



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Evaluación de la Expresión de Dos Marcadores Apoptóticos,  
en Hígados de Ratas con Fibrosis Hepática Tratadas con un  
Biofármaco Antifibrótico**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

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

**AYESHA PALACIOS MUÑIZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
BIÓL. SAÚL CANO COLÍN  
2017**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**



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.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero a Dios, que me ha dado la vida y sin quien no podría haber llegado hasta aquí. Agradezco especialmente a mi madre, por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, porque ha sido mi sostén y mi impulso siempre. A mi padre, por todos sus consejos prácticos para la vida académica, que me han sido valiosos desde el inicio de ésta.

Agradezco también a mis amigos: Ricardo Mejía Montiel, Ana Laura Oxté Reséndiz, Ximena Argaha Mariel, Andrés Méndez Solís, Gabriela Batún Alba (nos apoyamos mutuamente durante toda la carrera, y lo prometido es deuda), Ricardo Alcántara Juárez, Luigi Zenteno, Víctor Josué Muñiz (mi hermano y amigo), Miryam Palacios (mi hermana, antes que mi amiga), Ixhel Yoali Hernández Jiménez, Raymundo Barrios y la comunidad de Escuela de Pastoral, Centro “Nuestra Señora de la Esperanza”.

Agradezco particularmente al Cand. a Doc., Saúl Cano Colín, por toda su paciencia conmigo, sus consejos, sus enseñanzas, y el tiempo que me dedicó durante todo el desarrollo de este trabajo. Te admiro por todo lo que me enseñaste y que me hizo mejor bióloga, maestra e investigadora. Gracias por tu amistad. También agradezco a la Genetista Martha Orozco Quiyono, por todos los insumos que me facilitó para poder concluir este trabajo, por las horas de risas y alegría, y todos los momentos agradables que pasamos juntas. Así como a la M.C.H. Beatriz J. Zenteno Manzano.

Gracias especialmente a todos los miembros del Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación, por el apoyo y espacio que me brindaron. Especialmente al Dr. Edgar Kröttsch Gómez, jefe del citado laboratorio y a la Biól. Gabriela Espinoza, por su ayuda en varias etapas del proceso final.

Reconozco definitivamente, el esfuerzo de todos los profesores de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, que fueron clave en mi formación como Bióloga y como persona, y a quienes recuerdo con gran cariño, especialmente a la M en C. Georgina Nieto Castañeda, Dra. María de los Ángeles Aguilar, Dra. María Ana Fernández Álamo, Dr. Abraham Kobelkowsky, Dra. Patricia Rivas Manzano, Dr. Jorge Antonio García. Así como del personal administrativo de la Facultad, que siempre tuvo un trato amable conmigo.

¡¡México!! ¡¡Pumas!! ¡¡Universidad!! ¡¡Gooya!! ¡¡Gooya!!

Cachún, cachún ra-ra, cachún, cachún ra-ra. ¡¡Gooya!! ¡¡Universidad!!

**Espero en silencio delante de Dios, porque de Él proviene mi victoria.**

*Sal 62, 1*

**Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente, no temas ni desmayes,  
Porque el Señor tu Dios estará contigo a donde quiera que vayas.**

*Jos 1, 9*

**Sabemos, además, que todo contribuye al bien de los que aman a Dios, de los que Él ha llamado según sus planes. Dios, que nos ama, hará que salgamos victoriosos de todas estas pruebas.**

*Rom 8, 28.37*

# ÍNDICE

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>4</b>
<b>Citas</b> .....	<b>5</b>
<b>Significado de las siglas empleadas</b> .....	<b>8</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>10</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>11</b>
El hígado.....	12
Microanatomía.....	13
Fibrosis hepática.....	17
Mecanismo celular de la fibrosis hepática.....	18
Cirrosis hepática y su incidencia en México.....	22
<b>Células Estelares Hepáticas (HSC), Apoptosis y Fibrosis hepática</b>	
Células Estelares Hepáticas (HSC).....	23
Apoptosis.....	27
Mecanismos de regulación de la apoptosis.....	30
Proteínas apoptóticas.....	34
Familia Bcl-2.....	35
<b>Tratamientos terapéuticos existentes a la fecha para tratar distintas patologías fibrosantes</b> .....	<b>36</b>
Tipos de tratamientos existentes contra la fibrosis hepática.....	37
Colágena-Polivinilpirrolidona (Fibroquel <sup>MR</sup> ).....	39
<b>Antecedentes de la presente investigación</b> .....	<b>41</b>

<b>Hipótesis de trabajo.....</b>	<b>43</b>
<b>Objetivos</b>	
Objetivo general .....	43
Objetivos particulares.....	43
<b>Diseño experimental</b>	
Materiales y métodos.....	44
<b>Resultados.....</b>	<b>47</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>53</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>59</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>63</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>68</b>

## SIGNIFICADO DE LAS SIGLAS EMPLEADAS

SIGLAS	INGLÉS	ESPAÑOL
<b><math>\alpha</math>SMA</b>	Smooth muscle actin $\alpha$	$\alpha$ actina de músculo liso
<b>AIF</b>	Apoptosis inducing factor	Factor inductor de apoptosis
<b>Apaf-1</b>	Apoptosis protease-activating factor-1	Factor 1 activador de proteasas de apoptosis
<b>ASH</b>	Alcoholic steatohepatitis	Esteatohepatitis no alcohólica
<b>CCl4</b>	Carbon tetrachloride	Tetracloruro de Carbono
<b>Col-PVP</b>	Collagen Polivinylypyrrolidone	Colágena-polivinilpirrolidona
<b>DMN</b>	Dimethylnitrosamine	Dimetil nitrosamina
<b>DNA</b>	Dinucleotid adenosin	Dinucleótido de adenosina
<b>DD</b>	Death domain	Dominio de muerte
<b>DR</b>	Death receptor	Receptor de muerte
<b>ELAM</b>	Endothelial leucocyte adhesion molecule	Moléculas de adhesión endotelial de leucocitos
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>ET1</b>	Endothelin-1	Endotelina 1
<b>FADD</b>	Fas-associated protein with death domain	Dominio de muerte asociado a Fas.
<b>FXR</b>	Farnesoid X-Receptor	Receptor X de farnesoide
<b>GFAP</b>	Glial fibrillar associated protein	Proteína asociada a la glía fibrilar
<b>HBV</b>	Hepatitis B virus	Virus de la hepatitis B
<b>HCV</b>	Hepatitis C virus	Virus de la hepatitis C
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor	Factor de crecimiento de los hepatocitos.
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>HSC</b>	Hepatic Stellate Cells	Células estelares hepáticas
<b>ICAM</b>	Intercellular adhesion molecule-1	Molécula 1 de adhesión intercelular
<b>MEC</b>	ECM (Extracellular Matrix)	Matriz extracelular
<b>MMP</b>	Matrix metalloproteinase	Metaloproteinasas de matriz
<b>NADP(H)</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)
<b>NAFLD</b>	Non-alcoholic fat liver disease	Enfermedad de hígado graso no-alcohólico
<b>NASH</b>	Non-alcoholic steatohepatitis	Esteatohepatitis no alcohólica
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
<b>NGF</b>	Nerve growth factor	Factor de crecimiento nervioso
<b>NGFR-p75</b>	Nerve growth factor receptor p75	Receptor del factor de crecimiento nervioso p75
<b>NK</b>	Natural killers	[Células] Asesinas naturales
<b>NO</b>	Nitric oxide	Óxido nítrico
<b>PDGF</b>	Platelet derived growth factor	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PTPC</b>	Pore transition permeability complex	Complejo del poro de transición de la permeabilidad
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
<b>SOD</b>	Superoxide dismutase	Super óxido dismutasa
<b>PS</b>	Phosphatidylserine	Fosfatidilserina
<b>RIP (1, 3)</b>	Receptor Interacting Protein (kinase)	Proteína cinasa receptora interactuante
<b>ROS</b>	Reactive oxigen species	Especies reactivas de Oxígeno
<b>SHP</b>	Small heterodimer partner	Compañero pequeño del heterodímero
<b>siRNA</b>	Small interference ribonucleotid acid	Pequeño ácido ribonucléico de interferencia.
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>TIMP</b>	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase	Inhibidor tisular de las Metaloproteinasas de matriz
<b>TLR9</b>	Toll-like receptor 9	Receptor tipo "toll" 9
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor	Factor de necrosis tumoral

<b>TRADD</b>	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain	Receptor de TNF tipo 1 asociado al dominio de "muerte".
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis-inducing ligand	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling	Nombramiento y marcado con dUTP de transferasa terminal deoxinucleotídica
<b>uPA</b>	Urocinase-like plasminogen activator	Activador tipo plasminógeno de la urocinasa
<b>VCAM</b>	Vascular cell adhesion molecule	Molécula de adhesión celular vascular
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor	Factor de crecimiento vascular endotelial.



# **Evaluación de la expresión de dos marcadores apoptóticos en hígados de ratas con fibrosis hepática, tratadas con un biofármaco antifibrótico**

## **RESUMEN**

En México, durante 2014, la Cirrosis Hepática fue motivo de 28,732 decesos, quedando en el cuarto lugar como causa de muerte lo cual indica que las enfermedades crónicas del hígado son un problema de salud pública.

Cuando se presenta un daño agudo al hígado, es posible la regeneración del mismo, pero si el daño es crónico, el tejido hepático se inflama y los hepatocitos entran en *apoptosis constante*, la cual estimula la activación de las células productoras de colágena que generan una gran cantidad de Matriz Extracelular (MEC), que se acumula y provoca la destrucción de la arquitectura normal del hígado impidiendo su funcionamiento adecuado. Debido a esto, se han desarrollado varios tratamientos terapéuticos dirigidos a diversos blancos involucrados en el proceso fibrogénico.

En varios estudios preclínicos y clínicos, se ha mostrado que el biofármaco compuesto por colágena y polivinilpirrolidona (Col-PVP), tiene propiedades antifibróticas, fibrolíticas e inmunomoduladoras de procesos fibrogénicos, mediante la regulación de la expresión de algunas citocinas fibrogénicas y proinflamatorias, como: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y PDGF. En estudios *in-vitro*, se ha demostrado que debido a la acción de la Col-PVP, se modula el recambio de la MEC y se modulan negativamente las citocinas antes mencionadas. En un modelo murino de fibrosis hepática se encontraron, evidencias serológicas (niveles de enzimas hepáticas) e histopatológicas (según el índice de Knodell) de la resolución de la fibrosis. En otro estudio, llevado a cabo en cultivos de HSC activadas (miofibroblastos) al ser tratadas con el fármaco, se encontró una disminución en los índices proliferativos de estas células. Tomando en cuenta estos datos y los provenientes de la literatura revisada, la premisa principal del presente trabajo es que los

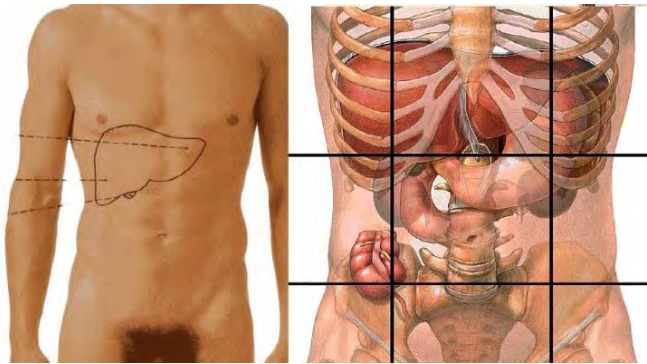
miofibroblastos presentes en los hígados de las ratas que reciben el tratamiento con Col-PVP, entrarán en apoptosis, y por lo tanto se detectarán algunas proteínas indicadoras de este proceso, como Bax y Bad (proapoptóticas) en niveles elevados, y Bcl-2 (antiapoptótica), en niveles bajos.

Después de la detección de algunas de las proteínas mencionadas en el párrafo anterior mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y *western blot*, durante el desarrollo de la presente investigación, no se pudieron encontrar suficientes pruebas de la presencia de proteínas apoptóticas en las muestras utilizadas, sin embargo, en estudios previos (los cuales son mencionados en el apartado de “Discusión” de la presente investigación) se encontró que *in vitro*, las HSC sí disminuyen su proliferación; contrastando los resultados de ambos estudios, se concluyó que se necesita un análisis más amplio y profundo, posiblemente incluyendo más proteínas diferentes, para descubrir cómo la Col-PVP afecta a las HSC y al ambiente hepático fibrosado.

## INTRODUCCIÓN

### El hígado

El hígado es un órgano con múltiples funciones metabólicas, actuando además como glándula, de las cuales es la más grande de todo el cuerpo humano. Pesa aproximadamente 1500 g y se ubica en el cuadrante superior derecho del abdomen (hipocondrio derecho), aunque se extiende un poco hacia la izquierda, por debajo del diafragma, protegido por la parrilla costal (**figura 1**).



**Figura 1:** Localización del hígado por detrás de las costillas y debajo del diafragma. (Tomado y modificado de <http://es.slideshare.net/anmapa09/anatomia-higado-pancreas-bazo-y-vias-biliares>)

Está cubierto por una delgada cápsula de tejido conectivo fibroso (cápsula de Glisson) que penetra el parénquima y lo divide en lóbulos y lobulillos; una cubierta serosa (peritoneo visceral) rodea la cápsula excepto donde se adhiere al diafragma y a otros órganos. Está irrigado por la arteria hepática y recibe sangre venosa proveniente del tubo digestivo, páncreas y bazo a través de la vena porta. De esta manera, se encuentra en el camino de los vasos sanguíneos que transportan las sustancias absorbidas en el tubo digestivo. Esta posición permite al hígado metabolizar dichas sustancias y lo convierte en el primer órgano expuesto a los compuestos tóxicos ingeridos. El hígado participa en el mantenimiento de la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo en un intervalo altamente regulado, en el metabolismo de lípidos y además capta varias vitaminas y las almacena, permaneciendo inalteradas o siendo transformadas por modificaciones bioquímicas; tales vitaminas son A (retinol), B, D (colecalfiferol) y K

(menaquinona). Sintetiza casi todas las proteínas que intervienen en el transporte y metabolismo del hierro. Sintetiza también sales biliares, protrombina, fibrinógeno, albúminas plasmáticas, lipoproteínas (LDL y HDL) y globulinas no inmunes  $\alpha$  y  $\beta$ , liberándolas en el torrente sanguíneo; tiene la capacidad de degradar sustancias tóxicas tanto orgánicas como inorgánicas, pero si éstas sobrepasan su capacidad desintoxicante, los compuestos tóxicos lesionarán al órgano (Estrada y Uribe, 2002; Ross y Pawlina, 2008).

### **Microanatomía**

Según Ross (2008) y Kanel (2011), entre los componentes estructurales del hígado se encuentran los siguientes:

- ✿ **Parénquima**, que consiste en trabéculas de hepatocitos bien organizadas que en el adulto normalmente tienen una sola célula de espesor y están separadas por capilares sinusoidales.
- ✿ **Estroma de tejido conjuntivo** que se continúa con la cápsula de Glisson. En el estroma conjuntivo hay vasos sanguíneos, nervios, vasos linfáticos y conductos biliares. En el estroma están presentes cinco tipos básicos de colágeno, siendo la I y la III, los más representativos (95%), aunque también hay laminina, fibronectina y elastina.
- ✿ **Capilares sinusoidales o sinusoides**, que son los vasos que hay entre las trabéculas hepatocíticas, están delineados por células endoteliales, de Kupffer, Estelares Hepáticas (HSC) y células de Pit (linfocitos T distribuidos en los sinusoides).
- ✿ **Espacios perisinusoidales (o de Disse)**, que están situados entre el endotelio sinusoidal y los hepatocitos.

Hay tres maneras clásicas de describir la estructura del hígado en términos de unidad funcional: el *lobulillo clásico*, el *lobulillo portal* y el *acino hepático*. Estas tres maneras se pueden observar en la siguiente figura (**Figura 2**):



**Figura 2:** Diagramas de la comparación entre el lobulillo clásico, el lobulillo portal y el acino hepático. (Ross, 2008)

En la siguiente tabla (**Tabla 1**), se comparan las maneras de describir la estructura del hígado (datos tomados de Ross, 2008):

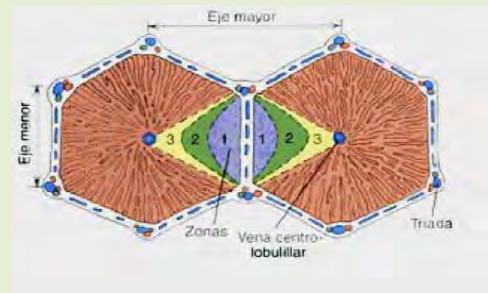
**Tabla 1: comparación de las diferentes maneras de describir la estructura hepática**

LOBULILLO CLÁSICO	LOBULILLO PORTAL	ACINO HEPÁTICO
Se ve en los cortes histológicos como una masa de tejido más o menos hexagonal.	Pone de relieve las funciones exócrinas del hígado.	Provee la mejor concordancia entre perfusión sanguínea, actividad metabólica y patología hepática.
Tiene su fundamento en la distribución de de las ramas de la vena porta y de la arteria hepática dentro del órgano y en el trayecto que sigue la sangre proveniente de ellas al irrigar finalmente los hepatocitos.	El eje morfológico de esta estructura es el conducto biliar interlobulillar de la triada portal del “lobulillo clásico”, dado que la principal función del hígado es la secreción de bilis.	Tiene forma romboidal y es la unidad funcional más pequeña del parénquima hepático. En una vista bidimensional, ocupa partes de dos lobulillos clásicos contiguos.
Consiste en pilas de trabéculas hepatocíticas anastomosadas,	Sus bordes externos son líneas imaginarias trazadas	Según su forma, el eje menor del acino está definido por las ramas terminales de la tríada

<p>de una célula de espesor, separadas por el sistema interconectado de sinusoides que irriga las células con una mezcla de sangre venosa y arterial. En el centro de cada lobulillo hay una vena central o centrolobulillar (vénula hepática central o centrolobulillar), en la cual desembocan los sinusoides. Las trabéculas de hepatocitos, al igual que los sinusoides, adoptan una disposición radial desde la vena central hacia la periferia. En los ángulos del hexágono están los <b>espacios portales</b> o <b>espacios de Kiernan</b>, que consisten en un tejido conjuntivo laxo estromal caracterizado por la presencia de las triadas portales; este tejido conjuntivo se continúa con la cápsula de Glisson. El espacio portal está limitado por los hepatocitos más periféricos del lobulillo.</p>	<p>entre las tres venas centrolobulillares más cercanas a esa triada portal (cada triada está compuesta por una vena porta, una arteria hepática y un conducto biliar). Estas líneas definen un bloque de tejido más o menos triangular que incluye aquellas porciones de los tres lobulillos clásicos que secretan la bilis que drena en su conducto biliar axial. Este concepto permite una descripción de la estructura parenquimatosa hepática comparable con la de otras glándulas exócrinas.</p>	<p>portal, que siguen el límite entre dos lobulillos clásicos. El eje mayor es una línea perpendicular trazada entre las dos venas centrolobulillares más cercanas al eje menor. Este concepto permite una descripción de la función secretora exócrina del hígado comparable con la del lobulillo portal. Los hepatocitos de cada acino se describen dispuestos en tres zonas elípticas concéntricas que rodean al eje menor (<b>Figura 3</b>):</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Zona 1:</b> la más cercana al eje menor y a la irrigación provenientes de las ramas penetrantes de la vena porta y de la arteria hepática. Corresponde a la periferia de los lobulillos clásicos.</li> <li>2. <b>Zona 3:</b> es la que está más lejos del eje menor y más cerca de la vena centrolobulillar (vénula hepática terminal o postsinusoidal). Esta zona corresponde al centro del lobulillo clásico cuyos hepatocitos rodean la vena centrolobulillar.</li> <li>3. <b>Zona 2:</b> está entre las zonas 1 y 3, pero no tiene límites nítidos.</li> </ol> <p>La división en zonas es importante en la descripción e interpretación de los modelos de degeneración, regeneración y efectos tóxicos específicos del parénquima hepático en relación</p>
---	--	--

En los bordes del espacio portal entre el estroma de tejido conjuntivo y los hepatocitos, hay un intersticio llamado **espacio de Mall**, donde se cree que se origina la linfa en el hígado.

con el grado o la calidad de la perfusión vascular de los hepatocitos.



