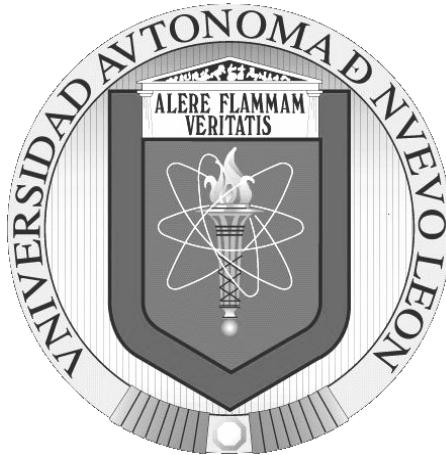


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES
RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA
DESENCADENADA POR EL EXTRACTO
ESTANDARIZADO DE *TURNERA DIFFUSA* EN CÉLULAS
ESTELARES HEPÁTICAS HUMANAS (CEHH-LX2).**

Por

M.C. DIANA RAQUEL RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de Doctor en Ciencias con Orientación
en Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

Enero, 2021

Evaluación de los mecanismos moleculares relacionados con la actividad hepatoprotectora desencadenada por el extracto estandarizado de *Turnera diffusa* en células estelares hepáticas humanas (CEHh-LX2).

Aprobación de tesis:

Presentado por:

DRA. C. ANA MARÍA G. RIVAS ESTILLA
Director de tesis

DRA. C. PAULA CORDERO PÉREZ
Co-director de tesis

DRA. C. NOEMI WAKSMAN DE TORRES
Miembro de la comisión de tesis

DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES
Miembro de la comisión de tesis

DRA. C. SONIA AMELIA LOZANO SEPÚLVEDA
Miembro de la comisión de tesis

DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ
Sub-Director de Estudios de Posgrado

Evaluación de los mecanismos moleculares relacionados con la actividad hepatoprotectora desencadenada por el extracto estandarizado de *Turnera diffusa* en células estelares hepáticas humanas (CEHh-LX2)

Presentado por:

M.C. Diana Raquel Rodríguez Rodríguez

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Ana María G. Rivas Estilla y la co-dirección de la Dra. Paula Cordero Pérez.

Director de tesis



DRA. C. ANA MARÍA G. RIVAS ESTILLA

Co-director de tesis



DRA. C. PAULA CORDERO PÉREZ

Dedicatoria

A Dios, porque en su amor y gracia puedo descansar.

A mi familia:

A mi mamá María de Jesús, mujer cariñosa que siempre esta al pendiente de mi, que en todo momento me ha dado su apoyo incondicional, cariño y consejos, y a mi papa Silvestre. Sin ellos no hubiera llegado hasta este punto de mi vida.

A mi hermana Luisa Elena Rodriguez Rodriguez, una mujer inteligente, fuerte y sensata, entre muchas de sus cualidades que admiro, gracias por tu apoyo, gracias por todo.

A mi cuñado Jesus Siller Davila que incontables veces me ha dado refugio en su hogar para estar en compañía de mi mama María, mi hermana Luisa y mis sobrinas Valentina y Regina.

A mis pequeñas y hermosas sobrinas, Regina Melissa Siller Rodriguez y Valentina Lucia Siller Rodriguez, quienes me brindaron mucha alegría, confort, cariño y descanso.

A la Dra. Paula Cordero:

Estoy infinitamente agradecida por todo su apoyo, permitirme trabajar con usted y hacer el doctorado; por siempre ver la forma de apoyarme y ayudarme en todas las maneras posibles, desde formación personal hasta académica y laboral.

Agradecimientos

A mi comisión de tesis, gracias por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto, por la confianza y apoyo que me brindaron en todo momento. Y a los departamentos de Bioquímica y Medicina Molecular, Química Analítica y Unidad de Hígado que me permitieron acceso a sus instalaciones y equipos, así como al personal que labora en estos.

A la Dra. Ana María Rivas Estilla por su guía y enseñanzas.

A la Dra. Paula Cordero por su apoyo y consejos, por estar siempre en la disposición de ayudarme y su gran calidad humana.

A la Dra. Noemi Waskman por su disposición por ayudarme, haberme permitido participar en este proyecto y brindarnos el EETD.

A la Dra. Cecilia Delgado por su disposición a introducirme en este proyecto y su apoyo en darnos acceso al EETD.

Al Dr. Alberto Camacho por su disposición en participar en este proyecto y el apoyo brindado.

A la Dra. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda y Dra. Natalia Martínez por su apoyo incondicional, como amigas y compañeras de trabajo.

A la Unidad de Hígado y todo su equipo de trabajo, en especial al personal de laboratorio: Q.C.B. Catalina Lucila Treviño, Dra. Diana P. Moreno y Dra. Liliana Torres, por su apoyo para trabajar con ustedes mientras realizaba el doctorado.

A todo el equipo del laboratorio de Infectología Molecular M.C. Magda Vera, Dr. Kame A. Galan, Dr. Daniel Arellanos, M.C. Tanya Salas, M.C. Mayra Melendez y Lic Mario.

Además a todas las personas que en algún momento intervinieron en el trayecto de mi vida en especial en esta parte: M.C. Alan Marquez, Esp. H. Maria G. Cepeda Cepeda, M.C. Angel Zuñiga, Norma Estrella, Dra. Marsela Garza, Q.C.B. Iris Torres y Q.C.B. Dalia Muñoz.

Tabla de contenido

CAPITULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL HÍGADO	1
1.2 DAÑO HEPÁTICO.....	6
1.3 FIBROSIS HEPÁTICA	7
1.4 LESIÓN EPITELIAL Y LA RESPUESTA INFLAMATORIA.....	9
1.5 CÉLULAS PRECURSORAS DE MIOFIBROBLASTOS HEPÁTICOS. LAS CEH.....	10
1.6 ACTIVACIÓN DE LAS CEH.....	15
1.7 FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE B (TGF-B).....	18
1.8 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).....	20
1.9 METALOPROTEINASA (MMPs)	25
1.10 INHIBIDORES TISULARES DE LAS METALOPROTEINASA (TIMPs).....	27
1.11 MITOCONDRIA.....	30
1.12 ESTRATEGIAS ANTIFIBRÓTICAS	33
1.13 PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIFIBROTICA.....	34
1.13.1 <i>TURNERA DIFFUSA</i>	37
1.14 FLAVONOIDES	39
1.15 MODELOS DE ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE CEH	40
CAPITULO 2	45
2.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	45
2.2 HIPÓTESIS.....	47
2.3 OBJETIVO GENERAL.....	47
2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
CAPITULO 3	49
MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1 CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTOS	49
3.1.1 CONTEO CELULAR (TINCIÓN POR EXCLUSIÓN).....	50
3.1.2 CONGELAMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES	51
3.1.3 DESCONGELAMIENTO CELULAR.....	51
3.1.4 SUBCULTIVO CELULAR	52
3.2. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.....	53
3.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS E INMUNOTRANSFERENCIA.....	53
3.3.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	53
3.3.2. CUANTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DE BRADFORD	54
3.3.3. SDS-PAGE	56
3.3.4. TRANSFERENCIA	57
3.3.5. TINCIÓN ROJO DE PONCEAU.....	58
3.3.6. WESTERN BLOT.....	58
3.3.7. REMOCIÓN DE ANTICUERPOS (STRIPPING OUT)	60
3.4 EXTRACCIÓN DE RNA.....	60
3.5 CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL Y cDNA	62
3.6 RETROTRANSCRIPCIÓN Y qPCR PARA LA DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>COL1-A1, A-SMA, TGF-B1, MMP2, MMP9, TIMP1, MFN2</i> Y <i>B-ACTINA</i>	63
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
CAPITULO 4	68

