen synthesis modulator, decreases intraperitoneal adhesions. *J Surg Res.* 110:207-210.
42. J. Furuzawa-Carballeda, R. Rodríguez-Calderón, L. Díaz de León y J. Alcocer-Varela. 2002. Mediators of inflammation are down-regulated while apoptosis is up-regulated in rheumatoid arthritis synovial tissue by polymerized collagen. *Clin Exp Immunol.* 130:140-149.
43. J. Furuzawa-Carballeda, A.R. Cabral, M. Zapata-Zúñiga y J. Alcocer-Valera. 2003. Subcutaneous administration of polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. An open-label pilot trial. *J Rheumatol.* 30:256-259.
44. J.Chimal-Monroy, T. Bravo-Ruíz, F.E. Kröttsch-Gómez y L. Díaz de León. 1997. Implantes de fibroquel aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico. *Rev Biomed.* 8:81-88
45. I. Penilla. 2007. Efectos de la mezcla colágena-PVP (fibroquel) sobre la actividad metabólica y niveles de proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos cultivados: implicaciones para su utilización en procedimientos quirúrgicos periodontales. Tesis para la especialidad en periodoncia e implantología. Facultad de odontología. UNAM.
46. F.E. Kröttsch-Gómez. 1995. Efecto del fibroquel sobre el metabolismo de la colágena en cultivos celulares de fibroblastos y macrófagos de rata. Tesis de maestría. Unidad académica de los ciclos profesional y de posgrado, UNAM.
47. V. Ratzu y S.L. Friedman. 1997. Pathobiology of hepatic stellate cells. Capítulo 6 de *Functional hepatology of the liver tissue*. Editado por F. Vidal-Vanaclocha. Páginas 133-160
48. H.K. Kleinman, D. Philp y M.P. Hoffman. 2003. Role of extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 14:526-532
49. A. L. Berrier y K.M. Yamada. 2007. Cell matrix adhesion. *J Cell Physiol.* 213:565-573.
50. P. Godoy, J.G. Hengstler, I. Ilkavets, C. Meyer, A. Bachmann, A. Müller, G. Tuschl, E.O. Mueller y S. Dooley. 2009. Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming grow factor  $\beta$ -induced apoptosis. *Hepatology.* 49:2031-2043.



51. N. Garamszegi, S.P. Garamszegi, P. Samavarchi-Tehrani, E. Walford, M.M. Schneiderbauer, J.L. Wrana y S.P. Scully. 2010. Extracellular matrix-induced transforming growth factor- $\beta$  receptor signaling dynamics. *Oncogene* 29:2368-2380.
52. R. Pacheco. 2010. efectos de la colágena-PVP sobre la expresión de integrinas en cultivos tridimensionales de fibroblastos. Tesis de Maestría. Posgrado en ciencias biológicas. Facultad de medicina, UNAM.
53. E. Olaso, L. Wang, K. Ikeda, F.J. Eng, R. Klein, D. Lovett, H. Lin y S.L. Friedman. 2002. DDR2 regulates fibroblast proliferation and migration through extracellular matrix in association with transcriptional activation of MMP-2. *J Biol Chem.* 277:3606-3613.
54. G.M. Corine, L'hôte, H. Thomas y S. Ganesan. 2002. Functional analysis of discoidin domain receptor 1: effect of adhesion on DDR1 phosphorylation. *FASEB J.* 16:234-236.
55. B. Leitinger. 2003. Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptor, DDR1 and DDR2. *J Biol Chem.* 278:16761-16769.
56. E. Olaso, P. Labrador, L. Wang, K. Ikeda, F.J. Eng, R. Klein, D. Lovett, H. Lin y S.L. Friedman. 2001. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest.* 108:1369-1378.
57. Memorias. XXVIII Congreso Nacional de Bioquímica. Sociedad Mexicana de Bioquímica. 7-12 de Noviembre, 2010 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
58. D. L. DeLeve, X. Wang y Y. Guo. 2008. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cells activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology.* 48:920-930.
59. <http://sinais.salud.gob.mx>