**Figura 3:** Acino hepático. Interpretación funcional de la estructura del hígado.

Las vías biliares están formadas por un sistema de conductos por los que fluye la bilis recién sintetizada desde los hepatocitos hacia la vesícula biliar y de ahí hacia el intestino. Las ramas más pequeñas del sistema son los canalículos biliares hacia los cuales los hepatocitos secretan la bilis. Los canalículos biliares forman un anillo completo alrededor de las cuatro caras de los hepatocitos hexagonales (ideales). El diámetro de su luz es de más o menos  $0.5 \mu\text{m}$  y están aislados del resto del compartimiento intercelular por uniones estrechas (*zonulae occludentes*) que forman parte de los complejos de unión que también comprenden uniones adherentes y desmosomas. Cerca del espacio portal, pero todavía dentro del lobulillo los canalículos biliares se reúnen para formar los **conductillos biliares, conlangiolo** o **conductos de Hering**, que son cortos y están revestidos por células cúbicas diferentes de los hepatocitos pero derivadas de estos. El epitelio de los conlangiolo se apoya en una lámina basal completa. La reconstrucción tridimensional reciente de las reacciones conlangiolares en la necrosis hepática indica que las células epiteliales que forman los conductos de Hering proliferan profusamente y migran hacia el parénquima hepático. En consecuencia, se ha esgrimido que el conducto de Hering está compuesto por células troncales hepáticas (*hepatic stem cells*) específicas o las alberga (Ross, 2008).

## **Fibrosis hepática**

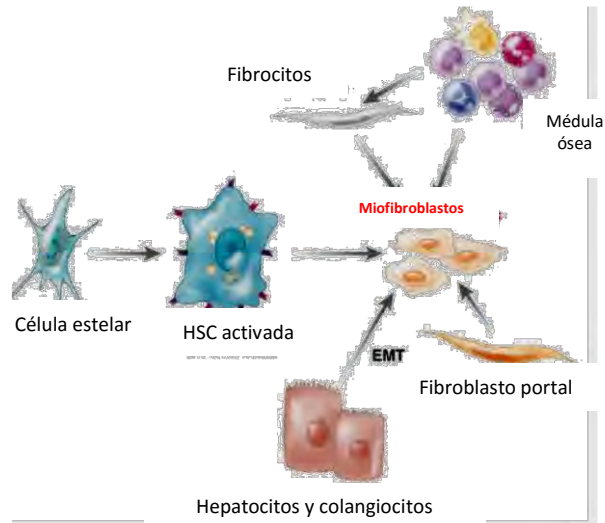
La fibrosis hepática es el proceso reversible (hasta cierta etapa) (Choi, *et al.* 2015) que resulta de la reparación del daño crónico al hígado (Jingjing, 2009); este proceso se caracteriza por inflamación y excesiva cicatrización (Beljaars, 2006) debidas a la acumulación de proteínas de Matriz Extracelular (MEC) que distorsionan la arquitectura hepática creando una cicatriz fibrosa, y dificultando las funciones normales del hígado (Beljaars *et al.* en Ali *et al.*, 2005); la cicatriz fibrosa degenera en nódulos de hepatocitos en regeneración (llamados *nódulos de regeneración*), proceso que ya es indicador de cirrosis (Anand, 1999; Benítez, 2003; Bataller y Brenner, 2005). A pesar de que la fibrosis provoca daño al paciente, se ha llegado a considerar como un mecanismo evolutivamente conservado de reparación del daño al tejido (Louka y Ramzy, 2015).

Después de un daño agudo al hígado, las células parenquimatosas regeneran y sustituyen las células dañadas, pero si el daño persiste (enfermedad crónica) debido a infecciones (por ejemplo, por Hepatitis C en conjunto con VIH), Esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica (ASH y NASH), medicamentos, desórdenes metabólicos, o enfermedades inmunitarias, la regeneración hepática falla porque los hepatocitos pierden la capacidad de compensación y recuperación (Crawford, 2002; Friedman, 2008), siendo sustituidos por abundante MEC, que incluye colágena tipo I fibrilar (Col I), a la cual, en estados avanzados, se agregan otras proteínas como colágenas III y IV, fibronectina, undulina, elastina, laminina, hialuronano, y proteoglicanos. La acumulación de MEC resulta tanto del incremento de su síntesis como de la disminución en su degradación. En el tejido sano las proteínas degradadoras de la MEC, o Metaloproteinasas de Matriz (MMP) son inhibidas por los Inhibidores Tisulares de las Metaloproteinasas (TIMP), pero durante el proceso fibrosante, los TIMP son sobreexpresados, por lo cual inhiben a las MMP y no hay degradación de MEC. La fibrosis hepática avanzada resulta en cirrosis o cancer, falla hepática e hipertensión portal, por lo cual siempre requiere de transplante de hígado como único tratamiento terapéutico seguro, porque a la fecha es progresiva, incurable y mortal (Bataller y Brenner, 2005).



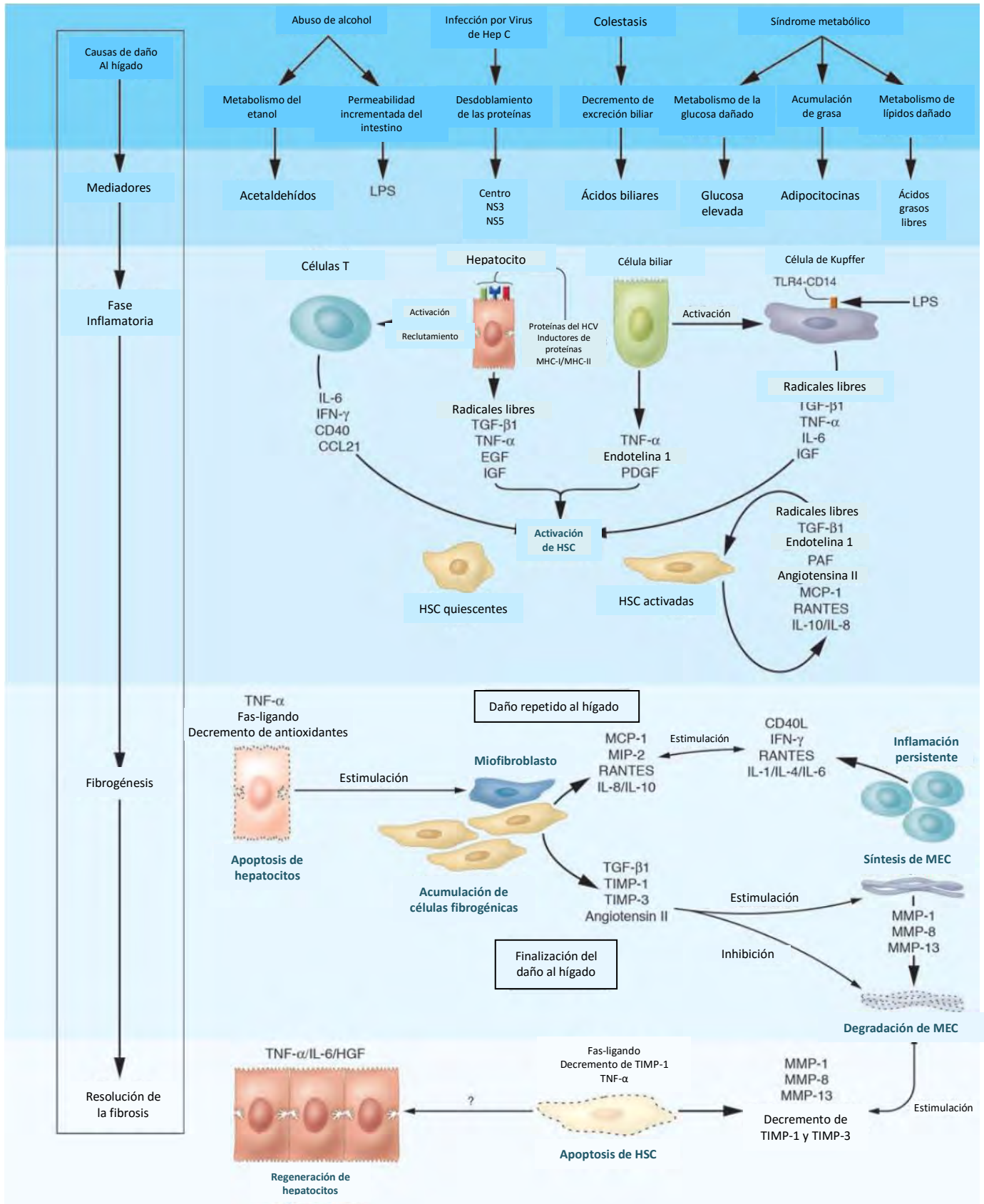
### *Mecanismo celular de la fibrosis hepática*

La respuesta fibrogénica se caracteriza por la excesiva formación de tejido cicatrizal debida al incremento en la producción y depósito de proteínas de MEC. Las células efectoras clave en la producción excesiva de MEC son las HSC, aunque otros tipos celulares pueden hacer contribuciones significativas. La activación de las HSC ocasiona que se transformen en miofibroblastos; esta transformación está regulada por su interacción con varios tipos celulares y la activación de diferentes vías de señalización del contexto de sanación del daño. Los hepatocitos dañados, los macrófagos hepáticos (células de Kupffer), las células endoteliales y los linfocitos dirigen la activación de diferentes tipos celulares, como las ya mencionadas HSC, pero también de los Fibroblastos Portales y las Células Productoras de Colágena Derivadas de Médula Ósea (Sun y Kisseleva, 2015; Trautwein, 2015), los cuales se transforman, de una célula quiescente, en una célula tipo miofibroblasto, que es proliferativa, contráctil y fibrogénica; el proceso se puede observar en la **figura 4**. El proceso de activación de hepatocitos y conlangiocitos, se conoce como Transición Epitelio-Mesénquima (*Epithelial Mesenchymal Transition* o EMT), debido a que estas células son epiteliales y se transforman en mesenquimales (Friedman, 2008).



**Figura 4:** Contribución de las HSC y otros tipos celulares fibrogénicos a la fibrosis hepática. La activación de las HSC quiescentes es iniciada por un amplio rango de mediadores, y la célula activada es estimulada por citocinas clave, convirtiéndose en miofibroblasto. Con el tiempo, otras fuentes también contribuyen a aumentar la población fibrogénica en el hígado, incluyendo las células de médula ósea, los fibroblastos portales y la EMT de los hepatocitos y colangiocitos. La contribución de cada uno de estos tipos celulares a la población de miofibroblastos, difiere entre las varias etiologías del daño al hígado (Tomado y modificado de Friedman, 2008).

Durante el proceso completo general de la fibrosis hepática (**figura 5**) inicialmente los hepatocitos resultan dañados por diversas causas ya mencionadas, liberando Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y mediadores fibrogénicos, e induciendo la incorporación de células proinflamatorias que pertenecen tanto a los sistemas inmune innato (células NK y macrófagos) como adaptativo (células B y T) mediante factores tróficos como quimiocinas y otros mediadores inflamatorios (Ghiassi-Niejad y Friedman, 2008). Durante la fase inflamatoria, las células T, los hepatocitos, las células biliares y las de Kupffer, propician la activación y transformación de las HSC en miofibroblastos, los cuales sintetizan una gran cantidad de MEC, y debido a la sobreexpresión de los TIMP, no se puede degradar. Si el daño al hígado finaliza, los hepatocitos se regeneran y vuelven a sus funciones normales, pero aún no se sabe si las HSC activadas (miofibroblastos) mueren por apoptosis o regresan a su estado quiescente.



**Figura 5:** Mecanismos celulares de la fibrosis hepática (Tomado y modificado de Bataller y Brenner, 2005).

Las investigaciones actuales se han enfocado principalmente en el papel de las HSC, sin embargo, se ha sugerido que es necesario explorar el papel de las interacciones entre éstas y las demás células hepáticas y no hepáticas, especialmente *in vivo* (Sun, M. y Kisseleva, T., 2015); debido al énfasis y la gran cantidad de estudios en HSC, el proyecto CONACYT del cual forma parte esta tesis, en general habla principalmente de ellas y cómo se relacionan con el biofármaco compuesto por colágena y polivinilpirrolidona (Col-PVP), como se mencionará más adelante. En los hígados fibróticos, el número de HSC se ve incrementado en un factor de 10, mientras que el número de células de Kupffer, es decir, del sistema inmune local, alcanza máximo 1.5 veces su cantidad inicial (Beljaars, 2005). Las células del sistema inmune, ya sean linfocitos o polimorfonucleares reclutados a la zona de daño por factores quimiotácticos, regulan la eliminación de patógenos, la muerte de las células dañadas, la regulación de otras células inflamatorias y estimulan a las HSC a producir colágena. Las HSC activadas, secretan quimiocinas inflamatorias, expresan moléculas de adhesión celular y modulan la activación de linfocitos, por consiguiente, se forma un círculo vicioso en el cual las células inflamatorias y fibrogénicas se estimulan unas a otras. Actualmente, se considera que la necroptosis (proceso que se explicará más adelante) podría estimular la inflamación debido a su similitud con la necrosis, pues ambos procesos provocan la salida del material intracelular debido a la pérdida de la integridad de la membrana. Algunos cambios en la composición de la MEC pueden estimular directamente la fibrosis, por ejemplo la Col IV, el fibrinógeno y el activador tipo plasminógeno de la urocinasa (uPA), estimulan a las HSC residentes mediante la activación de citocinas latentes como el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ). Debido a todo esto, hoy en día las HSC son consideradas cruciales en el desarrollo de la fibrosis hepática. Primero por su prominente papel en la producción de MEC, pero también por su regulación del tono vascular hepático, y la producción de muchos mediadores fibrogénicos, como TGF- $\beta$  y el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF). Además, se considera que por sí mismas, en un estado muy avanzado de transformación, las HSC podrían perpetuar el proceso fibrogénico creando varios círculos autócrinos, debido en parte a que su ciclo de crecimiento se activa, causando una gran proliferación, lo

cual induce la producción de más MEC. De hecho, podrían sostener todo el proceso fibrótico sin contribución de los demás tipos celulares hepáticos. Debido a esto, las HSC son vistas como el blanco central en el desarrollo de tratamientos para atenuar o eliminar el proceso fibrogénico (Beljaars, 2005; Sun, y Kisseleva, 2015; Choi, 2015). Estudios más recientes han observado que en la fibrosis provocada por CCl<sub>4</sub> (como la de la presente investigación), que se asemeja a la fibrosis alcohólica, las HSC son la fuente principal de miofibroblastos, sin embargo en la fibrosis inducida por el ligamiento del ducto biliar, más del 70% de los miofibroblastos, provienen de fibroblastos portales en los primeros cinco días de daño, aunque con la progresión del daño colestático se activan las HSC, incrementando la población de miofibroblastos (Sun y Kisseleva, 2015), precisamente por ello, se ha insistido en la utilidad de estudios más profundos de la interacción de las HSC con otros tipos celulares *in vivo*.

### **Cirrosis hepática y su incidencia en México**

El daño al hígado es bastante común en varias enfermedades humanas, como hepatitis virales crónicas y agudas provocadas por infecciones con virus de la Hepatitis B (Hep B o HBV, ) o C (Hep C o HCV, ) y su mal manejo terapéutico; falla hepática, abuso de alcohol, esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica (ASH y NASH), hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, daño inducido por drogas y/o medicamentos de prescripción, daño por isquemia\* y reperfusión, enfermedad de Wilson (alteración en el transporte y eliminación del cobre que proviene de la dieta), daño por ROS, hipoxia, respuestas inflamatoria e inmune, algunas enfermedades genéticas, padecimientos relacionados con depósitos de hierro (hemocromatosis) y diversas causas idiopáticas, también llamadas criptogénicas. Dada la importante capacidad regenerativa del hígado, perder algunas células, podría no parecer un gran problema, pero un daño prolongado, resulta en una exacerbada respuesta de inflamación-cicatrización que causa fibrosis hepática y que conduce, si no se trata, a su forma extrema: la cirrosis, siendo ésta junto con sus secuelas, como hipertensión portal y en

---

\* Detención o disminución de la circulación de sangre a través de las arterias de una determinada zona, que comporta un estado de sufrimiento celular por falta de oxígeno y materias nutritivas en la parte afectada.

ocasiones, carcinoma hepatocelular, las que comprometen la vida humana, como en la mayoría de las enfermedades crónicas (Canbay, 2004; Ghiassi-Nejad y Friedman, 2008; Guicciardi y Gores, 2010).