RESULTADOS.....	68
4.1 EVALUACIÓN DEL EETD EN LA VIABILIDAD CELULAR DE HEPG2.	68
4.2 EVALUACIÓN DEL EETD, TGF-B, SILIBININA Y ETANOL EN LA VIABILIDAD CELULAR DE LX-2.....	70
4.3 ESTABLECIMIENTO DEL MODELO DE ACTIVACIÓN CON TGF-B1 Y ETANOL EN LA LÍNEA CELULAR LX-2.....	75
4.4 LOS EFECTOS DEL EETD EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES <i>COL1A1</i> Y <i>A-SMA</i> EN LA LÍNEA CELULAR LX-2 EN PRESENCIA DE TGF-B1 Y ETANOL EN DOS MODELOS DISTINTOS. ...	77
4.4.1 LOS EFECTOS DEL EETD EN LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES <i>COL1A1</i> Y <i>A-SMA</i> EN EL TRATAMIENTO DE EFECTO PRE-EXPOSICIÓN AL EETD Y POSTERIOR A LOS INDUCTORES DE ACTIVACIÓN TGF-B1 O ETANOL.	78
4.4.2 LOS EFECTOS DEL EETD EN LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES <i>COL1A1</i> Y <i>A-SMA</i> EN EL TRATAMIENTO DEL EFECTO DE MODULACIÓN DE DAÑO CAUSADO POR LOS INDUCTORES DE ACTIVACIÓN Y POSTERIOR EXPOSICIÓN AL EETD.....	83
4.5 EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS A-SMA Y TIMP1 EN PRESENCIA DE TGF-B1 A 5 NG/ML Y ETANOL A 75 Y 100 MM.....	88
4.6 EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR DE LX-2 EN PRESENCIA DE EETD A 200 µG/ML Y TGF-B1 A 10 NG/ML.	91
4.7 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES TGF-B, COL1A1, A-SMA, MMP2, TIMP1, MFN2 Y SNAI1 EN PRESENCIA DEL EETD A 100 O 200 µG/ML Y TGF-B1 A 10 NG/ML EN CELULAS LX-2.....	92
4.7.1 EL EETD ATENÚA LOS MARCADORES DE EXPRESIÓN FIBROGÉNICA EN CÉLULAS LX-2.	93
4.7.2 EL EETD MODULA LA EXPRESIÓN DE TIMP1.	97
4.7.3 EL EETD AUMENTA LA EXPRESIÓN DE MRNA DE SNAI1.	99
4.7.4 EL EETD MODULA LA EXPRESIÓN DE MFN2.	100
CAPITULO 5.....	102
DISCUSIÓN	102
CAPITULO 6.....	116
CONCLUSIONES.....	116
CAPITULO 7.....	119
BIBLIOGRAFÍA.....	119

RESUMEN

M.C. Diana Raquel Rodríguez Rodríguez

Fecha: Enero 2021

Título del estudio: Evaluación de los mecanismos moleculares relacionados con la actividad hepatoprotectora desencadenada por el extracto estandarizado de *Turnera diffusa* en células estelares hepáticas humanas (CEHh-LX2).

No. de páginas: 132 Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Área de estudio: Laboratorio de Infectología del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL.

Introducción. Entre la gran diversidad de mecanismos y células que intervienen en la fibrosis la activación de las células estelares hepáticas es la base celular para su establecimiento. Las plantas son fuentes importantes de compuestos bioactivos en búsqueda de fármacos que reviertan y/o inhiban el proceso fibrogénico. El extracto estandarizado de *Turnera diffusa* (EETD) ha mostrado actividad hepatoprotectora. **Objetivo.** Estudiar los mecanismos moleculares relacionados con la actividad de hepatoprotección desencadenada por la exposición al EETD en células estelares hepáticas humanas (LX-2). **Material y métodos.** Se evaluó la IC50 del EETD en las células LX-2 mediante ensayo de MTT. Las células LX-2 fueron expuestas a EETD (100-200 µg/mL) con y sin factor de crecimiento tumoral beta (TGF-β1) a 10 ng/mL por 24, 48 y 72 h. Se extrajo RNA y proteínas, se realizó RT-PCR, qPCR y WB, se evaluó expresión relativa del TGF-β, colágeno 1α1 (COL1α1), alfa actina de musculo liso (α-SMA), inhibidor de la metaloproteínasa 1 (TIMP1), metaloproteínasa 2 (MMP2), SNAI1 un marcador de transición epitelio mesenquimal (TEM) y mitofusina 2 (MFN2) de fusión mitocondrial. Gen endógeno β-actina y GAPDH. Análisis por ANOVA y t de student (p <0.05). **Resultados.** El EETD a concentración de 150 µg/mL mantuvo mas del 80% de viabilidad en las células LX-2. La presencia del EETD en las células tratadas con TGF-β1 modificó los marcadores fibrogénicos disminuyendo la expresión de RNA de *COL1α1*, aumentó la expresión de RNA de TGF-β y α-SMA en todos los tiempos, aumentó la expresión traduccional de TGF-β, pero disminuyó la expresión traduccional de α-SMA a 48 y 72h. Se encontró sobreexpresión de RNA de *TIMP1* y *MMP2*, y disminución de la expresión traduccional de TIMP1 en todos los tiempos. Se encontró sobreexpresión de RNA de *SNAI1* y *MFN2*, controversialmente disminuye expresión traduccional de MFN2 en todos los tiempos. **Conclusiones.** El EETD modula la vía de TGF-β a través de la sobreexpresión de ésta (sobreexpresión de RNA y proteína). El EETD disminuye la expresión de mRNA-*COL1α1* y traduccional de marcadores profibróticos como α-SMA y TIMP1, lo que podría implicar que disminuye el proceso fibrótico a pesar de la sobreexpresión de TGF-β. Uno de los probables mecanismos de acción del EETD podría ser a través de inducir la apoptosis de las CEH activadas, debido a la sub-expresión traduccional de MFN2 y TIMP1; sin embargo, se sugiere evaluar otros marcadores para determinar el efecto total del EETD en las células LX-2.