En México, en 2005 ocurrieron 27, 584 muertes por enfermedades crónicas del hígado. La mayor parte de estas muertes se debió a cirrosis hepática (85%), cuyas causas más frecuentes se han mencionado en el párrafo anterior. Las tasas de mortalidad por cirrosis son mayores en hombres que en mujeres. Sin embargo, entre 2000 y 2005, la mortalidad por cirrosis entre las mujeres creció 3% (Programa Nacional de Salud, México, 2007-2012). Durante los años 90, la cirrosis y otras enfermedades hepáticas, ocupaban el noveno lugar como causa de muerte, pero para el año 2008, esta causa, había escalado hasta el quinto lugar (Sosa-Durán y García-Rodríguez, 2013). Sin embargo, la Cirrosis Hepática fue motivo de 28,732 decesos durante 2014, ascendiendo con esto al cuarto lugar como causa de muerte en México (Aguirre Botello, 2016).

## **CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS (HSC), APOPTOSIS Y FIBROSIS HEPÁTICA**

### **Células Estelares Hepáticas (HSC)**

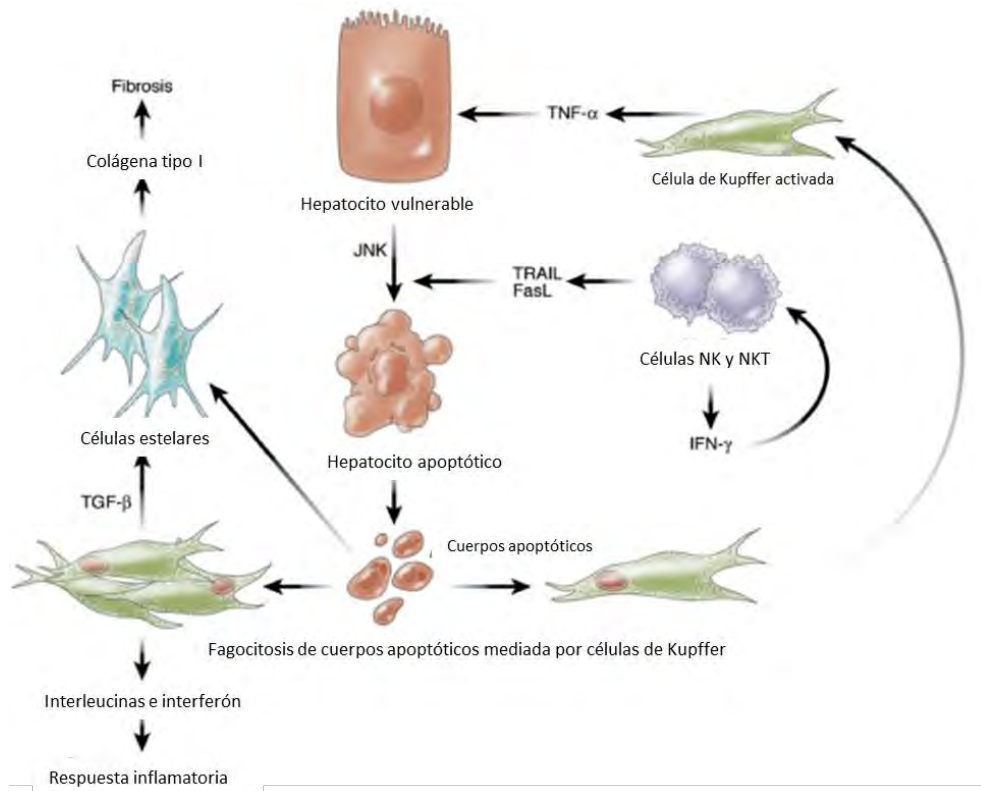
En un hígado sano, las HSC representan aproximadamente 1.4% del volumen total de este, y se encuentran ubicadas en el espacio perisinusoidal o de Disse, donde abrazan parcialmente a las células endoteliales adyacentes (Klein Moreira, 2007). Bajo condiciones fisiológicas normales, las HSC exhiben un fenotipo quiescente: almacenan retinoides en gotas de líquido en su citoplasma y expresan desmina, proteína asociada a la glía fibrilar (GFAP) y receptor del factor de crecimiento nervioso p75 (NGFR-p75), mientras que en respuesta a estímulos fibrogénicos, las HSC atraviesan por un proceso de transdiferenciación llamado “activación”, el cual se caracteriza por la pérdida de las gotas lipídicas que almacenaban vitamina A, cambios morfológicos hacia una forma ahusada y expresión de  $\alpha$ SMA y MEC, representada por Col I; estas dos últimas características, son clásicas de los miofibroblastos (Taura, 2016).

El origen embrionario de las HSC aún es incierto, porque se han detectado diversos marcadores que podrían indicar diferentes orígenes. Por ejemplo, hay evidencia que apoya el hecho de que se originan en el endodermo o del *septum transversum* que se forma desde el mesénquima cardíaco durante la invaginación del brote hepático, apoyo de esta evidencia es el hecho de que las HSC expresan el factor transcripcional de mesodermo Foxf1. En apoyo del origen endodérmico se ha sugerido que las HSC y los hepatoblastos comparten un origen común, esta sugerencia está basada en la coexpresión pasajera de citoqueratinas en ambos tipos celulares. Se ha caracterizado, a la mitad de la gestación del hígado embrionario, una población de células utilizando anticuerpos específicos como CD34 citoqueratina y también expresan CD13, CD59, NGFR, desmina y  $\alpha$ SMA, llevando a los autores a concluir que esta población representa a los precursores embrionarios de las HSC adultas derivadas del endodermo. La confusión se ha incrementado debido al descubrimiento de la expresión de marcadores de cresta neural, como la GFAP, nestina, neurotrofinas y sus receptores, N-CAM, sinaptofisina, NGF, BDNF, Rho-N, N-caderina y proteína celular prión. Sin embargo, estudios de “mapeo de destino” han descartado esta posibilidad cuando fallaron al localizar a las HSC durante la gestación tardía (Friedman, 2008).

Las HSC están involucradas en la fibrosis de la manera siguiente: se ha observado que la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos estimula la fibrogénesis, pues cuando éstos no son fagocitados de manera eficiente se produce inflamación y se liberan señales quimiotácticas que atraen a las células inflamatorias, que junto con las de Kupffer y las endoteliales, producen varias citocinas y factores de crecimiento que activan a las HSC, las cuales están idealmente posicionadas para fagocitar cuerpos apoptóticos derivados de los hepatocitos dañados, ya que se encuentran en las proximidades de los mismos, en el espacio perisinusoidal (de Disse); además de ellas, las células de Kupffer pueden migrar a través de los cordones hepáticos y fagocitar cuerpos apoptóticos, produciendo estímulos fibrogénicos (Canbay, 2004). En general, la fagocitosis de cuerpos apoptóticos, inicia señales intracelulares en la célula fagocítica, que disparan discretas respuestas biológicas, incluyendo la generación de citocinas como el TGF- $\beta$ , considerada como



una citocina “maestra”, además de profibrogénica, en el hígado, pues estimula la diferenciación miofibroblástica de las HSC (Louka, 2016); en el caso de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por parte de las HSC, aquella estimula en ellas la producción de TGF- $\beta$ , y la inducción transcripcional de Col I, uno de los constituyentes principales de la cicatriz cirrótica. Más importante aún es que *la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por HSC quiescentes, estimula la activación de las mismas, en células tipo miofibroblastos*, es decir, una célula proliferativa, fibrogénica y contráctil, como manifiesta el marcador clásico de activación de los miofibroblastos: la expresión de  $\alpha$ -Actina de Músculo Liso ( $\alpha$ -SMA) (**Figura 6**) (Canbay, 2004, Beljaars, 2005).



**Figura 6:** Papel de los hepatocitos en el daño al hígado. Se puede observar que si un hepatocito vulnerable sufre apoptosis, las HSC pueden fagocitar los cuerpos apoptóticos, ser activadas en células tipo miofibroblasto y de este modo desencadenar la fibrosis debido a la excesiva producción de MEC y su poca degradación. (Tomado y modificado de Malhi y Gores, 2008)

La apoptosis de las células parenquimatosas (hepatocitos principalmente) se considera actualmente como un importante estímulo inflamatorio que activa a las HSC, las cuales pueden mostrar una sorprendente capacidad de fagocitar cuerpos apoptóticos induciendo la activación de la fosfato-oxidasa-NADPH. Esta



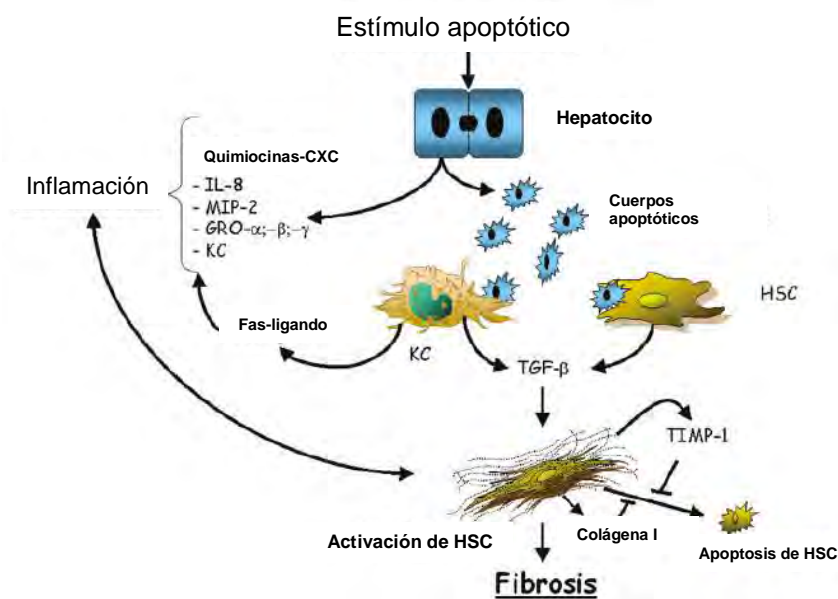
respuesta a hepatocitos apoptóticos, refleja en parte, la interacción del DNA del hepatocito con el TLR9 expresado por las HSC. La respuesta profibrogénica también puede ser provocada por la apoptosis de hepatocitos tras la interrupción del mediador antiapoptótico Bcl-xL y Fas (Friedman, 2008).

Debido a lo explicado en los párrafos anteriores, hoy en día, se considera a las HSC, como cruciales en el desarrollo de la fibrosis, primero por su importante papel en la producción de MEC, pero también debido a su regulación del tono vascular hepático, así como la producción de muchos mediadores fibróticos, como el TGF- $\beta$ , y PDGF (Beljaars, 2005), una vez activadas por diversos estímulos. Por todo esto, la apoptosis y/o inactivación de las HSC se considera clave en la resolución de la fibrosis hepática (Chen, 2015).

Además, se ha observado una relación directa entre la acumulación de mediadores inflamatorios y la apoptosis (Canbay, 2004, Muhanna, 2008; Choi, 2015) (**Figura 7**):

1. La apoptosis desregulada, es decir, en condiciones patológicas, puede perturbar la integridad de los hepatocitos; del mismo modo, la necroptosis podría estimular esta respuesta inflamatoria, como ya se mencionó. Cuando la magnitud de los procesos necrótico, necroptótico o apoptótico, rebasa la capacidad de limpiar los restos celulares el contenido liberado por las células que están muriendo causa daño celular, el cual promueve una respuesta inflamatoria que a su vez conlleva a la activación de las HSC, como se mencionó antes.
2. La apoptosis mediada por receptor de muerte, puede contribuir a la inflamación del hígado iniciando cascadas deletéreas de señalización. Por ejemplo la cascada para extravasación de neutrófilos y el consiguiente daño hepático inducido por endotoxinas. Consistente con esto, se ha observado que la inhibición de la apoptosis de los hepatocitos inhibe la trans migración de los neutrófilos durante el daño al hígado.

3. La disposición de cuerpos apoptóticos también puede ligar la apoptosis con la inflamación del hígado. Por ejemplo, la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por macrófagos o por células de Kupffer puede inducir la expresión de ligandos de muerte como Fas, el cual además es altamente proinflamatorio.
4. Otra consecuencia de la inflamación hepática es la generación de mediadores solubles y estrés oxidativo, que también promueven la activación de las HSC en fenotipo miofibroblástico. La fibrosis hepática asociada con infiltración de células inflamatorias en el tejido hepático, es una característica prominente en la infección crónica por Virus de la Hepatitis B y C. Las HSC, han asumido un papel central en esta respuesta tras su activación por citocinas inflamatorias y otros mediadores.



**Figura 7:** Representación esquemática del modelo propuesto que relaciona la apoptosis, la inflamación y la fibrosis. (Tomado y modificado de Canbay, 2004)

## Apoptosis

Algunos investigadores, consideran que la apoptosis celular es la primera respuesta al daño crónico en el tejido causado por algún evento tóxico para el mismo; en el caso del hígado tales eventos pueden ser hepatitis virales, enfermedad inducida por alcohol, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedades colestáticas del hígado, y daño por isquemia y reperfusión (Canbay, 2004; Bataller y Brenner, 2005). Sin

embargo, la muerte celular por daño, ya sea crónico o agudo puede desembocar en apoptosis, necrosis y/o necroptosis.

La apoptosis es la consecuencia usual de la muerte mediada por células del sistema inmunitario; la necrosis es característica de otros procesos, especialmente del daño que involucra isquemia del tejido (Crawford, 2002). Las células que mueren en respuesta a un daño tisular exhiben cambios morfológicos muy diferentes a los apoptóticos y que se conocen como *necrosis*. Típicamente, las células que atraviesan este proceso, se hinchan y estallan, liberando su contenido intracelular, el cual puede dañar a las células vecinas y frecuentemente causa inflamación (Lodish, 2004). Se ha demostrado que la necrosis puede ser disparada no sólo por receptores con DD, sino también por cromatinólisis mediada por AIF o daño al DNA inducido por alquilación.

La necrosis se ha visto usualmente como un evento accidental y sin regulación sin embargo, evidencia creciente indica que la necrosis también puede ser ejecutada por mecanismos regulados. El término “necroptosis”, de reciente acuño, se refiere a una forma particular de necrosis programada inducida por la estimulación de receptores de muerte mediante agonistas como TNF $\alpha$ , FasL y TRAIL. La necroptosis tiene su propia vía única de señalización que requiere la interacción de RIP1 y 3 (Wu, 2012; Chang, 2015). Evidencia reciente muestra que la necroptosis está significativamente asociada con un gran número de enfermedades clínicas comunes como infección viral, daño por isquemia y reperfusión, infarto al miocardio, arterioesclerosis y enfermedades inflamatorias del intestino. Sin embargo, la apoptosis siempre domina sobre la necroptosis porque la caspasa-8 corta e inactiva a RIPK1 y 3 (Moriwaki, 2016).

La muerte de las células por “muerte celular programada”, está marcada por una secuencia bien definida de cambios morfológicos, colectivamente llamados “apoptosis” (del griego “decaer”, como las hojas de los árboles). Las células que están muriendo, se encogen, condensan y fragmentan, liberando pequeños

cuerpos apoptóticos rodeados de una membrana y que generalmente son fagocitados por otras células (Lodish, 2004). La *apoptosis patológica* en tejidos adultos induce a grandes grupos celulares, es poco selectiva, puede mantenerse durante décadas y las proteínas involucradas son diferentes que las de la apoptosis fisiológica. La apoptosis patológica en el hígado puede no sólo ser el resultado de la inflamación y fibrosis, sino que puede amplificar estas respuestas, como se verá más adelante.

Un desencadenante de la apoptosis patológica es el daño irreparable al DNA o situaciones de estrés grave, como calor, hiperosmolaridad, luz UV y radiación gamma. Cuando el proceso apoptótico es inocuo en momentos particulares de la vida del individuo se le llama *apoptosis fisiológica*, la cual está altamente restringida y regulada tanto en el espacio como en el tiempo, por ejemplo en el desarrollo de un embrión, cuando algunas células deben morir para proporcionar a un tejido u órgano su forma final; o cuando una célula productora de anticuerpos empieza a producirlos contra una proteína o glucoproteína del cuerpo, esa célula experimenta una muerte programada en el timo, un mecanismo esencial para eliminar los anticuerpos contra uno mismo; el desprendimiento mensual de células de la pared uterina (menstruación) es otro caso (Chang, 2015; Nelson, 2015).

Los genes involucrados en controlar la muerte celular, codifican proteínas con tres funciones distintas (Lodish, 2004):

1. *Killer proteins* (proteínas asesinas): son requeridas por la célula para iniciar el proceso apoptótico.
2. *Destruction proteins* (proteínas destructoras): se ocupan de, por ejemplo, destruir el DNA en la célula que está muriendo.
3. *Engulfment proteins* (proteínas de fagocitosis): son requeridas para que la célula sea fagocitada. A primera vista, la fagocitosis parece ser un simple proceso de limpieza tras la muerte, pero hay evidencia que sugiere que este proceso es parte de la decisión de muerte, y se ha observado que las

células cuyos genes codificadores de proteínas de fagocitosis, están dañados, pueden llegar a revertir el proceso apoptótico (Lodish, 2004).

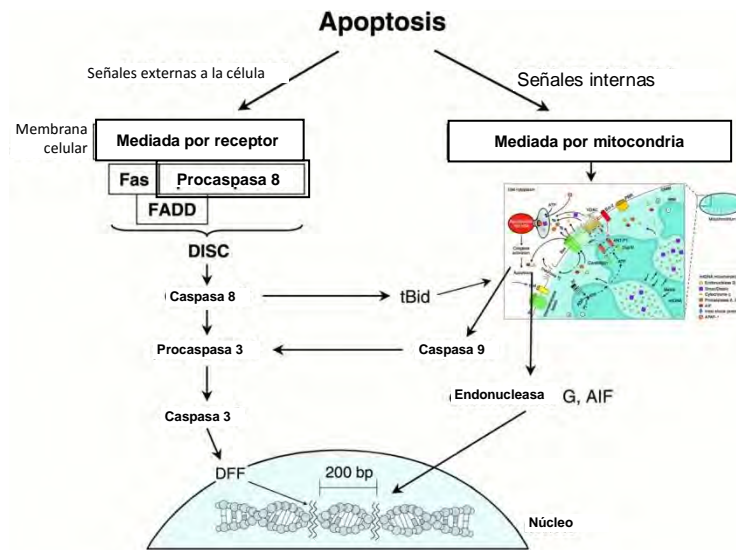
### ***Mecanismos de regulación de la apoptosis***

La apoptosis puede ser provocada por una señal externa que actúa sobre un receptor de la membrana plasmática o mediante procesos internos, tales como lesiones en el DNA, una infección vírica, estrés oxidativo por acumulación de ROS u otro estrés, como el choque térmico. La apoptosis involucra estímulos solubles, células inflamatorias, células residentes parenquimatosas (hepatocitos y HSC en el caso del hígado), y aparentemente también, células fibrogénicas (Canbay, 2004; Bataller y Brenner, 2005). Las HSC, que son clave en el proceso fibrogénico del hígado, contribuyen a la apoptosis y la inflamación (Jiménez y Merchant, 2003; Canbay, 2004), mientras que este último proceso contribuye a su vez a la activación de las HSC, como ya se mencionó.

Durante el proceso apoptótico, la célula presenta fragmentación organizada del núcleo por condensación y fosforilación de la cromatina; desensamble de la lámina nuclear; encogimiento del citoplasma; protuberancias membranales; disminución de la turgencia debida aparentemente a la pérdida de líquido intracelular e iones; translocación de la Fosfatidilserina (PS) desde la capa interna hacia la capa externa de la membrana, por lo cual constituye una señal para las células fagocíticas de que hay cuerpos apoptóticos cerca; el Retículo Endoplásmico se dilata y forma vesículas que se fusionan con la membrana plasmática. Finalmente la célula se rompe en varias vesículas llamadas *cuerpos apoptóticos*, que son fagocitados por células vecinas, células de Kupffer u otros macrófagos, lo cual evita daños en el tejido circundante (Crawford, 2002; Jiménez y Merchant, 2003; Canbay, 2004; Lodish, 2004; Kindt, 2007).

La apoptosis puede ocurrir por dos vías fundamentales: **1)** por vía mitocondrial o intrínseca y **2)** por DR o extrínseca (Canbay, 2004) (**Figura 8**). Estas vías no son mutuamente excluyentes, y tanto los hepatocitos

como los colangiocitos, requieren participación mitocondrial para maximizar este tipo de respuesta de muerte celular, la cual es de importancia primaria en la patobiología hepática (Yoon y Gores, 2002).



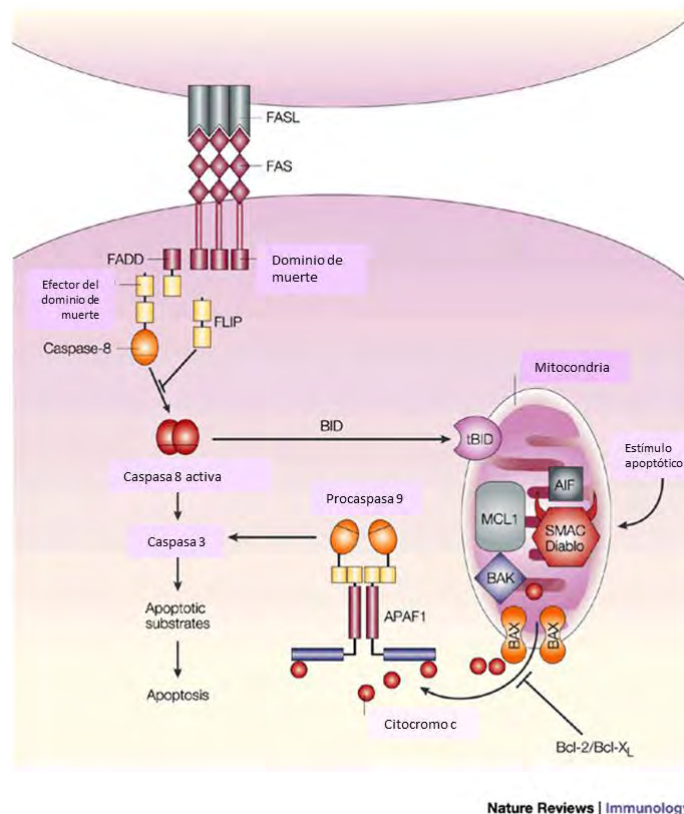
**Figura 8:** resumen de las vías apoptóticas intrínseca y extrínseca. (Tomado y modificado de Mohan, 2011. Presentación oral)

La apoptosis por vía extrínseca, es inducida por estímulos externos, como inflamación, falta de factores de crecimiento, algunos medicamentos, etcétera; es mediada por receptores celulares de superficie, como Fas y TNF $\alpha$ -R1, que interaccionan con células T citotóxicas expresando Fas-L o liberando TNF- $\alpha$  (Crawford, 2002; Mohan, 2011).

Todas las estirpes celulares presentes en el hígado, como hepatocitos, colangiocitos, HSC, células sinusoidales y células de Kupffer, poseen una gran sensibilidad a Fas, una proteína que ha demostrado estar presente tanto en la salud como en la enfermedad hepática. Fas es miembro de la familia TNF, y puede inducir apoptosis cuando es activada por Fas-Ligando (FasL); la apoptosis inducida de este modo, juega un papel importante en el desarrollo y función del sistema inmune (Chu, 1995), y se ha observado que participa en la remoción, por medio de células NK, NK-T o linfocitos T, de hepatocitos dañados (Malhi y Gores, 2008). Se ha comprobado además, la relación entre Fas y miembros de la familia de

proteínas Bcl-2, toda vez que evitan la sensibilidad de las células a Fas (Malhi y Gores, 2008), es decir, controlando en cierto modo la apoptosis mediada por Fas.

La cascada de señalización de Fas, inicia cuando se une el FasL extracelular al receptor de superficie, Fas/CD95, iniciando su agregación y activación. La proteína adaptadora FADD se une al receptor de Fas a través de su DD y transfiere la señal apoptótica a la procaspasa-8 y procaspasa-3. Esto causa que la procaspasa-8 se active y también se observan trazas del corte proteolítico de activación de la procaspasa-3. Una vez activada, la caspasa-8 es instrumento para la subsecuente activación de otras proteínas. Es de particular interés el subsecuente corte proteolítico de la procaspasa-3 por la caspasa-8. La activación de la caspasa-3 resulta rápidamente en degradación del DNA e inactivación de otras funciones celulares (Higgs, 2006) (**Figura 9**).



**Figura 9:** Cascada simplificada de señalización de Fas-FasL y las vías mitocondriales para la inducción de apoptosis (liberación de citocromo c) (Tomado y modificado de Pope, 2002).

Las enzimas efectoras en la vía apoptótica son llamadas caspasas debido a que contienen un residuo clave de Cisteína (Cys) en el sitio catalítico, y cortan selectivamente proteínas en la zona carboxilo-terminal (C-ter) de los residuos de Aspartato (Asp) (Lodish, 2004).

El proceso apoptótico inicia con la activación de los péptidos precursores (zimógenos) intracelulares de las caspasas llamados *procaspasas*, los cuales se activan a través de uno o dos cortes proteolíticos que parten el péptido precursor en las subunidades grande y pequeña que se asocian para formar el sitio activo de la enzima. Las caspasas iniciadoras como la caspasa-9, son activadas por autoproteólisis inducida por otros tipos de estímulos, que ayudan a los iniciadores a agregarse. Las caspasas iniciadoras activadas, cortan las caspasas efectoras (por ejemplo, la caspasa-3), lo cual rápidamente amplifica el nivel de actividad en la célula agonizante (Alberts, 2002; Lodish, 2004). Las caspasas activan una serie de otras enzimas, entre las que se encuentra una endonucleasa que degrada el DNA; además se detecta activación de una transglutaminasa y una degradación específica de la enzima poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (Jiménez y Merchant, 2003). Debido a los rastros bioquímicos que deja el corte proteolítico de las caspasas, es posible identificar la apoptosis mediante técnicas de inmunohistoquímica o ensayos ELISA o TUNEL. La información de los marcadores bioquímicos puede ser utilizada para explorar la relación entre la apoptosis de los hepatocitos y la fibrosis hepática (Guicciardi y Gores, 2010).

En el caso de células infectadas por virus, la vía apoptótica extrínseca también puede ser iniciada por perforina, una proteína que forma poros que permiten a la granzima B, una proteasa, entrar en el citoplasma de las células blanco, iniciando una cascada de reacciones que tienen como resultado la fragmentación del DNA en oligómeros de 200 pb; este tipo de fragmentación del DNA es característico de la apoptosis (Kindt, 2007).



Además de la apoptosis mediada por Fas y por TNF $\alpha$ -R1, puede ocurrir apoptosis mediada por TRAIL en la hepatitis viral y en la enfermedad colestática (Crawford, 2002).

La vía apoptótica intrínseca, también puede ser iniciada a través de varios organelos intracelulares; de hecho, la permeabilización lisosomal, alteraciones en el procesamiento de calcio por el Retículo Endoplásmico, daño al DNA nuclear y disfunción mitocondrial, pueden todos desencadenar apoptosis (Canbay 2003; Mohan, 2011). El daño oxidativo en la membrana mitocondrial interna, lleva a un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial por la apertura del PTPC, lo cual lleva a la liberación del citocromo *c* al citosol. El citocromo *c* forma un complejo con Apaf-1; este hecho lleva a la formación de un *apoptosoma*, compuesto por siete moléculas de Apaf-1 y siete de citocromo *c*. El apoptosoma proporciona la plataforma sobre la que la procaspasa-9 se activa a caspasa-9, la cual activa río abajo caspasas como la 3, 6 y 7. La mitocondria también libera endo G, con el cual las caspasas pueden cortar el DNA cromosomal. La liberación mitocondrial del citocromo *c* es casi un evento universal en la apoptosis y un marcador clave de la vía intrínseca de la apoptosis (Crawford, 2002; Nelson, 2014).

En el caso de las células hepáticas, la maquinaria de regulación, es compleja, pero parece ser comúnmente disparada a través de la activación de receptores de muerte como Fas, TNF-R1 y TRAIL-R1 y R2. Además, para inducir la apoptosis, estos receptores de muerte inician cascadas independientes de señalización que amplifican el daño al hígado tanto como inducen el suicidio celular. Por ejemplo, TNF-R1 unido a TNF $\alpha$  activa NF $\kappa$ B, un factor de transcripción para muchas citocinas proinflamatorias (Canbay, 2003).

### *Proteínas apoptóticas*

En los mecanismos de regulación que desencadenan la apoptosis intervienen algunas de las mismas proteínas que regulan el ciclo celular (Nelson, 2014). Los estudios en cultivos celulares han producido

importantes descubrimientos acerca de un grupo de proteínas adaptadoras que coordinan la acción de reguladores y efectores para controlar la apoptosis: cuando se hicieron estudios en células cancerosas humanas y en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, se sugirió que la vía apoptótica, estaba evolutivamente conservada. El primer gen apoptótico clonado fue *bcl-2*, aislado de linfomas foliculares humanos. Una forma mutante de ese gen, creado por rearrreglo cromosomal, actuó como oncogen, promoviendo la sobrevivencia celular en lugar de la muerte. Por lo tanto se concluyó que la proteína Bcl-2 actuaba como reguladora suprimiendo la vía apoptótica en presencia de factores tróficos. Bcl-2 contiene un solo dominio transmembranal y está localizada tanto en las membranas mitocondriales, como en las nucleares y endoplasmáticas, donde sirve como sensor que controla la vía apoptótica extrínseca. Seis miembros de la familia Bcl-2 previenen la apoptosis, mientras que nueve, la promueven, por lo tanto, el destino de una célula podría reflejar el espectro particular de miembros de la familia Bcl-2 hechos por esa célula y las vías de señalización intracelular que los regulan (Lodish, 2003).

### Familia Bcl-2

La familia Bcl-2 contiene ambos tipos de proteínas, **antiapoptóticas** y **proapoptóticas**; todas de un solo dominio transmembranal y que participan en interacciones proteína-proteína (Lodish, 2003). Los miembros antiapoptóticos *secuestran* proteínas del proteosoma y evitan la liberación de moléculas apoptogénicas de organelos como la mitocondria. Los miembros proapoptóticos, por su parte, actúan como centinelas del daño celular: como respuesta a señales externas, se translocan a organelos donde interactúan con miembros antiapoptóticos y provocan daño en el organelo, desencadenando la apoptosis (Jiménez y Merchant, 2003). La dinámica de ambos grupos de proteínas, determina la muerte o sobrevivencia de la célula.

Por medio de alineamientos múltiples de los genes relacionados con *bcl-2*, se han identificado cuatro dominios conservados en la región codificante, denominadas *regiones de homología a bcl-2*, y que son:

BH1, BH2, BH3 y BH4. Los miembros de la familia Bcl-2, se catalogan en tres subfamilias: la subfamilia de Bcl-2, la subfamilia Bax y la subfamilia BH3 (**Tabla 2**) (Jiménez y Merchant, 2003; Malhi y Gore, 2008). Las proteínas con las que se proyectó trabajar en el presente estudio, son Bcl-2 y Bad; la primera es inhibidora de la apoptosis y la otra, proapoptótica.

**Tabla 2: Subfamilias de Bcl-2**

SUBFAMILIA	MIEMBROS	CARACTERÍSTICAS
<b>Bcl-2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li style="width: 50%;">✿ Bcl-2</li> <li style="width: 50%;">✿ Bcl-w</li> <li style="width: 50%;">✿ Bcl-xL</li> <li style="width: 50%;">✿ Mcl-1</li> <li style="width: 50%;">✿ A1</li> <li style="width: 50%;">✿ Boo</li> </ul>	<p><b>Inhibidores de la apoptosis</b> por presencia de dominio BH4</p> <p>Contienen los cuatro dominios</p>
<b>Bax</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li style="width: 50%;">✿ Bax</li> <li style="width: 50%;">✿ Bok</li> <li style="width: 50%;">✿ Bak</li> <li style="width: 50%;">✿ Bcl-X<sub>S</sub></li> </ul>	<p>Actúan como <b>promotoras de apoptosis</b> por presencia de dominio BH3</p> <p>Presentan sólo dominios BH1 a 3</p>
<b>BH3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li style="width: 50%;">✿ Bim</li> <li style="width: 50%;">✿ Bid</li> <li style="width: 50%;">✿ Bik</li> <li style="width: 50%;">✿ Harakiri (Hrk)</li> <li style="width: 50%;">✿ Puma</li> <li style="width: 50%;">✿ Noxa</li> <li style="width: 50%;">✿ Bad</li> <li style="width: 50%;">✿ Bmf</li> </ul>	<p>Su única similitud con la Familia Bcl-2 es el dominio BH3.</p> <p>Subfamilia <b>proapoptótica</b>, donde el dominio BH3 es indispensable para su función.</p>

## TRATAMIENTOS TERAPÉUTICOS EXISTENTES A LA FECHA PARA TRATAR DISTINTAS PATOLOGÍAS FIBROSANTES

A pesar de que el estado final de la fibrosis hepática, la cirrosis, es considerado irreversible, el proceso fibrótico en sí, puede ser controlado e incluso revertido, lo cual ha impulsado el desarrollo de nuevas farmacoterapias, pues hasta ahora, la única manera de restaurar completamente la salud del paciente es el trasplante de hígado (como se mencionó anteriormente), el cual conlleva varios problemas de tipo económico (el trasplante es costoso), social (escasez de donadores) y clínico (insuficiencia en el número de médicos y lugares en donde se pueda hacer el procedimiento) (Beljaars, 2005).

Las farmacoterapias ideales son aquellas oralmente disponibles, bien toleradas durante un uso crónico, y que no simplemente prevengan la progresión de la fibrosis, sino que impulsen el retroceso de la cicatriz, llevando a la estabilización o mejoramiento de la función hepática (Ghiassi-Nejad y Friedman, 2008). No existe un tratamiento estandarizado para la fibrosis hepática (Bataller, 2005) porque existen muchos momentos en los que se puede atacar la fibrosis, sin embargo, según Ghiassi-Nejad y Friedman (2008), se puede realizar una somera clasificación de los tratamientos existentes, como puede verse en la **Tabla 3**:

**Tabla 3. Tipos de tratamientos existentes contra la fibrosis hepática**

(Tomada y modificada de Ghiassi-Nejad y Friedman, 2008).