Director de tesis



Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1.	Posición del hígado en el cuerpo humano.	2
Figura 2.	El microambiente hepático.	5
Figura 3.	Historia natural de la enfermedad hepática crónica.	7
Figura 4.	Resumen de las principales moléculas de MEC que se encuentran en el hígado normal y fibrótico.	22
Figura 5	Un mecanismo molecular propuesto por Rockey et. al. subyacente al efecto de α -SMA sobre la diferenciación de miofibroblastos hepáticos y la fibrogénesis hepática.	24
Figura 6.	Diagrama Esquemático de la regulación de integrinas y MMPs durante apoptosis endotelial.	27
Figura 7.	TIMPs, sus blancos y la superposición con la función celular.	29
Figura 8.	Estructura y función mitocondrial.	31
Figura 9.	Resultados obtenidos de la evaluación de <i>T. diffusa</i> por el grupo de investigación.	38
Figura 10.	Cámara de Neubauer.	50
Figura 11.	Efecto del EETD en la viabilidad celular de HepG2 a las 24 h.	69
Figura 12.	Efecto de TGF- β 1, etanol y silibinina en la viabilidad celular de LX-2 hasta las 72h.	72
Figura 13.	Efecto del EETD sobre la viabilidad celular de LX-2.	74
Figura 14.	Efecto de TGF- β 1 en la expresión de α -SMA y <i>COL1α1</i> en células LX-2.	76
Figura 15.	Efecto de etanol en la expresión de α -SMA y <i>COL1α1</i> en células LX-2.	77
Figura 16.	Esquema de tipos de tratamiento en células LX-2.	78
Figura 17.	Expresión de α -SMA y <i>COL1α1</i> en el modelo de pre-exposición al EETD con TGF- β 1 (1 ng/mL) como inductor de activación en células LX-2.	80

Figura 18.	Expresión de α -SMA y COL1 α 1 en el modelo de pre-exposición al EETD con etanol (50 nM) como inductor de activación en células LX-2.	82
Figura 19.	Expresión de α -SMA y COL1 α 1 en presencia de EETD en un esquema de pre-tratamiento con TGF- β 1 en células LX-2.	85
Figura 20.	Expresión de α -SMA y COL1 α 1 en presencia de EETD en un esquema de pre-tratamiento con etanol en células LX-2.	87
Figura 21	Expresión proteica de α presión proteica de TGF- β 1 o etanol en células LX-2.	89
Figura 22	Expresión proteica de TIMP1 en presencia de TGF- β 1 o etanol en células LX-2.	90
Figura 23	Efecto del EETD sobre la morfología de células LX-2 tratadas con TGF- β 1 y EETD.	92
Figura 24	Efecto de EETD sobre la expresión de TGF- β en células LX-2 tratadas con TGF- β 1.	94
Figura 25	Efecto de EETD sobre α -SMA y COL1 α 1 en células LX-2 tratadas con TGF- β 1.	96
Figura 26	Efecto de EETD sobre MMP2 y TIMP1 en células LX-2 tratadas con TGF- β 1.	98
Figura 27	Efecto de EETD sobre SNAI1 en células LX-2 tratadas con TGF- β 1.	99
Figura 28	Efecto de EETD sobre MFN2 en células LX-2 tratadas con TGF- β 1.	101
Figura 29	Resumen gráfico de los hallazgos mas importantes encontrados en este trabajo.	114

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 1.	Tipos celulares hepáticos y su proporción.	3
Tabla 2.	Repertorio de citocinas y receptores de membrana asociados con CEH.	13
Tabla 3.	Clasificación de las MMPs.	25
Tabla 4.	Plantas y hongos con actividad hepatoprotectora.	36
Tabla 5.	Parámetros evaluados y valores esperados para EETD.	39
Tabla 6.	Líneas celulares inmortalizadas de CEH de ratón, rata y humano, y sus características bioquímicas.	43
Tabla 7.	Preparación de curva estándar de BSA.	55
Tabla 8.	Preparación del gel de poliacrilamida concentrador.	56
Tabla 9.	Preparación del gel de poliacrilamida separador.	56
Tabla 10.	Tabla de anticuerpos utilizados y dilución a la que se trabajan.	59
Tabla 11.	Condiciones de reacción para RT-PCR (M-MLV) a partir de RNA total con oligonucleótidos random y MMLV.	64
Tabla 12.	Programa utilizado para RT-PCR (MMLV) a partir de RNA total con oligonucleótidos random y MMLV.	64
Tabla 13.	Oligonucleótidos utilizados en qPCR.	65
Tabla 14.	Condiciones de reacción específicas para qPCR a partir de cDNA de los genes <i>COL1α1</i> , <i>α-SMA</i> , <i>TGF-β1</i> , <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> , <i>TIMP1</i> , <i>MFN2</i> y <i>β-actina</i> .	66
Tabla 15	Programa utilizado para la qPCR a partir de cDNA de los genes <i>COL1α1</i> , <i>α-SMA</i> , <i>TGF-β1</i> , <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> , <i>TIMP1</i> , <i>MFN2</i> y <i>β-actina</i> .	67
Tabla 16.	Viabilidad celular mediante el ensayo de MTT en la línea celular LX-2 de compuestos evaluados hasta 72 h.	75
Tabla 17.	Resumen del efecto del EETD (100 y 200 μ g/mL) en las células LX-2 tratadas con TGF- β 1 (10 ng/mL).	106

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 El hígado

El hígado es la glándula mas grande del cuerpo y es el órgano responsable del procesamiento de los aminoácidos, carbohidratos, lípidos, vitaminas, síntesis de proteínas y la destoxificación de los productos de desecho, por tanto del mantenimiento de la homeostasis metabólica (Boyer, Wright and Manns, 2006). Además es un órgano inmunorregulador en el que un micro-entorno tolerogénico mitiga la "fuerza" relativa de las respuestas inmunitarias locales (Demetris *et al.*, 2016). En el adulto pesa en promedio aproximadamente 1500 g, lo que constituye el 2.5% del peso corporal total (Si-Tayeb, Lemaigre and Duncan, 2010; Juza and Pauli, 2014). Es un órgano intratorácico que ocupa el espacio inferior derecho y una parte del diafragma izquierdo, se encuentra detrás de las costillas y cartílagos costales, está envuelto por una membrana fibrosa conocida como la cápsula de Glisson (Juza and Pauli, 2014) (figura 1).