TIPO DE TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
Los que curan la enfermedad primaria para prevenir el daño hepático	Este tratamiento es más bien preventivo, pues incluye la abstinencia de ingerir alcohol durante la enfermedad hepática, la remoción del exceso de hierro o cobre, eliminación del virus en hepatitis virales crónicas por HCV y HBV, erradicación de los organismos en esquistosomiasis, descompresión en obstrucción mecánica del ducto biliar, así como la pérdida de peso en pacientes con NASH. Hasta la fecha, este es el mejor “anti-fibrótico”.
Los que reducen la inflamación o la respuesta inmune	Un gran número de agentes que se utilizan para el tratamiento de otras enfermedades, poseen propiedades antiinflamatorias, lo cual reduce el estímulo para la activación de las HSC. Algunos de estos agentes son los corticosteroides, antagonistas de TNF- $\alpha$ , los moduladores de NF- $\kappa$ B, los antagonistas de la enzima convertidora de angiotensina, el ácido ursodesoxicólico y más recientemente, los ligandos para el Receptor X de Farnesoide (FXR), para los cuales aún se requieren pruebas clínicas; la evidencia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , sugiere que la cascada de señalización FXR-SHP, inhibe efectivamente la expresión de TIMP-1 en las HSC, esto incrementa la actividad de la MMP-2 y además, provoca que las HSC, pierdan señales cruciales de sobrevivencia que reciben de TIMP-1.
Los que buscan hepatoprotección para reducir el daño hepático al tiempo que se atenúan las señales río abajo de activación de las HSC	Los hepatoprotectores son considerablemente prometedores en estudios clínicos y preclínicos. Ejemplos de estos compuestos son: el Factor de Crecimiento de los Hepatocitos (HGF, ), el cual suprime la actividad de TGF- $\beta$ , induce la expresión de colagenasas, inhibe y envía a apoptosis a las HSC, y bloquea la transición epitelio-mesénquima de las células epiteliales biliares; el Factor de Crecimiento parecido a Insulina (IGF) y los Inhibidores de Caspasas. En el caso de este último tratamiento, existe el riesgo de evitar la apoptosis de células con el DNA dañado y provocar con ello el desarrollo de cáncer.
Los que impiden directamente la	Impedir la transformación de las HSC quiescentes en miofibroblastos, merece una atención particular, dada su importancia central en el desarrollo de la fibrosis. El enfoque más práctico es

<p><b>activación de las HSC</b></p>	<p>el uso de antioxidantes, como la vitamina E, que desafortunadamente no funciona siempre; los canabinoides son también una vía muy atractiva; existen dos receptores identificados para los canabinoides: CB1 y CB2, y los estudios en HSC humanas demuestran que la activación de CB2 es antifibrogénica, pues su estimulación con anandamida, provoca la muerte de las HSC. El CB1, es inducido primeramente en las HSC, que se convierten en miofibroblastos. El antagonismo de este receptor lleva al decremento en la expresión de TGF-<math>\beta</math>1, a la reducción de la proliferación celular y al incremento en la apoptosis de los miofibroblastos, todo lo cual reduce efectivamente la fibrosis. La citocina Interferón-<math>\gamma</math>, ha mostrado efectos inhibidores en la activación de las HSC, y se ha reportado un efecto benéfico en pacientes con HBV.</p>
<p><b>Los que buscan neutralizar las respuestas proliferativas, fibrogénicas, contráctiles y/o proinflamatorias de las HSC</b></p>	<p>Debido al conocimiento que se tiene de algunas vías de señalización, como la de PDGF, VEGF y TGF<math>\alpha</math>, se han explorado inhibidores de estas moléculas de señalización. Algunos ejemplos son: Gleevec (antagonista del receptor para PDGF), que se utiliza en el tratamiento de leucemias y tumores de células mesenquimales, ha mostrado ser antifibrótico en fibrosis experimental hepática, aunque sólo en la que se está desarrollando, mas no en la ya establecida. Las combinaciones de Gleevec con otras moléculas antifibróticas se están estudiando. Desde que la tecnología del RNA de interferencia (iRNA) se ha vuelto clínicamente aplicable, se están realizando investigaciones en este campo también, aunque todavía se requieren estudios más profundos. La inhibición de la producción de la MEC, ya sea directa o indirectamente, ha sido el blanco principal de las terapias antifibróticas. Se han ensayado también tratamientos con Colchicina, que ha dado buenos resultados en pequeños grupos de pacientes, pero que no ha mostrado una gran eficacia en la cirrosis alcohólica. Los antagonistas de TGF-<math>\beta</math> (como Smad7), han sido probados extensivamente, porque la neutralización de esta citocina, tendría el efecto dual de inhibir la producción de MEC y acelerar su degradación. La preocupación principal es que inhibir esta importante citocina, alteraría el crecimiento hepatocelular y la apoptosis fisiológica en el órgano. La Rapamicina es un medicamento utilizado extensivamente después de los trasplantes de hígado, para inhibir la respuesta inmune y que inhibe también la proliferación de las HSC, pero se ha reportado también un incremento en la trombosis de la arteria hepática. La relaxina, una hormona natural peptídica, ha sido desarrollada sintéticamente como un agente que disminuye la síntesis de colágena por las HSC e incrementa la degradación de MEC. Cabe señalar que las HSC presentan receptores para relaxina. Debido a que la Endotelina-1 (ET1) es un importante regulador de la contracción de la cicatrización y la regulación del flujo sanguíneo, mediado por HSC, sus antagonistas han sido probados como agentes antifibróticos y portahipotensivos; un ejemplo de esto es Bosentan, que se ha probado en fibrosis experimental; además se ha observado que el óxido nítrico (NO) tiene el mismo efecto que la inhibición de ET1.</p>
<p><b>Los que estimulan la apoptosis de las HSC</b></p>	<p>La apoptosis es el principal mecanismo con el que se cuenta para reducir la población de las HSC, pero tiene que estar restringida completamente a éstas para no causar daño en el parénquima circundante. Para lograr esto, se utilizan diferentes herramientas, por ejemplo: TIMP-1 juega un importante papel en la sobrevivencia de las HSC inhibiendo directamente su apoptosis. El efecto pro-sobrevivencia depende de la inhibición de las MMP. La sobreexpresión</p>

	<p>transgénica de TIMP-1 en modelos fibróticos murinos, lleva a retrasar la regresión y es acompañado por un decremento en el número de las HSC apoptóticas. Por el contrario, los anticuerpos contra TIMP pueden atenuar la fibrosis. Similarmente, el uso de MMP-9 mutante, para secuestrar moléculas de TIMP-1, reduce la fibrosis por reabsorción de la MEC. Las células NK, pueden mejorar la fibrosis matando las HSC activadas con la ayuda de la liberación de dos citocinas antifibróticas, IFN-<math>\alpha</math> y <math>\gamma</math>. La atención está altamente enfocada en <i>cómo</i> revierten la fibrosis hepática y en particular, el destino, en este proceso de retroceso, de las HSC activadas; se tiene evidencia de que una vez que la fibrosis comienza a decrecer, las HSC activadas sufren apoptosis selectiva, lo cual ha llevado a utilizar Gliotoxina, un compuesto que provoca apoptosis selectiva en HSC en cultivo e <i>in vivo</i>, llevando a la reducción de la fibrosis. La apoptosis también puede ser provocada por una interrupción en la adhesión mediada por integrinas o a través del uso de ligandos de TRAIL. Las HSC, tienen varias familias de mediadores apoptóticos, como Fas/FasL, receptores para TNF, receptores para el NGF y Bcl/Bax, por lo cual, nuevos objetivos pueden ser estudiados en este campo.</p>
<p><b>Los que incrementan la degradación de la MEC, ya sea estimulando a las células que producen proteasas de matriz (MMP), o inhibiendo sus inhibidores (TIMP), o administrando directamente proteasas de la MEC</b></p>	<p>Esta terapia antifibrótica, provoca la reabsorción de la matriz existente además de prevenir la deposición de nueva. La expresión directa de MMP en modelos animales, ha empezado a confirmar que la MEC puede ser reabsorbida por la expresión de enzimas exógenas. Además, un estudio experimental ha afirmado la importancia de la degradación de la MEC en la regresión de la fibrosis hepática, demostrando que un ratón cuya colágena es resistente a la degradación, muestra un retardo en la regresión de la fibrosis.</p>

### Colágena-Polivinilpirrolidona (Fibroquel<sup>MR†</sup>)

La medicina regenerativa, que busca la formación, reparación y/o regeneración de nuevos tejidos, se vale de diversos medios para lograr su objetivo, entre los que destacan: la terapia celular, la ingeniería tisular y la inducción farmacológica para formar nuevos tejidos (Izázkun Penilla, 2008). Además de las terapias con medicamentos que ya existen pero que pueden llegar a causar efectos secundarios no deseados, la creciente gama descubierta de interacciones entre respuestas apoptóticas, inflamatorias y fibróticas se ha convertido en el marco de trabajo para el desarrollo de nuevas terapias antifibróticas; este es el caso del biofármaco en estudio, el cual es conocido comercialmente como Fibroquel<sup>MR</sup>, que es un copolímero

<sup>†</sup> Fibroquel es una marca registrada de Aspid S.A de C.V.

hecho de una mezcla covalente  $\gamma$ -irradiada de Col-I porcina pepsinizada atelopectídica, y polivinilpirrolidona (Col-PVP) mezclados en una solución de citratos (Furuzawa-Carballeda, 2007) donde cada mililitro del producto final contiene 141.3 mg de Col-PVP, que equivalen a 8.3 mg de colágena (González Arenas, 2011). La estructura de la Col-PVP, mantiene parte de las propiedades de la colágena, combinadas con las propiedades de formación de “películas” de la PVP, con la excepción de que la  $\gamma$ -irradiación parcialmente fragmenta el copolímero, posiblemente sin desnaturalizarlo (Leyva-Gómez, 2014); este compuesto ha mostrado efectos benéficos cuando ha sido administrado en heridas, fracturas y desórdenes fibróticos locales como fibrosis tendinosa y dérmica, donde los síntomas, el volumen y el infiltrado inflamatorio han disminuido, mejorando la arquitectura del tejido y asemejándose cada vez más al tejido normal (Cervantes-Sánchez, 2002). Estos efectos se han relacionado con la capacidad de la Col-PVP para regular (inmunomodular) negativamente la expresión de algunas citocinas fibrogénicas y proinflamatorias, como: IL-1 $\beta$ , PDGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , y moléculas de adhesión, como ELAM-1, VCAM-1 e ICAM-1, sugiriendo que la MEC se retrae y degrada a través de la disminución del infiltrado inflamatorio crónico (Krötzch-Gómez, 1998; Cervantes-Sánchez, 2002).

Como se mencionó antes, la inflamación juega un papel preponderante en el desarrollo de la fibrosis, puesto que la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias estimula la activación de las HSC, por lo cual el efecto de la Col-PVP sobre estas citocinas es muy importante (González Arenas, 2011). Estudios de HPLC han mostrado que la Colágena posee dos especies, mientras que el copolímero con PVP, solamente tiene una, estas diferencias estructurales, podrían determinar su actividad biológica (Leyva-Gómez, 2014).

La colágena administrada por vía intramuscular, cutánea o subcutánea se metaboliza de la misma manera que la colágena endógena, degradándose en el espacio extracelular principalmente por medio de las colagenasas intersticiales y los péptidos de degradación generados son rápidamente metabolizados por las gelatinasas y posteriormente por otras enzimas inespecíficas, dando como subproductos, oligopéptidos y

aminoácidos libres. Dada la fuente de obtención de la colágena empleada en Fibroquel<sup>MR</sup> y su antigenicidad característicamente baja, se considera un material prácticamente inocuo, excepto en pacientes que manifiesten hipersensibilidad a ella. Por su parte, la polivinilpirrolidona (PVP) es un polímero inerte prácticamente no metabolizable que se excreta principalmente por vía urinaria (95%) en un periodo menor a 24 horas. Este *biofármaco* es totalmente absorbido por el organismo, y no presenta síntomas adversos locales o sistémicos, lo cual se ha demostrado mediante evaluaciones clínicas e histológicas (Krötzch-Gómez y Furuzawa-Carballeda, 1998; Furuzawa-Carballeda, 2007); ha demostrado además, ser un buen agente antifibrótico en varias pruebas clínicas en regeneración de nervios, artritis y control de cicatrización hipertrófica (Cervantes-Sánchez, 2002). Mientras que ha manifestado inocuidad en procedimientos periodontales, donde se ha utilizado cuando se requiere cobertura radicular en recesiones gingivales; en aumento de reborde, de encía insertada, entre otras lesiones (Izázkun Penilla, 2008). En resumen, la Col-PVP (o Fibroquel) no estimula la proliferación de linfocitos, no causa daño al DNA, ni induce la producción de anticuerpos contra la colágena I porcina utilizada; tampoco hay evidencia alguna de daño renal o hepático (Leyva-Gómez, 2014). Posiblemente la Col-PVP ejerce su efecto farmacológico a través de uno o más de sus metabolitos, generados por los efectos de las MMP, como la MMP1 (Leyva-Gómez, 2014).

### **Antecedentes de la presente investigación**

El presente trabajo, forma parte del proyecto de investigación financiado por el Fondo Sectorial de Investigación del CONACYT llamado “Estudio histopatológico y bioquímico de los efectos antifibróticos del compuesto colágena-polivinilpirrolidona sobre la fibrosis hepática, valorado en un modelo *in vivo* (ratas) e *in vitro* (hepatocitos primarios de rata)”, por lo tanto, tiene como antecedentes dos protocolos, de los cuales se tomaron los datos pertinentes para las investigaciones actuales. De dichos protocolos, se derivaron dos tesis: según la tesis de licenciatura, titulada “Estudio del probable efecto Antifibrótico del compuesto Colágena-Polivinilpirrolidona sobre la Fibrosis Hepática Inducida por Tetracloruro de



Carbono, en Ratas Wistar” (Pintor Elizalde, 2013), que es el antecedente directo del presente trabajo, pues se tomaron los hígados utilizados en ella, para realizar los experimentos de esta, la histopatología de los hígados de ratas tratadas con el biofármaco Col-PVP, es casi normal siguiendo los parámetros de Knodell, a los cuales se añadió la medición de colágena y de enzimas específicamente hepáticas, como la Súper Óxido Dismutasa (SOD), la Glutación Reductasa y los productos finales de la lipoperoxidación (para conocer el estado de oxidación del tejido).

La otra tesis antecedente, que es de maestría, es la titulada “Estudio de los efectos *in vitro* de la Colágena-Polivinilpirrolidona sobre las Células Estelares Hepáticas murinas” (González-Arenas, 2011), la cual se llevó a cabo para establecer 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; en dicho estudio, no se observó un efecto directo de la colágena-PVP en la reversión al estado quiescente de las HSC activadas, sin embargo, se especula con base en observaciones de otros estudios *in vitro*, que el efecto de la colágena-PVP en el modelo *in vivo* puede ser más complejo y quizá estén involucradas otras células hepáticas, 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.

Además de los trabajos mencionados, algunos estudios, sugieren que el Fibroquel<sup>MR</sup> actúa a nivel de fibroblastos y macrófagos modulando el metabolismo de la colágena, así como la respuesta de las citocinas proinflamatorias, de tal forma que dicha regulación participa en los procesos de reparación con una mejor calidad y tiempo de respuesta en la cicatrización. Por su parte, los estudios *in vivo* han mostrado que Fibroquel<sup>MR</sup> modula el proceso inflamatorio crónico de la fibrosis al disminuir factores proinflamatorios como el PDGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , así como moléculas de adhesión celular que favorecen la diapédesis leucocitaria, como la ELAM-1 y la VCAM-1, hasta alcanzar niveles semejantes a los normales, lo que favorece el recambio de los componentes del tejido conjuntivo, con la consecuente eliminación del

exceso de proteínas fibrosantes (Krötzsch, 1998; Furuzawa-Carballeda, 2002; Furuzawa-Carballeda, 2003).

## **HIPÓTESIS**

Debido a las evidencias experimentales y clínicas que se tienen a la fecha, se puede postular que en los extractos hepáticos derivados de las ratas fibróticas tratadas con el compuesto antifibrótico, habrá un **aumento en los niveles de expresión de proteínas proapoptóticas y una disminución en las antiapoptóticas**; lo cual reflejaría, indirectamente, los efectos del biofármaco sobre las HSC activadas, provocando una disminución en su población y, por lo tanto, deteniendo la fibrosis y favoreciendo su reversión.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar si existen diferencias en la expresión de dos marcadores apoptóticos en los hígados de ratas con fibrosis hepática experimental, tratadas con un biofármaco antifibrótico.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

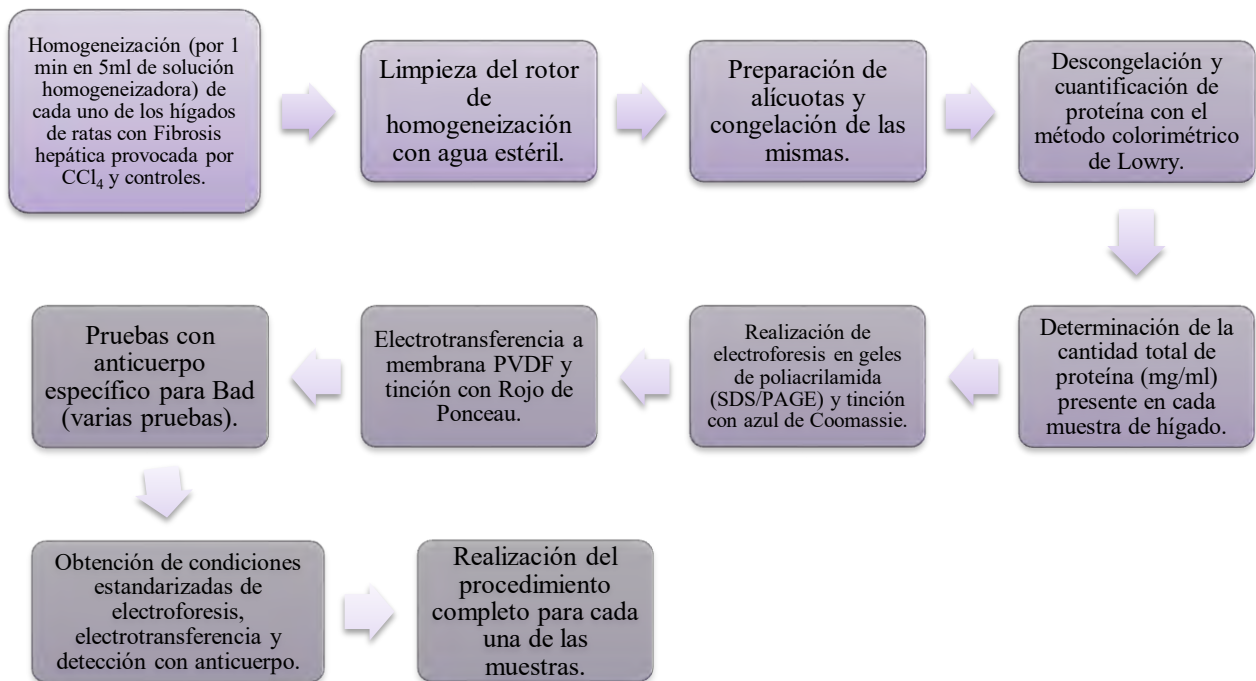
- ✿ Obtener homogeneizados celulares de hígados fibróticos y controles normales de ratas tratadas y no tratadas con el biofármaco antifibrótico mezcla de Colágena-PVP.
- ✿ Cuantificar su contenido de proteínas totales por el método colorimétrico de Lowry (según Lowry, *et al.* 1951).
- ✿ Separar las proteínas presentes en los homogeneizados mediante la técnica de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en presencia de SDS (*SDS-PAGE*) y electrotransferirlas a una membrana de Polifluoruro de Vinilideno (*PVDF*), utilizando una cámara de electrotransferencia semihúmeda.
- ✿ Realizar la inmunodetección (*Western-blot*, su nombre en inglés) de las proteínas *Bax*, *Bad* y *Bcl-2* en la membrana.
- ✿ Realizar el análisis densitométrico semicuantitativo de las bandas resultantes

# DISEÑO EXPERIMENTAL

## Materiales y métodos

Como se mencionó en el apartado de “Antecedentes del presente trabajo”, durante el proyecto de Pintor-Elizalde (2009), se provocó la fibrosis hepática con Tetracloruro de Carbono ( $\text{CCl}_4$ ) a 80 ratas. Para tener datos del comportamiento fisiológico de esas ratas, se colectaron los sueros de todas ellas en los momentos específicos de cada sacrificio, con el fin de determinar varios parámetros de función hepática en el Laboratorio Central de Pruebas Especiales del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” (los datos obtenidos, se pueden consultar en los Anexos y en la Tesis “Estudio del probable efecto Antifibrótico del compuesto Colágena-Polivinilpirrolidona sobre la Fibrosis Hepática Inducida por Tetracloruro de Carbono, en Ratas Wistar” [Pintor Elizalde, 2013]). Se tomaron y disecaron los hígados de los cuales se tenían dichas pruebas y se realizó todo el procedimiento que corresponde a este proyecto, el cual se resume a continuación (**Tabla 3**) y se describe detalladamente más adelante.