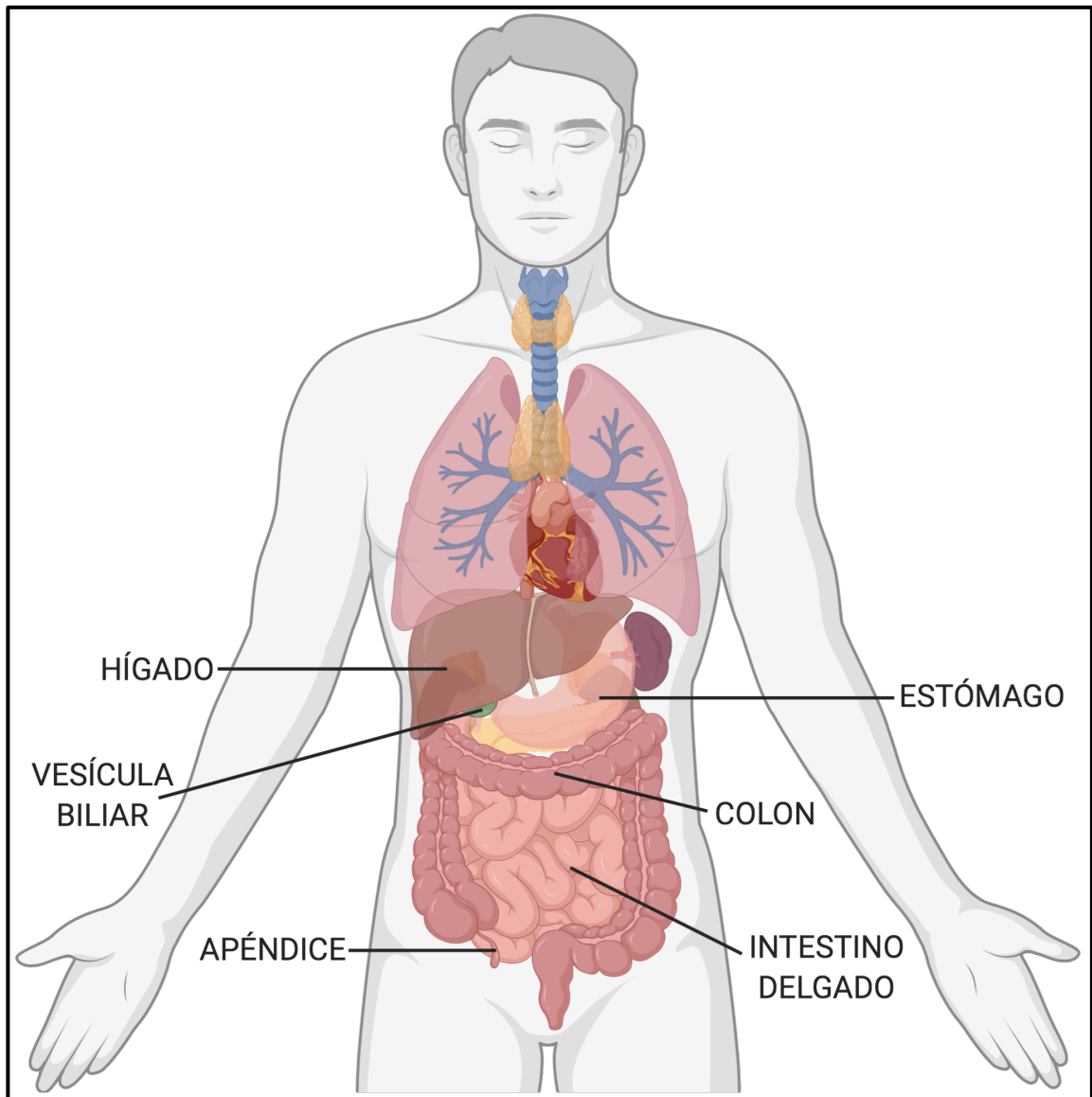


Figura 1. Posición del hígado en el cuerpo humano. En la figura se observa la posición de diferentes órganos en el cuerpo humano, entre ellos el hígado. Creado con BioRender.com

El hígado está compuesto principalmente por células especializadas clasificables en tipos parenquimatosas o hepatocitos, representando un 80% del total celular, y el 20% restante por células no parenquimatosas (células estelares, endoteliales sinusoidales, de Kupffer, epiteliales biliares y del sistema inmune como linfocitos y leucocitos) (Godoy *et al.*, 2013) (tabla 1). Los hepatocitos representan la mayor parte de la masa hepática, y

están delimitados por células endoteliales que conforman los sinusoides. Entre el parénquima (cordones de hepatocitos) y las células sinusoidales endoteliales se localiza el espacio de Disse (Henderson and Forbes, 2008; Godoy *et al.*, 2013), en el cual se encuentra una mezcla organizada de proteínas denominada matriz extracelular (MEC) que constituye alrededor del 0.5 % del peso total del hígado y que es el sostén para las células parenquimatosas y, a su vez, refuerza la arquitectura del órgano. En este espacio, e incluidas en la MEC, se encuentran las células estelares hepáticas (CEH) (Geerts, 2001; Demetris *et al.*, 2016).

Tabla 1. Tipos celulares hepáticos y su proporción.

Tipo celular	Función	Porcentaje
Células de parénquima		
Hepatocitos	Tipo de célula principal del hígado. Síntesis, almacenamiento, degradación de sustancia portal, metabolismo, función endocrina y exocrina.	80% 100%*
Células de no-parenquima		
Células endoteliales sinusoidales	El plexo fenestrado permite la comunicación de la sangre portal con los hepatocitos.	20% 48%
Células de Kupffer	Fagocitos del hígado, liberan citocinas	29%
Células estelares	Función en la regeneración después de una lesión, precursor de miofibroblastos, almacenamiento de vitamina A.	20%
Colangiocito	Transporta bilis, secreta bicarbonato y agua.	¿3?

Tabla tomada de Juza *et. al.* y Laskin (Laskin, 1990; Juza and Pauli, 2014).

*100% correspondiente a las células de parénquima únicamente.

Las células del parénquima hepático, es decir los hepatocitos, constituyen el compartimento celular principal del hígado y realizan la mayoría de las funciones hepáticas (Kmieć, 2001), funciones de síntesis, almacenamiento y filtración de la sangre venosa portal (Alberts *et al.*, 2007). Los hepatocitos están dispuestos en cordones de células que rodean los capilares sinusoidales individuales (Malarkey *et al.*, 2005), que a

su vez forman lóbulos hexagonales, y las ramas de la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar se disponen en la periferia de cada lóbulo para formar una tríada portal (Si-Tayeb, Lemaigre and Duncan, 2010). Los lóbulos tienen capilares sinusoidales de pared delgada que drenan la tríada portal hacia una vena central. Cada capilar sinusoidal está revestido con células endoteliales fenestradas especializadas (células endoteliales sinusoidales) a través de las cuales la sangre portal puede comunicarse con los hepatocitos adyacentes. Estas no tienen una membrana basal regular y, a menudo, se ven afectados por los procesos citoplasmáticos de las CEH subyacentes, constituyen una importante barrera de filtración entre macromoléculas y células sanguíneas presentes en la luz sinusoidal y los hepatocitos que impiden su contacto directo y determinan el intercambio de diversas sustancias. Las células endoteliales sinusoidales poseen una gran capacidad pinocitótica y endocítica debido a la presencia de numerosos receptores de membrana plasmática. También participan activamente en las funciones inmunológicas del hígado (Kmieć, 2001). Las células de Kupffer son macrófagos hepáticos especializados con funciones inmunológicas y fagocíticas (Naito, Hasegawa and Takahashi, 1997), tales como la eliminación de sustancias extrañas y la regulación de la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Las células epiteliales de las vías biliares transportan la bilis y regulan su pH (Bogert and LaRusso, 2007). Finalmente las CEH son típicamente inactivas, pero son parte integral del proceso patológico de remodelación del hígado asociado con la fibrosis hepática (figura 2) (Geerts, 2001).

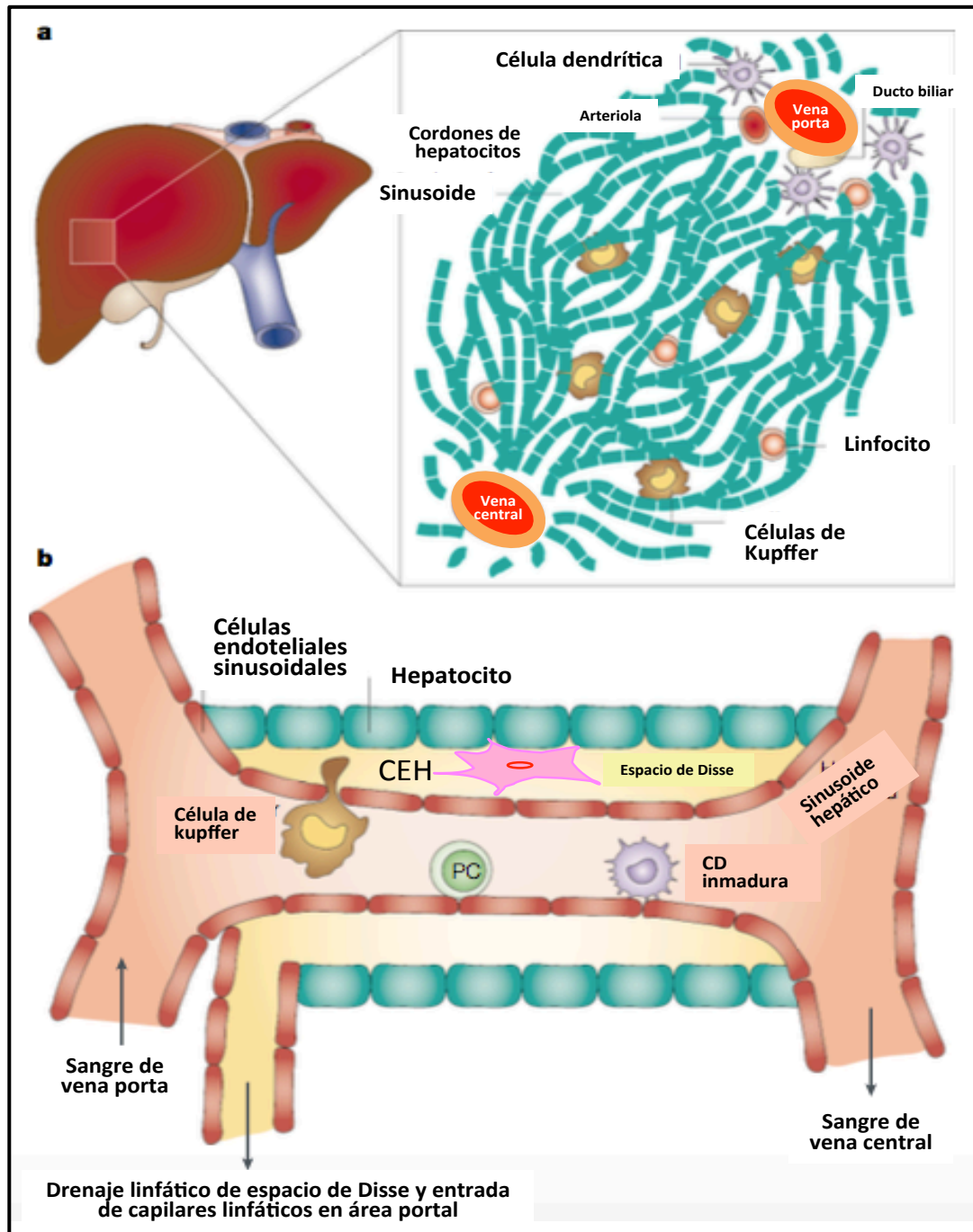


Figura 2. El microambiente hepático. a) Diagrama que muestra la estructura de un lóbulo hepático. b) Organización de sinusoides. El sinusoide está revestido por un endotelio (células endoteliales sinusoidales del hígado, LSEC) que está fenestrado y carece de una membrana basal. Las células de Kupffer, los linfocitos (células Pit, PC) y las células dendríticas inmaduras (DC) se encuentran en los sinusoides. El espacio subendotelial, conocido como el espacio de disección, es la región de donde se origina la linfa hepática y donde se encuentran las CEH. Imagen modificada de Crispe (Crispe, 2003a).

1.2 Daño hepático

El hígado puede ser dañado en respuesta a una variedad de insultos crónicos o agudos intermitentes, como hepatitis virales (especialmente B y C), el consumo de alcohol, esquistosomiasis, toxicidad por fármacos, enfermedades metabólicas debidas a una sobrecarga de hierro o cobre, esteatosis, ataque autoinmune a hepatocitos o al epitelio del conducto biliar o anomalías congénitas (figura 3). Dentro del daño hepático provocado por las diversas etiologías y la fibrosis que se puede generar, hay mecanismos continuos y constantes de daño que estarán provocando que la función hepática se altere. En este mecanismo de daño muchas vías de señalización se involucran, existe atracción de distintos tipos celulares (macrófagos, células de Kupffer, linfocitos, CEH), algunos tipos celulares cambian su fenotipo a miofibroblasto, hay comunicación intercelular sobre el daño que esta sufriendo el tejido, se modifica la MEC, hay necrosis y/o apoptosis esto entre otros procesos, todo con la finalidad de salvaguardar la sobrevivencia del tejido (Pellicoro *et al.*, 2014; Tsuchida and Friedman, 2017; Distler *et al.*, 2019).

La respuesta al daño es la cicatrización del hígado que puede conducir a fibrosis, independientemente de la causa subyacente, la lesión iterativa causa daño inflamatorio, deposición de MEC, muerte de células parenquimatosas y angiogénesis que conduce a fibrosis progresiva. La matriz cicatricial generalmente se acumula muy lentamente (la mediana del tiempo hasta la cirrosis en la hepatitis C crónica es de 30 años), pero una vez que se establece la cirrosis, el potencial para revertir este proceso disminuye y se desarrollan complicaciones. Los polimorfismos genéticos, las marcas epigenéticas y los cofactores (como la obesidad y el alcohol) pueden modular el riesgo de progresión de la

fibrosis. Si se elimina la causa de la fibrosis puede producirse la resolución, es decir, la reversión completa a una arquitectura hepática casi normal.