**Tabla 3. Resumen del Diseño experimental**



Manteniendo siempre el tejido hepático en hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas, se realizaron los homogeneizados de los hígados de las ratas a las que se les había provocado la fibrosis hepática con CCl<sub>4</sub>; algunas habían sido tratadas con el biofármaco colágena-PVP, y otras no; los bloques detallados de los hígados tratados, se pueden consultar en el apartado de “Resultados”. La homogeneización se realizó con un homogeneizador de rotor. Se tomó aproximadamente 1 g de cada hígado, que se sumergió en 5 mL de solución de homogeneización (EDTA, Tris-base, KCl, para las concentraciones de cada uno, ver “Anexos”), poniéndolo a continuación bajo el rotor del homogeneizador. El proceso de homogeneización tomó alrededor de 1 minuto, dependiendo de la calidad del tejido, pero siempre a 35 000 revoluciones por minuto (rpm), es decir, a máxima velocidad. El rotor se limpió con agua estéril al terminar de homogeneizar cada hígado.

Después de homogeneizados todos los hígados disponibles, se prepararon dos bloques de alícuotas (A y B), cada uno con muestras de hígados tratados y no tratados y se congelaron a -80 °C hasta su utilización. De hecho, el bloque B de alícuotas, permaneció congelado a -80 °C y durante la estandarización del procedimiento, se trabajó únicamente con el bloque A. Posteriormente, se descongelaron alícuotas únicamente del bloque A de cada uno de los homogeneizados para proceder a la cuantificación del contenido total de proteína utilizando el método colorimétrico de Lowry, así se obtuvo la concentración de proteína en mg/mL (ver el apartado “Resultados”), con el fin de tener suficiente proteína de cada muestra para realizar la inmunodetección apropiadamente y que los resultados que se obtuvieran fueran concluyentes. Para tomar esta decisión, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE); haciendo pruebas con diferentes concentraciones del material citado (10%, 12% y 15%) con el fin de elegir la que funcionara mejor para los propósitos del proyecto, tiñendo luego las membranas con azul de metileno, para determinar cualitativamente la cantidad de proteína presente, y poder decidir la cantidad apropiada para trabajar con ella. Los geles se prepararon según instrucciones del fabricante (ver Anexos).

Una vez decidida la cantidad de proteína (50 µg) para trabajar con ella, se hicieron varias pruebas para estandarizar las condiciones de electrotransferencia de las proteínas utilizando una cámara semihúmeda (ver fotografías de las pruebas en el apartado de “Resultados”) y la tinción con Rojo de Ponceau; finalmente se definieron los parámetros a utilizar para los experimentos del proyecto, los cuales se pueden ver en el apartado de “Resultados”.

Cuando se terminaron de estandarizar los procedimientos de electroforesis y electrotransferencia, se continuó con la inmunodetección de Bad, Bax y Bcl-2, para lo cual se probaron varias diluciones y tiempos de incubación con los anticuerpos correspondientes a las tres moléculas; finalmente, dichas condiciones quedaron como sigue: anticuerpo primario diluido en amortiguador de incubación (Ver “Anexos”), en concentración de 1:1000, incubación de la membrana durante una hora y lavado con PBS. Después, incubación con el anticuerpo secundario, diluido en el amortiguador descrito en concentración 1:2000. Enseguida se sumergió la membrana en PBS salino (Ver “Anexos”) por 30 minutos y se lavó con agua Milli-Q, para continuar con el último paso, la incubación con el revelador, que en este caso fue TMB. Para detener el revelado, se utilizó agua Milli-Q y se tomaron las fotografías con un fotodocumentador marca Bio-Rad.

Sin embargo, como en ninguna de las pruebas preliminares se obtuvieron señales positivas de la presencia o detección de las proteínas Bax y Bcl-2, no se completaron todos los experimentos con los tres anticuerpos; y se decidió utilizar únicamente **Bad**, una proteína proapoptótica de 25 kDa (que se considera de bajo peso molecular); una vez decidido esto todos los procedimientos se realizaron de la manera descrita para cada una de las muestras de hígado, utilizando ahora el lote marcado como “B”, el cual no había sido sacado del ultracongelador (-80 °C) para evitar la degradación de las enzimas.

## Resultados

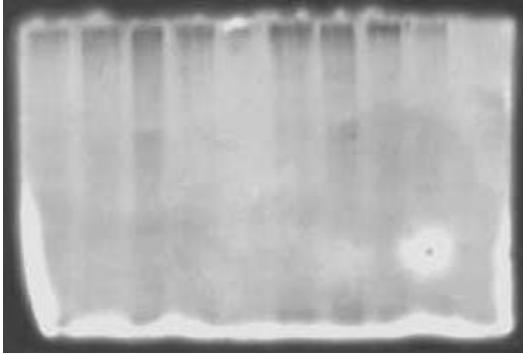
El primer resultado obtenido, y con el cual se empezó a trabajar fue el que se observa en la **Tabla 4**, en la cual se advierte la concentración de proteínas en las muestras con el fin de saber la cantidad de proteína total con la que se contaba, pues a partir de ahí se realizarían todas las pruebas que conducirían a tener la cantidad óptima de proteína para la detección de las proteínas apoptóticas buscadas, como ya se dijo en el apartado de “métodos”. A continuación, se realizó la estandarización de las condiciones de electroforesis y electrotransferencia, de la manera que se describió, obteniendo las condiciones que se especificarán a continuación.

**Tabla 4: Concentración de proteínas en las muestras**

<b>Clave<sup>‡</sup></b>	<b>Promedio de alicuotas a y b en 4<math>\mu</math>L (<math>\mu</math>g/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Concentración en mg/mL</b>	<b>Vol <math>\mu</math>l para tener 50<math>\mu</math>g de proteína</b>
AI	71.6520	17.913	2.79
AII	70.7801	17.695	2.83
AIII	68.2428	17.061	2.93
AIV	65.2283	16.307	3.07
BI	59.6905	14.923	3.35
BII	56.7336	14.183	3.53
BIII	63.4182	15.855	3.15
BIV	61.7906	15.448	3.24
BV	58.8704	14.718	3.40
CI	45.3670	11.342	4.41
CII	63.5879	15.897	3.15
CIII	53.2871	13.322	3.75
CIV	64.4335	16.108	3.10
CV	60.8925	15.223	3.28
DI	56.9186	14.230	3.51
DII	57.3164	14.329	3.49
DIII	58.0710	14.518	3.44
DIV	41.4381	10.360	4.83
DV	57.0774	14.269	3.50
EI	45.5293	11.382	4.39
EII	37.5735	9.393	5.32
EIII	40.2864	10.072	4.96
EIV	38.0923	9.523	5.25
EV	80.7486	20.187	2.48
FI	70.7761	17.694	2.83
FII	60.1863	15.047	3.32
FIII	58.7717	14.693	3.40
FIV	71.2315	17.808	2.81
FV	62.6432	15.661	3.19
GI	56.5529	14.138	3.54
GII	55.9811	13.995	3.57
GIV	79.9360	19.984	2.50
GV	70.4439	17.611	2.84
HI	37.0440	9.261	5.40
HII	57.6604	14.415	3.47
HIII	82.5048	20.626	2.42
HIV	50.5171	12.629	3.96
HV	84.8599	21.215	2.36

<sup>‡</sup> Esta clave indica únicamente el orden en que se trabajó con la muestra

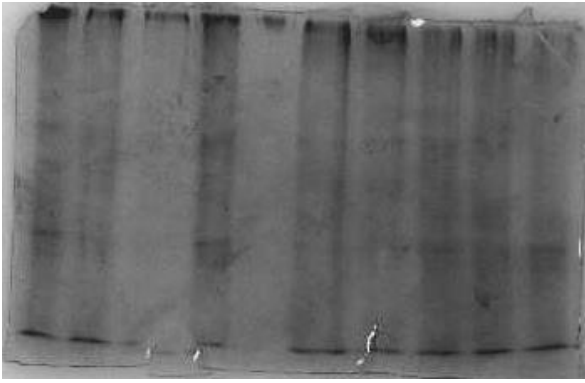
Se realizaron varias electroforesis con diferentes cantidades de proteína, iniciando por 100  $\mu\text{g}$  de proteína en un gel separador al 10% y un voltaje de 200 V. Mientras que la transferencia se realizó a 40 mA por 30 min. Sin embargo, no se obtuvieron los resultados deseados, puesto que no se podían observar apropiadamente las proteínas de bajo peso molecular (apoptóticas) como se puede observar en la fotografía del gel, teñido con Azul de Coomassie y de la membrana, teñida con Rojo Ponceau (Fotografía 1).



**Fotografía 1:** a la izquierda, en el gel teñido con azul de Coomassie, no se observa gran cantidad de proteína de bajo peso molecular. A la derecha, membrana PVDF teñida con Rojo Ponceau, donde se observa una gran cantidad de proteínas, sin embargo, no se distinguen las proteínas de bajo peso molecular.

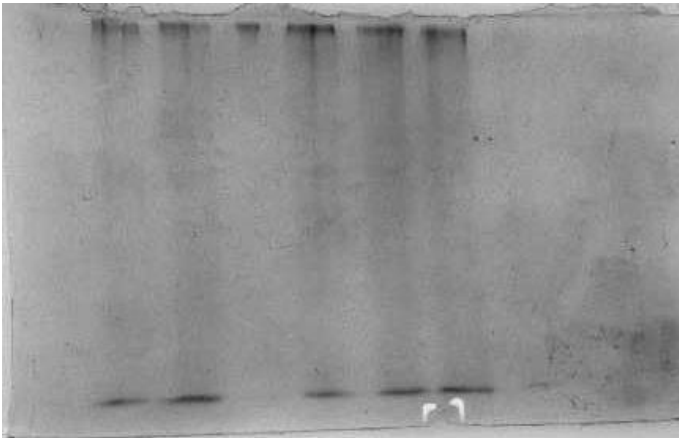
Debido a que no se obtuvieron los resultados deseados, se realizó una nueva prueba, con 40  $\mu\text{g}$  de proteína, un gel separador al 12%, de 1 mm de grosor, y un gel concentrador al 5%, corriendo a 200 V; mientras que las condiciones de electrotransferencia, fueron de  $2\text{mA}/\text{cm}^2$ , durante 30 min. Se obtuvo lo siguiente:





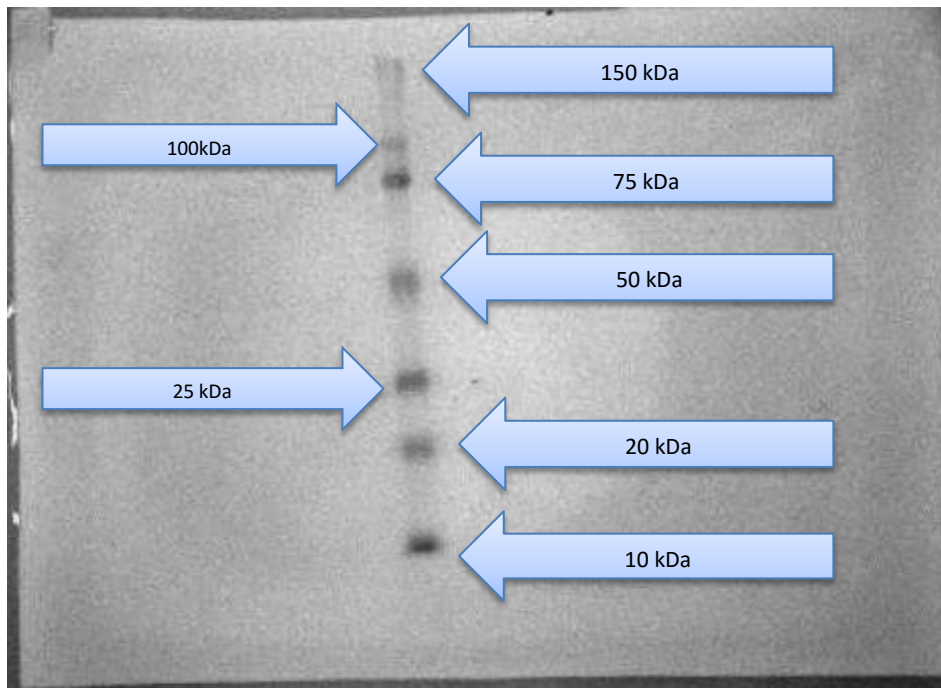
**Fotografía 2:** *se observan pocas proteínas de bajo peso molecular, tanto en el gel, como en la membrana.*

Debido a que en esta ocasión, el resultado tampoco fue óptimo, se realizó una tercera y luego una cuarta prueba, de las cuales se desprendieron finalmente las **condiciones óptimas para todo el procedimiento**, las cuales son: gel separador al 12%, gel concentrador al 5%, correr las muestras a 180V durante 60 minutos; electrotransferencia, 2.5mA/cm<sup>2</sup> por 30 min, con 30 µg de proteína, quedando las membranas de la siguiente manera (tinción con Rojo Ponceau para evidenciar condiciones):



**Fotografía 3:** condiciones óptimas. Del lado izquierdo se observa la fotografía de un gel teñido con Azul de Coomassie, cuyas proteínas se transfirieron casi completamente a la membrana PVDF, la cual se vería como la de la fotografía del lado derecho, en la cual se evidencian las bandas de proteína de bajo peso molecular.

Además del Rojo Ponceau, se utilizaron marcadores preteñidos de la marca BioRad<sup>MR</sup>, para evidenciar la electrotransferencia; sus pesos moleculares se pueden observar en la **fotografía 4**:

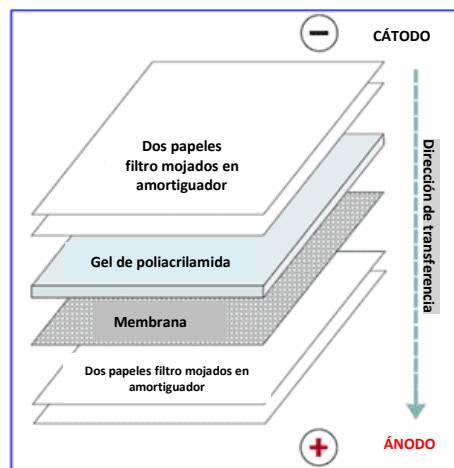


**Fotografía 4:** transferencia de marcadores preteñidos a la membrana PVDF, con su correspondiente indicación de peso molecular. La proteína Bad estaría en la banda de 25 kDa, por lo cual se le considera una proteína de bajo peso molecular.

A partir de la obtención de la estandarización, se realizaron las electroforesis de todas las muestras de hígado con que se contaba, para evitar confusiones, se utilizó la clave alfanumérica ya establecida por Pintor-Elizalde (2013), la cual se puede observar en la Tabla 4 dividiendo las muestras en bloques (de la A a la H). El orden en que las muestras se pusieron en el gel SDS/PAGE se decidió con base en la cantidad de muestras de cada clave, por ejemplo, en el caso de los bloques A, B, G y H, los bloques A y G contenían únicamente cuatro muestras, mientras que los bloques B y H, contenían cinco muestras cada uno, con el fin de no desperdiciar material, se agruparon los bloques (A y B), y (G y H), pues de este modo, se ocupaba un solo gel de SDS/PAGE de 10 carriles completo, ya teniendo en cuenta el carril de marcadores de peso molecular preteñidos. En cuanto a los demás bloques, se corrió 1 bloque por cada gel,

pues cada uno contenía 5 muestras, y añadiendo el carril de marcadores, no cabía otro bloque en el mismo gel.

Al terminar la electroforesis de cada bloque de muestras con las condiciones óptimas (que fueron descritas anteriormente), se procedió al proceso de electrotransferencia, para ello, se siguieron los pasos correspondientes, que fueron: poner 100 mL de amortiguador de transferencia nuevo en un recipiente, agregando enseguida el o los geles procedentes de la electroforesis, con el fin de “equilibrarlos”, de 5 a 10 minutos, mientras tanto, se cortó el papel filtro y la membrana con las medidas de cada gel; el papel filtro se puso en contacto con amortiguador de transferencia, pero en un recipiente aparte de los geles, mientras que la membrana se pasó por un baño de metanol y otro de agua grado Milli-Q®, para ponerla, finalmente, junto con los geles en el mismo amortiguador de transferencia. Una vez transcurrido el tiempo de equilibrio de los geles y la membrana, se procedió a armar la cámara de electrotransferencia como se observa en la siguiente figura (**Figura 10**), cuidando de no dejar burbujas entre cada capa:



**Figura 10:** Armado de cámara semihúmeda de electrotransferencia.

Después de la electrotransferencia, los geles se tiñeron con azul Coomassie, para evidenciar la transferencia de proteínas, y se tomó fotografía de cada uno. Mientras se teñían y desteñían los geles, la(s) membrana(s) se colocaron inmediatamente en el amortiguador de bloqueo (ver “Anexos”), y se dejaron

incubando toda una noche a 4°C. Debido a esto, la prueba completa para cada bloque de muestras, llevó 2 días, porque si bien, la electroforesis y la electrotransferencia se realizaban en un solo día, la detección de las proteínas con el anticuerpo se debía realizar al día siguiente, dando tiempo al amortiguador de bloqueo a realizar su trabajo.