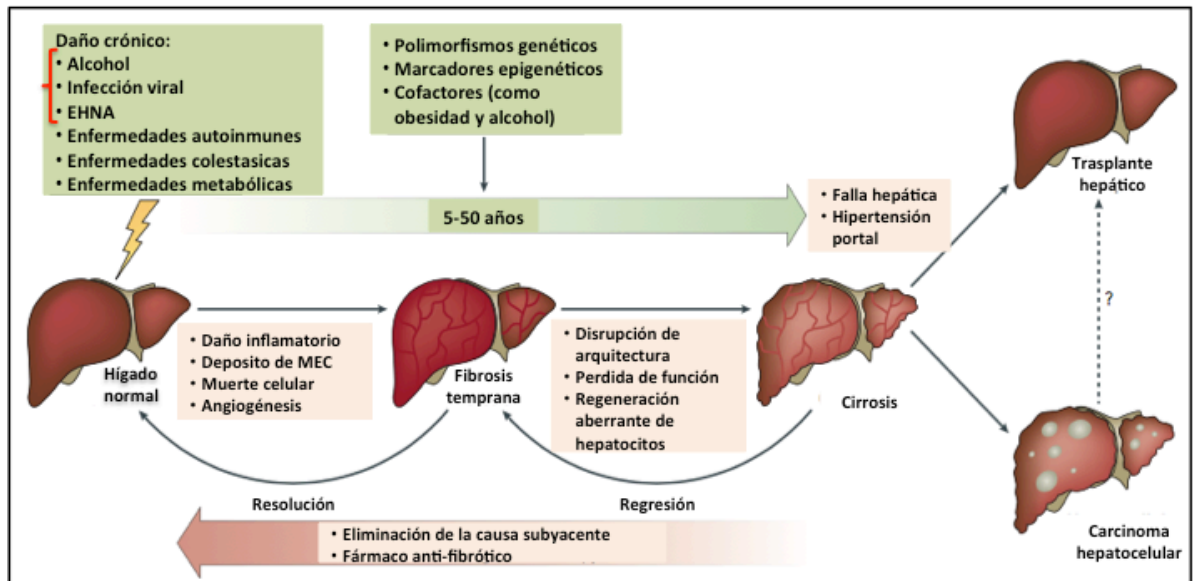


Figura 3. Historia natural de la enfermedad hepática crónica. En la figura se observa un esquema del desarrollo natural de las distintas lesiones hepáticas y los factores que intervienen en la evolución de estas. Imagen modificada de Pellicoro, et al. (Pellicoro *et al.*, 2014)

1.3 Fibrosis hepática

La fibrosis es un estado dinámico, bidireccional y en ciertos casos reversible con fases de inicio, progresión y regresión (Arthur, 2000; Scott L. Friedman and Michael J.P. Arthur, 2002). Es una respuesta protectora altamente conservada y coordinada a la lesión tisular, caracterizada por la acumulación de proteínas de MEC especialmente α -actina de músculo liso (α -SMA), colágeno tipo I (COL1) y III (COLIII), también proteoglicanos, fibronectina y laminina en respuesta al daño hepático (Stalnikowitz and Weissbrod, 2003; Pellicoro *et al.*, 2014). La interacción de múltiples vías, moléculas y

sistemas determina si la fibrosis es autolimitada y homeostática, o si es incontrolada y excesiva, ésta se vuelve problemática y clínicamente relevante cuando se produce una excesiva y desregulada cicatrización en respuesta a una lesión persistente crónica o aguda intermitente que conduce a una función tisular alterada (Pellicoro *et al.*, 2014). La fibrosis hepática puede eventualmente causar cirrosis hepática, que puede ser identificada por la estructura anormal del hígado donde hay una cicatriz fibrosa y formación de nódulos de hepatocitos (Hadi *et al.*, 2020).

La fibrosis está precedida por inflamación y tanto el sistema inmune innato como adaptativo son fundamentales para regular el proceso fibrótico. Las células inmunes son actores clave con la capacidad de ejercer efectos de inducción de lesiones o de promoción de la reparación, los monocitos y macrófagos están involucrados en acciones inflamatorias por la producción de óxido nítrico y citocinas inflamatorias. Como consecuencia del daño al tejido, las CEH se someten a un proceso de activación caracterizado por proliferación, motilidad, contractilidad y síntesis de MEC. La activación de las CEH está regulada por varios factores solubles, que incluyen citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y productos de estrés oxidativo. De todas las citocinas y factores de crecimiento producidos, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) e interleucina 6 (IL-6) son las dos citocinas fibrogénicas principales (Stalnikowitz and Weissbrod, 2003; Pellicoro *et al.*, 2014).

1.4 Lesión epitelial y la respuesta inflamatoria.

La mayoría de los tipos de insulto hepático dañan a las células epiteliales (hepatocitos y/o colangiocitos), lo que lleva a la liberación de mediadores inflamatorios y al inicio de una cascada de coagulación antifibrinolítica. Los leucocitos son reclutados en el sitio de la lesión por diferentes vías, probablemente relacionadas al tipo de insulto (Gutierrez-Ruiz *et al.*, 2002), y fagocitan las células muertas o apoptóticas, amplificando la respuesta inflamatoria al generar citocinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF), IL-6 e interleucina 1 β (IL-1 β), y por reclutamiento de células T. Los leucocitos que son reclutados en el hígado se unen con las células de Kupffer para producir compuestos que modulan el comportamiento de las CEH. Los monocitos y macrófagos producen grandes cantidades de óxido nítrico (NO) y citocinas inflamatorias como el TNF alfa (TNF- α) que tienen un efecto estimulante directo sobre la síntesis de colágeno de las CEH. Las células de Kupffer pueden estimular la síntesis de MEC, la proliferación celular y la liberación de retinoides por las CEH a través de las acciones de las citocinas, especialmente TGF- β 1 y especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica. Los mediadores pro-inflamatorios generados por el daño celular y las células inmunes estimuladas, así como factores de crecimiento y citocinas, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), TGF- β e interleucina 13 (IL-13), activan células precursoras mesenquimales en el tejido e inducen su transdiferenciación a miofibroblastos (Adachi *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 2002; Canbay, Feldstein, *et al.*, 2003; Kojima *et al.*, 2003; Stalnikowitz and Weissbrod, 2003; Sun *et al.*, 2003).

Las células de Kupffer expresan ligandos de muerte por inducción de TNF- α , ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) y ligando Fas (FASL) mediando el daño a hígado por endotoxinas (Adachi *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 2002; Canbay, Feldstein, *et al.*, 2003; Kojima *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2003). La fagocitosis de cuerpos apoptóticos estimula la producción de TGF- β , y la absorción de cuerpos apoptóticos de neutrófilos por parte de los macrófagos induce la expresión del FASL (Kiener *et al.*, 1997; Geske *et al.*, 2002). La fagocitosis de hepatocitos apoptóticos o linfocitos por las CEH desencadena directamente su activación fibrogénica y la expresión de colágeno (Canbay, Feldstein, *et al.*, 2003; Muhanna *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2009). El TGF- β es la principal citocina pro-fibrogénica y regula a la alza la síntesis de α -SMA y COL1a1 por miofibroblastos derivados de CEH (Hellerbrand *et al.*, 1999), mientras que el PDGF induce la proliferación de miofibroblastos a través de mecanismos dependientes e independientes de las señales extracelulares reguladas por cinasa (ERK) y por cambios en el pH intracelular (Seki *et al.*, 2007).

1.5 Células precursoras de miofibroblastos hepáticos. Las CEH.

Un evento central de la fibrosis tisular es la acumulación de miofibroblastos pro-fibrogénicos, los cuales son importantes reguladores de la respuesta fibrótica debido a la adquisición de propiedades productoras de cicatrices, proliferativas, migratorias, contráctiles, inmunomoduladoras y fagocíticas. Debido a esto se han convertido en objeto de investigación y blanco principal para las terapias antifibróticas. Se ha demostrado que independientemente de la etiología o la duración de la lesión, los miofibroblastos hepáticos se derivan casi exclusivamente de la activación de las células

mesenquimatosas residentes, es decir, de las CEH (Friedman *et al.*, 1985) y fibroblastos de localización portal no derivados de CEH en la enfermedad biliar (Dranoff and Wells, 2010).

Las CEH representan del $\approx 5-8\%$ de la población celular total y están localizadas en el espacio perisinusoidal de Disse, entre el endotelio fenestrado de los sinusoides y los hepatocitos, en contacto cercano con estos, células endoteliales sinusoidales y terminaciones nerviosas (Geerts, 2001; Demetris *et al.*, 2016).

En condiciones fisiológicas las CEH tienen un retículo endoplásmico rugoso de moderado a bien desarrollado y ocasionalmente dilatado, un pequeño complejo de Golgi, pericarion con varios y largos procesos (extensiones) citoplasmáticos que envuelven sinusoides en el espacio de Disse, presencia de gotas de lípidos citoplasmáticos en el citoplasma perinuclear y procesos (extensiones), aunque aproximadamente el 10% de las CEH carecen de lípidos, un pequeño número de mitocondrias y lisosomas, casi ausencia de vesículas y vacuolas endocíticas, y presencia de haces de colágeno intersticiales en aposición cercana a la célula. Estas a través de las extensiones citoplasmáticas (filamentos y microtubulos) hacen contacto con los hepatocitos, CEH adyacentes, células endoteliales, terminaciones nerviosas y ocasionalmente vesículas pinocíticas y exhiben numerosas microproyecciones que sirven como sensores para la transmisión de señales quimiotácticas (Geerts, 2001; Atzori, Poli and Perra, 2009). A través de los largos procesos (extensiones) citoplasmáticos hacen contacto con los hepatocitos, CEH adyacentes, células endoteliales y terminaciones nerviosas, estos procesos/extensiones tienen numerosos filamentos y microtubulos, además ocasionalmente vesículas pinocíticas y exhiben numerosas microproyecciones que sirven como sensores para la

transmisión de señales quimiotácticas (Geerts, 2001; Atzori, Poli and Perra, 2009). Las CEH tienen la capacidad de dividirse aunque la mayoría están en fase G0 (fase mas larga del ciclo celular) y su promedio de vida *in situ* es aun desconocido (Johnson, Hines and Burt, 1992; Geerts, 2001).

La función principal de las CEH inactivas (estado quiescente) es almacenar esteroides de retinol y vitamina A en su citoplasma (Demetris *et al.*, 2016). El 50-80% de la vitamina A en el cuerpo se acumula en el hígado y de este porcentaje el 90% se almacena en CEH. En tejido hepático humano normal, las CEH son negativas a desamina, expresan vimentina, sinaptofisina, nestina, marcadores de cresta neurales, como la proteína ácida fibrilar glial, neurotrofinas y su receptor (p75); algunas son positivas a α -SMA, la molécula de adhesión celular neural está restringida a las células estelares periportales y de la zona media; en la tabla 2 se muestra el repertorio de citocinas y receptores de membrana asociados con CEH. La heterogeneidad de las CEH podría depender de: 1) la posición microanatómica de las células per se, ya sea estar en contacto con MEC diferente, hepatocitos fenotípicamente diferentes y/o con células endoteliales, pueden estar invadidas o no, o pueden demostrar diferentes concentraciones de componentes sanguíneos, incluidos oxígeno y nutrientes; 2) la edad de la célula; y 3) el estado funcional de la célula. Las CEH controlan la rotación de la MEC en el espacio de Disse secretando las cantidades correctas de ciertas moléculas de la MEC, liberando metaloproteinasas de matriz (MMPs) e inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), laminina, proteoglicanos y colágeno tipo IV, que forman una estructura basal similar a la membrana. Son fuente importante de factores paracrinos, autocrinos, yuxtacrinos y quimioatrayentes que mantienen la homeostasis en

el medio ambiente del sinusoides hepático. Las CEH funcionan también como pericitos específicos del hígado, por tanto su contractilidad en respuesta a la endotelina-1 (ET-1), la angiotensina-II y la relajación por NO controla el diámetro de la luz sinusoidal y regula la microcirculación local (Geerts, 2001; Friedman, 2008a, 2008b).

Tabla 2. Repertorio de citocinas y receptores de membrana asociados con CEH.

Familia de citocina	Citocina	Receptor
Proliferativo o fibrogénico		
Factores de crecimiento transformantes	TGF- β 1/TGF- α , BMP4 y BMP6	Receptor de TGF- β tipo I, II y III; receptor de manosa-6-fosfato
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF- β	β -PDGF-R y PDGF-R o
Factor de crecimiento epidermal	NR	Receptor de EGF
Factor de células madre	Factor de células madre	NR
Factor de crecimiento de hepatocitos	HGF	c-met
Factor de crecimiento de tejido conectivo	CTGF (CCN2)	α v β 3-Integrina, receptor de lipoproteína de baja densidad-relacionado a proteína (LRP)
Factor de crecimiento de fibroblastos	α FGF y bFGF	FGF receptor-2 (flg)
Endotelina-1	ET-1, ECE	Receptores ET-A y ET-B
Leptina	Leptina	OB-Ra y OB-Rb
Plasminogeno	UPA/PAI-1	uPAR
Factor de crecimiento de células endoteliales vasculares	VEGF	VEGFR-1 (Flt1) y VEGFR-2 (Flk1)
Factor de crecimiento similares a insulina	IGF-I y IGF-II	IGF-IR
Trombina	NR	Receptor de trombina
RGD y ligandos de integrina	Fibronectina, tenascina	Integrinas α 1 β 1, α 2 β 1, α 6 β 4, α 5 β 1, α 8 β 1, α v β 1 α v β 3, cinasa ligada a integrina
Colágenos fibrilares	Colágeno I y II	Receptores 1 y 2 con dominio de discoidina
Canabinoides	NR	Receptor CB1
Purinas	Ubicuo	Receptores P2Y
Adenosina	Ubicuo	Receptor de adenosina A(2a)
Renina-angiotensina	Angiotensina II, renina y ACE	Receptor de Angiotensina II tipo 1 and 2
Serotonina	NR	Receptores SSR2, SSR3 y SSR5
Hedgehog	Indian hedgehog y sonic hedgehog	Patched
Galectinas	Galectina-3	NR

Quimiotactico/inflamatorio		
Productos finales de glicación avanzada (AGE)	NR	Receptor para AGE (RAGE)
Factor estimulante de colonia de macrófagos	M-CSF	NR
Endotelina-1	ET-1 y ECE	ET-A y ET-B
Factor activador de plaquetas	PAF	Receptor PAF
CD40	ligando CD40	NR
Factor de necrosis tumoral α	TNF- α	TNFR1 y p75NTR
Quimiocinas	CXCL1, MCP-1 RANTES, MIP-1, eotaxina y IL-8	CXCR3
Opioides	NR	Receptor opioide Delta 1 y 2
LDL oxidado	NR	CD36
Ligando del receptor tipo Toll	NR	TLR4 y CD14
Regenerativo		
Interleucina-6	IL-6	NR
Neurotrofinas	NGF, BDNF, NT-4 y NT-4/5	P75-NTR; Trk-B y Trk-C
Factor de crecimiento de hepatocitos	HGF	c-met
Antifibrogénico		
Interleucina-10	IL-10	Receptor de IL-10
Cannabinoides	NR	Receptor de CB2
Adiponectina	Adiponectina	NR
Factor de crecimiento de hepatocitos	HGF	c-met
Folistatina	Folistatina	NR
Apoptótico		
Señalización Fas	NR	Fas
Misceláneo		
Cistatina	Cistatina	NR
Catecolaminas	Norepinefrina	Receptores adrenérgicos y -1A
5-Hidroxitamina	NR	Subtipos de receptor de 5-Hydroxitamina 1A, 2A y 2B
Adrenomedulina	Adrenomedulina	NR
Cascada del complemento	NR	Receptor C5a
Peptidos natriureticos	NR	Receptor B de peptido natriuretico