A la mañana siguiente, se realizaron las inmunodetecciones, de la manera que se describe a continuación: se incubó a temperatura ambiente, por 1 hora el anticuerpo primario (Bad) diluido 1:1000 en amortiguador de incubación, a continuación, se lavó con amortiguador de lavado (ver “Anexos”) por 30 minutos, haciendo cambio de amortiguador cada 5 minutos, transcurridos los 30 minutos, se incubó por 1 hora el anticuerpo secundario conjugado con HRP, diluido 1:2000 en el amortiguador descrito (ver “Anexos”). Pasado el tiempo indicado, se incubó la membrana en PBS salino por 20 a 30 minutos, lavando después con agua destilada, para poner el revelador (TMB) enseguida, y dejarlo durante 15 minutos protegido de la luz. Transcurrido el tiempo, se lavó con agua destilada 3 veces por 5 minutos cada vez, y enseguida se tomó la fotografía de ella, almacenándola enseguida en un lugar oscuro.

Con ninguna de las condiciones se obtuvieron *blots* (membranas resultantes de la electrotransferencia y tratadas con cada anticuerpo y su tinción) en los cuales se evidenciara la presencia detectable mediante instrumentos, de alguna de las proteínas apoptóticas consideradas. En el siguiente apartado se considerarán los posibles motivos de este resultado.

## **Discusión**

El creciente descubrimiento de las interacciones entre apoptosis, inflamación y respuestas fibróticas, tiene grandes implicaciones terapéuticas (Canbay, 2004). Como se mencionó anteriormente (Tabla 2: Tipos de tratamientos), la apoptosis es el principal mecanismo con el que se cuenta para reducir la población de HSC activadas sin alterar la población de hepatocitos (Canbay, 2004). Sin embargo, también es

importante degradar la MEC que produjeron las HSC activadas, con el fin de que la fibrosis decrezca y el órgano pueda funcionar con normalidad.

Según Ghiassi-Nejad y Friedman (2008), se tiene evidencia de que una vez que la fibrosis comienza a decrecer, las HSC activadas sufren apoptosis selectiva (lo cual evidentemente, propicia que no produzcan más MEC), porque se ha reportado que la transformación de las HSC es paralela al incremento en su sensibilidad hacia la apoptosis (la apoptosis no es una característica prominente en las HSC no activadas [Canbay, 2004]) mediada por FasL, la cual a su vez está asociada con un fuerte decremento en la expresión de Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> (Lu, 2004). En la revisión de Ghiassi-Nejad y Friedman (2008), también se menciona que la apoptosis de las HSC puede ser provocada por otras vías además de Fas, por ejemplo, por medio de TRAIL, TNF, NGF y Bcl/Bax.

Cuando las condiciones preponderantes en el tejido favorecen el daño celular, el proceso lleva a la apoptosis o necrosis; mientras que si las condiciones favorecen la reparación celular, la célula puede sobrevivir (Lu, 2004), con este argumento se podría afirmar que si hay presencia de proteínas apoptóticas, es porque de algún modo, algunas células están resultando dañadas por el biofármaco, por lo tanto, y debido a que no se han observado efectos secundarios negativos después de la administración crónica del compuesto, (Furuzawa-Carballeda, 2003), e incluso se ha visto que hay disminución de la MEC, se puede sugerir que únicamente las HSC activadas y otras células productoras de MEC resultarían afectadas, mientras que los hepatocitos y otras células hepáticas, no sufrirían daño alguno, de lo cual se deriva que el biofármaco (Col-PVP) es útil para la reparación del daño causado al órgano por la cicatrización excesiva. De todos modos, es sumamente importante entender el mecanismo apoptótico de las HSC activadas porque regular este proceso podría proveer de nuevas posibilidades terapéuticas a la fibrosis hepática avanzada (Issa, 2001).

El biofármaco compuesto de Col-PVP, ha sido probado en diferentes tipos de daño tisular, por ejemplo en heridas, fracturas, y desórdenes fibróticos locales, como fibrosis tendinosa y dérmica, en donde se ha mejorado la arquitectura del tejido, semejándolo cada vez más al tejido sano. Tratando de entender los efectos fisiológicos del tratamiento con el biofármaco, se ha hecho una correlación entre la Col-PVP y algunas citocinas fibrogénicas y proinflamatorias, sugiriendo que la MEC se retrae y degrada a través de la disminución del infiltrado inflamatorio crónico (Krötzch-Gómez, 1998; Cervantes-Sánchez, 2002).

En el presente trabajo, se utilizó la familia de proteínas llamada Bcl-2, que comprende subfamilias proapoptóticas y antiapoptóticas. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bad y Bax, son miembros de la familia que juegan un importante papel en regular la supervivencia celular y la apoptosis, por ejemplo, la sobreexpresión de Bcl-2 suprime la lipoperoxidación, previene la apoptosis y es positivamente regulada por estrógeno en una amplia variedad de tejidos; además de Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> también previene la apoptosis en respuesta a una gran variedad de estímulos (Lu, 2004). Según el reporte del grupo de Lu (2004), que trabajó con Idoxifen y Estradiol en ratas con fibrosis hepática, se concluyó que ambos compuestos modulaban la expresión de la familia de proteínas Bcl-2 en apoptosis mediada por DMN, donde se observó el decremento de Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, así como el incremento en la expresión de Bad (Lu, 2004). Con dichos resultados, se puede concluir que la familia Bcl-2, es un importante marcador de muerte celular de las HSC activadas.

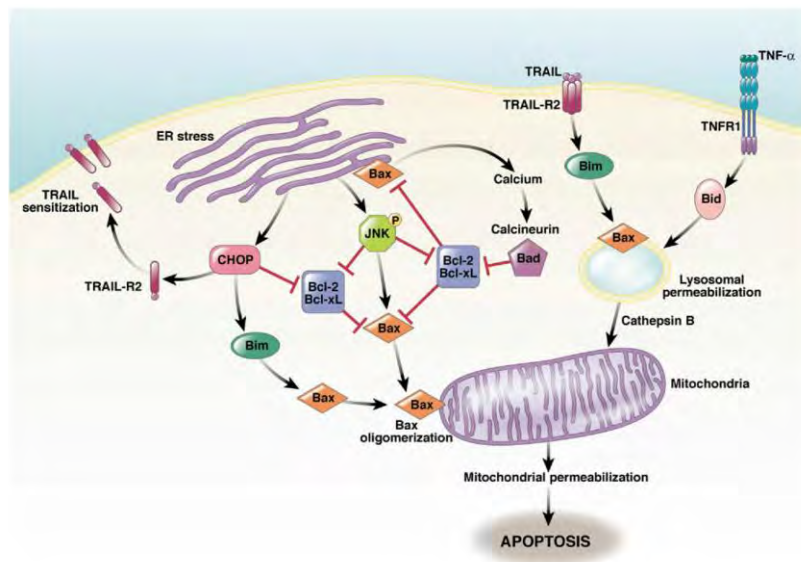
En el presente proyecto se tenía contemplado analizar la expresión de las proteínas Bad y Bax, una proapoptótica y otra antiapoptótica; sin embargo, finalmente se realizaron únicamente pruebas con Bad. Finalmente no hubo presencia cuantificable de dicha proteína, lo cual posiblemente se debió al método utilizado para la detección de proteínas, ya que su sensibilidad es baja, y necesita ser mejorado significativamente con el fin de detectar baja abundancia de proteínas (Kang, 2002); también pudo deberse a que no había suficiente cantidad de proteína presente en el tejido (Protocols book, p. 23), o incluso, a que el método de obtención de la proteína, pudo haber causado que se degradara por acción de

proteasas durante el proceso: a pesar de que las muestras se tuvieron en hielo, pudo haber degradación durante el proceso de homogeneización, particularmente, esta última situación se presenta con proteínas de bajo peso molecular (Protocols book, p. 24) cuando faltan inhibidores de proteasas como fue el caso del presente trabajo.

Según la hipótesis planteada, se esperaba que las células productoras de proteínas fibróticas (es decir, las HSC activadas) hubieran regresado a su estado quiescente o que hubieran muerto; comprobar el regreso al estado quiescente estaba más allá de los límites del presente estudio, pero indirectamente se podía verificar la muerte de esas células por la presencia de proteínas apoptóticas. Ahora bien, la no presencia detectable por el método utilizado en este trabajo, de dichas proteínas, especialmente Bad, que es proapoptótica, no necesariamente indica que no hubo muerte celular por apoptosis (sobre todo teniendo en cuenta, como se mencionó antes, que las HSC activadas son sumamente sensibles a ella), puesto que hay múltiples razones que podrían haber conducido a este resultado, por ejemplo, que las proteínas se hubieran degradado como ya se mencionó, o que al momento de los estudios, ya no estuviera presente Bad porque su papel en el proceso ya había terminado, es decir, a pesar de que se induzca apoptosis a células en la misma fase del ciclo celular, el proceso de muerte no es sincrónico, por lo que las proteínas encontradas, serían representativas de un momento específico (Alfaro Moreno, 2000). Otra razón por la cual podría no haberse detectado a Bad, es que el proceso de apoptosis no fuera el preponderante en nuestro modelo experimental de fibrosis hepática en ratas, sino más bien que el proceso desencadenado fuera el de la necroptosis (o necrosis programada); proceso que recientemente se ha señalado como otro mediador de muerte celular, que aunque comparte inicialmente, la misma vía de señalización con la apoptosis (formación del Complejo I), dependiendo del tipo celular y del estímulo comprometidos, habrá una divergencia entre la formación del Complejo IIa (apoptosoma), dependiente de la caspasa-8 o del Complejo IIb (necrosoma), independiente de caspasa-8 y que presenta características subcelulares semejantes a la necrosis, como la expresión elevada de ROS, hiperpolarización de la membrana

mitocondrial, permeabilización de la membrana lisosomal y de la membrana plasmática, provocándose la liberación de gran cantidad de detritos celulares desencadenantes de una respuesta inflamatoria asociada (Wu, 2015). En este contexto, recientemente el grupo de Choi, (2015), reportó que en un modelo de fibrosis hepática provocada en ratas por la administración crónica de CCl<sub>4</sub>, el tratamiento de las ratas con melatonina podría haberlas prevenido de la fibrosis inhibiendo la señalización inflamatoria asociada con la necroptosis.

También se ha observado que las HSC activadas expresan altos niveles de receptor 2 para TRAIL, y aunque existe cierta controversia, la mayoría de los reportes concuerda en que la vía TRAIL es inofensiva para los hepatocitos normales humanos (Malhi y Gores, 2008), lo cual indica que las HSC activadas son las más afectadas si es que es esta vía la que se activa, en cuyo caso, además no se observaría la proteína Bad en suficiente concentración, puesto que TRAIL induce apoptosis mediada por caspasas, caso similar a Fas. En la **Figura 10** se presenta el esquema que resume la vía activada por TRAIL:



**Figura 10:** donde se observa la vía apoptótica activada por TRAIL y que induce a Bim y a Bax, pero no a Bad, la proteína elegida en este estudio. (Tomada y modificada de Malhi y Gores, 2008).



En la tesis de Pintor-Elizalde (2013), al realizar el análisis histopatológico de los hígados fibróticos de ratas, la experta histopatóloga que realizó el análisis, concluyó que la estructura tisular de dichos hígados, recuperó características de un hígado normal tras la aplicación del biofármaco (copolímero de Col I y PVP); mientras que en la tesis de González-Arenas (2011), el probable efecto de la colágena-PVP en la reversión de HSC activadas al estado quiescente se estimó detectando las proteínas  $\alpha$ -SMA y procolágena  $\alpha 1$  (proteínas detectadas comúnmente en las HSC activadas) así como los niveles de expresión de sus respectivos mRNA; encontrándose que ni los niveles de expresión de ambas proteínas, ni de sus mRNA respectivos, disminuyeron con el tratamiento. Sin embargo, si se identificó una disminución en el índice de proliferación de estas células en cultivo, cuando fueron tratadas con el copolímero, sugiriendo un efecto antiproliferativo del biofármaco.

## Perspectivas

- ✿ Es recomendable realizar estudios ulteriores en los que se puedan verificar las dos condiciones, la vuelta al estado quiescente de las HSC (mediante la presencia o ausencia de proteínas típicas de su activación) y la presencia o ausencia de proteínas fibróticas.
- ✿ Dichos experimentos, deben incluir varias proteínas de la cascada apoptótica con el fin de identificar el proceso involucrado en la resolución de la fibrosis: apoptosis o necroptosis, especialmente, en el caso de este último, una vez que se haya elucidado mejor su cascada de activación y acción, los análisis podrían determinar si este proceso está involucrado durante la resolución de la fibrosis hepática provocada por CCl<sub>4</sub>.
- ✿ Se deben incluir pruebas para verificar que la MEC está dejando de ser producida exacerbadamente o que está siendo degradada, para ello, se podría analizar el tejido en búsqueda de MMP y/o TIMP.
- ✿ Con el fin de tener mayor seguridad en cuanto a la acción del biofármaco compuesto por Col-PVP, se requeriría realizar estas pruebas en cultivos celulares de HSC, como las realizadas por González-Arenas, en 2011, en tejido hepático de ratas (como en el caso de Pintor-Elizalde, en 2013) e *in vivo*, con el fin de identificar si el biofármaco provoca algún cambio en la tasa de apoptosis y/o necroptosis; y no únicamente pruebas moleculares *in vitro*, como fue el caso de la presente investigación.
- ✿ Para realizar estos estudios, se requieren métodos analíticos más sensibles; actualmente el método más extendido es la detección de proteínas en SDS-PAGE con azul de Coomassie, que fue el empleado en este trabajo, sin embargo, su sensibilidad aún es baja, y necesita ser mejorada (o sustituida) para detectar proteínas con una baja abundancia (Kang, 2002). Después de varias pruebas, Kang y colaboradores (2002), encontraron una manera de hacer más sensible el método de detección de proteínas con azul de Coomassie, agregando sulfato de aluminio y etanol; este método puede ser utilizado para detectar una pequeña cantidad de proteína en el gel, sin embargo,

el método aún no está muy difundido entre la comunidad científica, y por lo tanto no se ha utilizado en experimentos formales.

- ✿ En el caso de este estudio, el objetivo no era la detección de proteínas en un gel de electroforesis, sino en la membrana PVDF, mediante el método de Western-blot, sin embargo, el conocimiento de un método más sensible para detectar proteínas, podría ser un aliciente para refinar el método de detección de proteínas por Western blot, haciéndolo más sensible para un menor volumen de proteína.
- ✿ En la actualidad, existen varias maneras de detectar las proteínas separadas mediante SDS-PAGE, tales maneras se presentan a continuación, en la **Tabla 5** (Corley, 2004; Ambroz, 2006):

**Tabla 5: Detección de proteínas en Western blot**

(Tomada y modificada de Corley, 2004; Ambroz, 2006)

<b>MÉTODO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<b>Detección colorimétrica</b>	<p>Depende de la incubación de la membrana del Western blot con un substrato que reacciona con una “enzima reportera”, como la peroxidasa, que se une con un anticuerpo secundario. Esto convierte el tinte soluble en una forma insoluble de color diferente que precipita junto a la enzima, y por lo tanto, tiñe la membrana. La tinción de la membrana se detiene lavando el tinte soluble. Los niveles de proteína son evaluados mediante densitometría o espectrofotometría.</p> <p>Este es el método utilizado en este proyecto, aunque debido a la ausencia detectable de bandas de proteína, no se pudo llegar a la evaluación mediante densitometría.</p>
<b>Detección por quimioluminiscencia</b>	<p>Este método yace en una reacción enzimática que produce luz, la cual es captada por una cámara que graba los fotones y los muestra en una imagen basada en la cantidad de luz generada. La reacción enzimática utilizada para producir la luz es dinámica y cambiante en el tiempo, lo cual compromete la cuantificación y precisión.</p> <p>La imagen es analizada por densitometría, que evalúa la cantidad relativa de proteína teñida y cuantifica los resultados en términos de densidad óptica.</p>

<p><b>Detección por fluorescencia</b></p>	<p>La luz producida por la excitación de un tinte fluorescente, puede ser comparada con un foco. Cuando el tinte fluorescente es “encendido” o excitado, la cantidad de luz producida es constante; esto hace la detección por fluorescencia, un método muy preciso de medir las diferencias en la señal producida por anticuerpos marcados unidos a proteínas en Western blot.</p> <p>Las proteínas pueden ser precisamente cuantificadas por la señal generada por la diferente cantidad de proteínas en las membranas; esta señal es medida en estado estático, a diferencia de la quimioluminiscencia, en la que la luz es medida en estado dinámico.</p>
<p><b>Detección por anticuerpos ligados a fluoróforos cercanos al infrarojo (NIR: near-infrared)</b></p>	<p>Otro método de detección de anticuerpo secundario, utiliza un anticuerpo ligado a un fluoróforo que reacciona con luz cercana al infrarojo.</p> <p>La luz producida por la excitación de un tinte fluorescente es estática, haciendo la detección fluorescente más precisa a la diferencia en la señal producida por anticuerpos marcados unidos a proteínas o a Western blots.</p>

✿ De los métodos descritos, el más sensible y preciso es la quimioluminiscencia; a pesar de la desventaja del cambio en el tiempo, este método se sigue utilizando en gran medida, debido a la pobre actuación de los fluoróforos en el espectro visible; es decir, para detectarlos, se necesita equipo especial y costoso. El método NIR, podría cambiar esto, pues combina la precisión de la quimioluminiscencia, con la facilidad de detección de la fluorescencia, se puede apreciar algunos rasgos de esto en la **Tabla 6**:

**Tabla 6: comparación de quimioluminiscencia y NIR en Western blot<sup>§</sup>**

	<b>QUIMIOLUMINISCENCIA</b>	<b>NIR</b>
<b>Sensibilidad</b>	+++	+++
<b>Rango linear dinámico**</b>	10-50 dobleces	>4000 dobleces
<b>Detección multiplex††</b>	No	Si
<b>Estabilidad de la señal</b>	Horas	Meses o años
<b>Conjugado enzimático</b>	HRP	Ninguna
<b>Substrato</b>	Basado en luminol	No se necesita
<b>Documentación/detección</b>	Imagen digital o exposición de película	Imagen digital
<b>Compatibilidad de membrana</b>	Nitrocelulosa o PVDF	Nitrocelulosa o PVDF

<sup>§</sup> Tomada y modificada de: <http://www.licor.com/bio/blog/western-blotting-2/western-blot-detection-method-fluorescence-chemiluminescence-and-colorimetric>

\*\* Relación entre la concentración más alta y más baja.

†† Detección de múltiples blancos proteínicos.

## ANEXOS

### Reactivos

#### Solución de Homogenización (para 250 mL):

EDTA: 0.01 M (0.9305 g)

Tris-base: 600 mM (18.171 g)

KCl: 1 M (18.6375 g)

pH=7.5

#### Soluciones A, B y C de Lowry

##### Solución A (para 500 mL)

NaOH: 2 g

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 10 g

Tartrato de Sodio y Potasio: 0.1 g

Disolver el agua destilada.

##### Solución B (para 100 mL):

CuSO<sub>4</sub>: 0.5 g

##### Solución C:

40 mL de A+0.8 mL de B.

#### Reactivos para Electroforesis (según instrucciones de “Manual de Instrucciones de Mini-Protean 3 Cell”, de Bio-Rad.)

##### Bis-Acrilamida:

Acrilamida: 29.2 g/100 mL (87.6 g).

N'N'-bis-metilén-acrilamida: 0.8 g/100 mL (2.4 g).

Aforar a 300 mL con agua desionizada. Filtrar y almacenar a 4 °C en la oscuridad.

##### Dodecil Sulfato de Sodio (SDS): 10% w/v

10 g SDS en 90 mL de agua desionizada.

Aforar a 100 mL.

1.5 M Tris-HCl pH=8.8

Tris-base: 18.15 g/100 mL (27.23 g).

80 mL de agua desionizada.

Ajustar pH con HCl 6 N para volumen final de 150 mL. Almacenar a 4 °C.

0.5 M Tris-HCl pH=6.8

Tris-base 6 g.

60 mL de agua desionizada.

Ajustar pH con HCl 6 N para volumen total de 100 mL. Almacenar a 4 °C.

Persulfato de Amonio: APS (preparar fresco cada vez)

0.01000 APS.

100 µL de agua desionizada.

Amortiguador de corrida 10x:

Tris-base: 30.3 g.

Glicina: 144 g.

SDS: 10 g.

Disolver y aforar a 1000 mL con agua desionizada. No ajustar pH. Almacenar a 4 °C.

Para utilizar: diluir 50 mL de Amortiguador 10x en 450 mL de agua desionizada.

### **Reactivos para Electrotransferencia.**

Amortiguador Towbin: (para preparar 1 L).

Tris-base: 25 mM (3.0285 g).

Glicina: 192 mM (14.41344 g).

Metanol: 20% (200 mL).

## **Procesamiento de los geles.**

Solución teñidora rápida:

Azul Coomassie R-250: 0.05 g (0.25 g).

Isopropanol: 25% (125 mL).

Ácido acético: 7% (35 mL).

Solución desteñidora rápida:

Isopropanol: 5% (50 mL).

Ácido acético: 7% (70 mL).

Agua desionizada: 880 mL.

## **Reactivos para Inmunodetección.**

PBS 5x pH=7.2-7.4

NaCl: 137 mM (45 g).

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (dibásico, anhidro): 10 mM (7.2 g).

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (monobásico, anhidro): 2 mM (120 g).

Aforar con agua desionizada a 1000 mL.

Amortiguador de incubación:

Tween 20: 0.2% (500 µL).

Leche: 5% (12.5 g).

Disolver en 250 mL de PBS 1x.

Amortiguador de incubación con anticuerpo primario (concentración: 1:100):

30 mL de amortiguador.

300 µL de anticuerpo.

Amortiguador de incubación con anticuerpo secundario (concentración: 1:1000):

30 mL de amortiguador.

30 µL de anticuerpo.



PBS salino:

NaCl: 0.5 M (2.12 g).

SDS 0.2% (0.2 g).

Disolver en PBS 1x.

# Pruebas de función hepática en el Laboratorio Central de Pruebas Especiales del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”

CONTROL DE SUEROS CCL4 PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS		ANÁLISIS DE SUEROS						
		PRUEBAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA						
FIBROSIS	No. DE RATAS	CLAVE	ALT	AST	LD	TBIL	DBIL	BI
CONTROL (ACEITE MINERAL)	3	AI (1)	70	131	240	0.3	0	0.3
		BI (2)	132	342	743	0.4	0.3	0.1
		CI (3)	50	97	222	0.2	0	0.2
FIBRÓTICA (CCL4)	3	DI (4)	180	247	1118	0.4	0.1	0.3
		FI (5)	94	141	768	0.4	0	0.4
		HI (6)	31	97	512	0.2	0.1	0.1
TRATAMIENTO CON FIBROQUEL								
CONTROL (ACEITE MINERAL/CITRATO) 1A SEMANA								
(IP)	1	AIII (7)	46	127	524	0.6	0.3	0.3
(IM)	SIN MUESTRA	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
CONTROL (ACEITE MINERAL/CITRATO) 2A SEMANA								
(IP)	1	AII (8)	66	164	982	0.3	0.1	0.2
(IM)	1	AIV (9)	55	168	692	0.6	0.2	0.4
FIBRÓTICAS (CCL4/CITRATO) 1A SEMANA								
(IP)	2	EII (10)	37	99	402	0.7	0.2	0.5
		EV (11)	58	101	227	0.5	0.1	0.4
(IM)	2	DII (12)	63	116	205	0.4	0.1	0.3
		DV (13)	171	330	1786*	0.6	0.3	0.3
FIBRÓTICAS (CCL4/CITRATO) 2A SEMANA								
(IP)	2	EIII (14)	127	241	***	2.4	1.1	1.3
		EIV (15)	66	138	307	0.4	0.1	0.3
(IM)	2	DIII (16)	74	179	593	0.9	0.3	0.6
		DIV (17)	60	127	245	0.6	0.1	0.5
CONTROL (ACEITE MINERAL/FBQ) 1A SEMANA								
(IP)	2	CII (18)	52	105	222	0.5	0.1	0.4
		CV (19)	41	88	119	0.4	0.1	0.3
(IM)	2	BII (20)	61	119	293	0.4	0.1	0.3
		BV (21)	49	98	215	0.1	0.1	0
CONTROL (ACEITE MINERAL/FBQ) 2A SEMANA								
(IP)	2	CIII (22)	***	***	***	2.5	1.2	1.3
		CIV (23)	53	125	668	0.7	0.3	0.4
(IM)	2	BIII (24)	73	221	2148"	1.3	0.5	0.8
		BIV (25)	55	146	597	0.6	0.4	0.2
FIBRÓTICAS (CCL4/FBQ) 1A SEMANA								
(IP)	3	FV (26)	43	104	283	0.3	0.1	0.2
		GV (27)	56	120	173	0.4	0.1	0.3
		HV (28)	48	97	162	0.6	0.1	0.5
(IM)	3	FII (29)	57	105	223	0.6	0.1	0.5
		GII (30)	43	100	204	0.3	0.1	0.2
		HII (31)	51	93	177	0.5	0.1	0.4
FIBRÓTICAS (CCL4/FBQ) 2A SEMANA								
(IP)	3	FIV (32)	58	106	192	0.6	0.1	0.5
		GIV (33)	71	130	357	0.7	0.1	0.6
		HIV (34)	59	117	320	0.6	0.1	0.5
(IM)	3	FIII (35)	56	116	284	0.6	0.2	0.4
		GIII (36)	59	100	194	0.7	0.1	0.6
		HIII (37)	71	128	554	1	0.3	0.7
SUBTOTAL								
	37							
*DILUCIÓN 1:4								
***Muestra insuficiente para realizar dilución (valor elevado)								
"DILUCIÓN 1:3								

## REFERENCIAS

1. Aguirre Botello, M. (comp.) 2016. **México, principales causas de mortalidad 1938-2014**. En internet <http://www.mexicomaxico.org/Voto/MortalidadCausas.htm>
2. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. 2002. **Molecular Biology of the Cell**. 4ª ed. Garland Science. EUA. 1463 pp.
3. Alfaro Moreno, E., C. G. Cuéllar y A. D. González, **Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones**. Rev Inst Nal Cancerol (Mex) 2000; 46 (4).
4. Ambroz, K. L. H. **Improving Quantification Accuracy For Western Blots**. Image Analysis, suppl. (09), 2006.
5. Anand, B. S. **Cirrhosis of liver**. WJM. 1999 Ago; 171: 110-115.
6. Bataller, R., D. A. Brenner. **Liver Fibrosis**. J Clin Invest. 115:209–218 (2005). doi: 10.1172/JCI200524282.
7. Beljaars, L., D. K. F. Meijer, K. Poelstra. **Cap. 25. Drug Targeting to Hepatic Stellate Cells: A New Strategy to Treat Liver Fibrosis**. En Ali, S., S. L. Friedman, D. A. (Eds.), *Liver Diseases. Biochemical mechanisms and New Therapeutic Insights*. Mann. Science Publishers. Vols. I y II. EUA. 2005. 459-474.
8. Benítez Bribiesca, L. **La cirrosis hepática. ¿Puede ser reversible?** Acta Médica Grupo Ángeles. Volumen 1, No. 1, enero-marzo 2003: 37-39.
9. Crawford, J. M. 2002. **Liver cirrhosis**. En MacSween, R. N. M., A. D. Burt, B. C. Portmann, K. G. Ishak, P.J. Scheuer, P. P. Anthony (Eds.), *Pathology of the Liver*. 4ª ed. Churchill Livingstone. UK. 928 pp.
10. Canbay, A., S. Friedman y G. J. Gores. **Apoptosis: The Nexus of Liver Injury and Fibrosis**. Hepatology. Vol. 39, No. 2, 2004.

11. Cervantes-Sánchez, C. R., E. Olaya, M. Testas, N. García-López, G. Coste, G. Arrellin, A. Luna, F. E. Krötzsch. **Collagen-PVP, a Collagen Synthesis Modulator, Decreases Intraperitoneal Adhesions.** Journal of Surgical Research 110, 207–210. 2003. doi: 10.1006/jsre.2002.6596.
12. Chang Y. J., Hsu SL, Liu Y. T., Lin Y. H., Lin MH, Huang S. J., *et al.* **Gallic Acid Induces Necroptosis via TNF- $\alpha$  Signaling Pathway in Activated Hepatic Stellate Cells.** PLoS ONE 10(3): e0120713. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0120713
13. Choi, H-S., *et al.*, **Melatonin attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via inhibition of necroptosis.** Translational Research. Vol. 166, No. 3. Sept. 2015. 292-303. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2015.04.002>.
14. Chu, K., X. Niu, L. T. Williams. **A Fas associated protein factor, FAF-1, potentiates Fas-mediated apoptosis.** Proc. Natl. Acad. Sci. Cell Biology. USA. Vol. 92, pp. 11894-11898, December, 1995.
15. Estrada Flores, E. y Ma. del C. Uribe Aranzábal. 2002. **Atlas de Histología de Vertebrados.** Las Prensas de Ciencias-UNAM. México. 222 pp.
16. Friedman, S. L. **Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver.** *Physiol Rev* 88: 125–172, 2008. doi:10.1152/physrev.00013.2007.
17. Friedman, S. L. **Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis.** Gastroenterology 2008; 134:1655-1669.
18. Furuzawa-Carballeda, *et al.*, **Mediators of inflammation are down-regulated while apoptosis is up-regulated in rheumatoid arthritis synovial tissue by polymerized collagen.** Clin. Exp. Immunol. 2002; **130**: 140-149.
19. Furuzawa-Carballeda, J., *et al.*, **Cellular and humoral responses to collagen-polyvinylpyrrolidone administered during short and long periods in humans.** Can. J. Physiol. Pharmacol. 81: 1029–1035 (2003), doi: 10.1139/Y03-101.
20. Furuzawa-Carballeda, J., P. M. Macip-Rodríguez, D. Cruz-Robles, V. Soto-Abraham, M.I. Vargas-Rojas, M. Díaz-Zamudio, S. Godina-Gonzalez, D. Alpizar-Rodríguez, L. Limón-Camacho

- y S. Escobar-Hernandez. **Anti-inflammatory Effect of Polymerized Type-I Collagen (Polymerized-IClg) vs. Others Modified Extracellular Matrix Proteins (MECMPs) in CIA.** Memorias del 13er Congreso Internacional de Inmunología–ICI. Rio de Janeiro, Brasil, Agosto 21-25, 2007.
21. Ghiassi-Nejad, Z. y S. L. Friedman. **Advances in Anti-fibrotic Therapy.** Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2008 December; 2(6): 803–816. doi: 10.1586/17474124.2.6.803
22. González Arenas, Nelly. **Estudio de los efectos *in vitro* de la colágena-polivinilpirrolidona sobre las células estelares hepáticas murinas.** Tesis inédita. UNAM, 2011, 47pp.
23. Guicciardi, M. D. y G. J. Gores. **Apoptosis as Mechanism for Liver Disease Progression.** Semin Liver Dis. 2010 November; 30(4): 402–410. doi: 10.1055/s-0030-1267540.
24. Higgs, B. W. *et al.* **Modeling the effects of a Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) on the apoptosis pathway.** BMC Microbiology 2006, 6:48. doi:10.1186/1471-2180-6-48.
25. Issa, R., *et al.* **Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors.** Gut 2001;48:548–557.
26. Izázkun G. Penilla, Acasuso, M. G. Marín González, E. K. Gómez, R. M. Salgado Curiel, S. Cano Colín., **Efectos de la mezcla de colágena-PVP, sobre el metabolismo y proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos cultivados.** Revista Odontológica Mexicana 2008; 12 (4): 184-191.
27. Jiménez, L. F y H. Merchant. 2003. **Biología Celular y Molecular.** Pearson Educación. México. 912 pp.
28. Jingjing, J., S. L. Friedman, C. Aloman. **Hepatic Fibrosis.** Curr Opin Gastroenterol. 2009 May; 25(3): 223–229.
29. Kang, D., Y. S. Gho, M. Suh y C. Kang, **Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis,** Bull. Korean Chem. Soc. 2002, Vol. 23, No. 11.

30. Kindt, T. J., R. A. Goldsby, B. A. Osborne, 2007. **Inmunología de Kuby**. 6a ed. McGraw Hill. México. 674 pp.
31. Klein Moreira, R. **Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis**. Arch Pathol Lab Med. 2007; 131:1728–1734.
32. Krötzch-Gómez, F. E., J. Furuzawa-Carballeda, R. Reyes-Márquez, E. Quiroz-Hernández, L. Díaz de León. **Cytokine Expression is Downregulated by Collagen-Polyvinilpyrrolidone in Hypertrophic Scars**. Journal of Investigative Dermatology, Vol. 111. No. 5. Nov. 1998, 828-834.
33. Leyva-Gómez, G. *et al.*. **Physicochemical and Functional Characterization of the Collagen–Polyvinilpyrrolidone Copolymer**. J. Phys. Chem. B 2014, 118, 9272–928. [3dx.doi.org/10.1021/jp502476x](https://doi.org/10.1021/jp502476x)
34. Li-Cor, Bio blog. **Which Western Blot Detection Method Should You Use?** Modificada en septiembre 26, 2012. 2011-2016. Inc. <http://www.licor.com/bio/blog/western-blotting-2/western-blot-detection-method-fluorescence-chemiluminescence-and-colorimetric>
35. Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, *et al.* 2004. **Molecular Cell Biology**. 5ª ed. W. H. Freeman and Company. Nueva York. EUA. 973 pp.
36. Louka L. M. y M. Ramzy. **Involvement of fibroblast-specific protein 1 (S100A4) and matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) in CCl<sub>4</sub>-induced reversible liver fibrosis**. Gene 579 (2016) 29–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.042>.
37. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. **Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent**. J. Biol. Chem. 1951 193: 265-275.
38. Malhi, H. y Gores, G. J. **Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury**. Gastroenterology. 2008 May; 134(6): 1641–1654. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.002.
39. Mohan, C. **Updating the Signal Transduction in Apoptosis**. Presentación Oral. Expo-Merck. México. 2011.

40. Moriwaki, K., F. K-M, Chang. **Regulation of RIPK3 and RHIM-dependent necroptosis by the proteasome.** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 291, No. 11, pp. 5948–5959, March 11, 2016 doi: 10.1074/jbc.M115.700997.
41. Muhanna, N., S. Doron, O. Wald, A. Horani, A. Eid, O. Pappo, S. L. Friedman, R. Safadi. **Activation of Hepatic Stellate Cells after Phagocytosis of Lymphocytes: a Novel Pathway of Fibrogenesis.** Hepatology. 2008 September; 48(3): 963–977. doi:10.1002/hep.22413.
42. Nelson, D. L. y M. M. Cox. 2015. **Lehninger Principios de Bioquímica.** 6ª ed. Omega. España. 1196 pp.
43. Pintor Elizalde, R. **Estudio del probable efecto antifibrótico del compuesto colágena-polivinilpirrolidona sobre la fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono, en ratas Wistar.** Tesis inédita. UNAM. 2013. 66pp.
44. Pope, R. M. **Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis.** Nature Reviews Immunology 2, 527-535 (July 2002) doi:10.1038/nri846.
45. Protocols book. 2013-2014. 82pp. <http://docs.abcam.com/pdf/misc/abcam-protocols-book-2010.pdf>
46. Ross, M. H. y W. Pawlina. 2008. **Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular.** 5ª ed. 2ª reimp. Médica Panamericana. Buenos Aires. 992 pp.
47. Secretaría de Salud. **Programa Nacional de Salud 2007-2012.** México. 2007. 185 pp.
48. Sun, M. y T. Kisseleva. **Reversibility of liver fibrosis.** Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 2015, 39, S60—S63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinre.2015.06.015>.
49. Taura, K., K. Iwaisako, E. Hatano, S. Uemoto. **Controversies over the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Liver Fibrosis.** J. Clinical Medicine 2016, 5, 9; doi:10.3390/jcm5010009
50. Wu, W., Liu, P., Li J., **Necroptosis: An emerging form of programmed cell death.** Critical Reviews in Oncology/Hematology 82 (2012) 249–258. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.08.004.

51. Yoon J. H y G. J. Gores. **Death Receptor-Mediated Apoptosis and the Liver.** Journal of Hepatology 37 (2002) 400–410.