Tabla tomada de Friedman, S. L. (Friedman, 2008b). Se muestra una compilación de datos reportados de todas las especies de mamíferos que describen la expresión de mRNA o proteína para una amplia gama de citocinas y factores solubles, y/o sus receptores afines asociados con CEH. La tabla está organizada de acuerdo con su actividad principal, aunque la mayoría de estas moléculas tienen muchas actividades. La tabla no distingue si estas moléculas están asociadas con células estrelladas inactivas o activadas. NR, no reportado.

1.6 Activación de las CEH

Las CEH normalmente se encuentran en un estado quiescente pero después de una lesión hepática, se vuelven activas y se diferencian en células similares a miofibroblastos, que se caracterizan por una pérdida de gotas de lípidos, por una mayor proliferación, migración, contractilidad, síntesis excesiva de proteínas MEC, y por la liberación de factores proinflamatorios y pro-fibrogénicos, incluido el TGF- β . Las CEH en estado inactivo no son proliferativas y en esta etapa la producción de colágeno es tipo IV > III > I. Durante la transición, se produce colágeno tipo I > III > IV. La transición de CEH a fenotipo tipo miofibroblastos se caracteriza ultraestructuralmente por la aparición en citoplasma de cuerpos densos y parches de miofilamentos, pierden su señalización de marcador neural, lo que permite discriminar el estado de activación celular de estas células *in vitro* e *in vivo*, y una mayor expresión de α -SMA, que junto con la expresión de receptores de integrina específicos para componentes constitutivos de proteínas de MEC (particularmente colágeno tipo I y III) conducen a la configuración estructural de CEH activada (CEHa), caracterizada por tensión del citoesquelético o estrés relevante para la modulación de diferentes funciones celulares en respuesta a factores de crecimiento y vasoconstrictores (Pinzani and Gentilini, 1999; Pellicoro *et al.*, 2014). Las CEHa producen la mayor cantidad de colágeno (hasta el 80%) en el hígado y secretan proteínas de MEC, TIMPs y MMPs de manera abundante lo que provoca la remodelación de la arquitectura hepática, así la reducción de las CEHa es crítica para la resolución de la fibrosis (Zhang *et al.*, 2016). Se ha demostrado que α -SMA es un marcador en el desarrollo y la progresión de la fibrosis (Kharbanda *et al.*, 2004; Akpolat

et al., 2005) y que desempeña un papel importante en la contractilidad del injerto en el proceso de cicatrización de heridas y la fibrosis tisular (Hinz *et al.*, 2001).

La activación de las CEH consta de dos fases principales, iniciación (también llamada “etapa preinflamatoria”) y perpetuación (Friedman, 2004), seguida de una fase de resolución en caso de resolverse la lesión hepática. La iniciación es la etapa donde se dan los cambios tempranos en la expresión génica y el fenotipo que hacen que las células respondan a otras citocinas y estímulos, resulta principalmente de la estimulación paracrina, debido a cambios en la MEC circundante, así como a la exposición a peróxidos lipídicos y productos de hepatocitos dañados. Los primeros cambios observados durante la activación de CEH son el resultado de la estimulación paracrina de todos los tipos de células vecinas, incluidos el endotelio sinusoidal, los hepatocitos y las plaquetas. Los hepatocitos son una fuente potente de especies reactivas de oxígeno que en parte desencadenan el proceso fibrogénico, generadas por lesiones de membrana y peroxidación lipídica (Novo *et al.*, 2006). La apoptosis de hepatocitos después de una lesión también promueve el inicio de la activación de las CEH a través de un proceso mediado en parte por Fas y TRAIL (Canbay *et al.*, 2002; Canbay, Friedman and Gores, 2004). Los fragmentos apoptóticos liberados de los hepatocitos son fibrogénicos hacia las CEH en cultivo y activan las células de Kupffer (Canbay, Feldstein, *et al.*, 2003; Canbay, Taimr, *et al.*, 2003). La infiltración y activación de células de Kupffer también contribuyen a la activación de las CEH. Las células de Kupffer estimulan la síntesis de la MEC, la proliferación celular y la liberación de retinoides por las CEH a través de las acciones de las citocinas (especialmente TGF- β 1) y las especies reactivas de oxígeno (Bilzer, Roggel and Gerbes, 2006). También es probable que las células endoteliales

participen en la conversión de TGF- β de la forma pro-fibrogénica latente a activa y también produzcan una isoforma celular de fibronectina que provoque la activación temprana de las CEH (Jarnagin *et al.*, 1994). Las plaquetas proporcionan estimulación paracrina adicional mediante PDGF, TGF- β 1 y factor de crecimiento epitelial (EGF) (Bachem, Melchior and Gressner, 1989). La perpetuación resulta de varios circuitos de retroalimentación positiva que involucran, entre otros receptores, los receptores de TGF- β , el receptor PDGF- β (Bonner, 2004) y los receptores de angiotensina II (Oakley *et al.*, 2009), que están regulados positivamente en estas células, los efectos de estos estímulos, entre otros, mantienen el fenotipo activado y generan fibrosis, implicando bucles autocrinos y paracrinos, e implica al menos seis cambios discretos en el comportamiento celular: proliferación, quimiotaxis, fibrogénesis, contractilidad, degradación de la MEC, pérdida de retinoides e infiltración celular inflamatoria, siendo el efecto neto de estos cambios aumentar la acumulación de MEC mientras se acelera el reemplazo de la matriz normal con una "cicatriz" de la herida. La resolución de la fibrosis se refiere a vías que conducen a la CEH a la apoptosis o contribuyen a su reversión a un fenotipo más inactivo (Friedman, 2008b).

La contractilidad de las CEH puede ser un determinante importante de los aumentos tempranos y tardíos de la resistencia portal durante la fibrosis hepática. Las bandas de colágeno típicas de la cirrosis terminal contienen grandes cantidades de CEH activadas (Rockey, 2001b, 2001a, 2003). La adquisición de un fenotipo contráctil durante la activación de CEH está mediada en parte por receptores que interactúan con la MEC y son impulsados por la señalización de calcio (Melton, Datta and Yee, 2006). La ET-1 y el NO son los principales contrarreguladores que controlan la contractilidad de las CEH, además de mediadores adicionales como angiotensinógeno II, eicosanoides,

péptido natriurético auricular, somatostatina y monóxido de carbono, entre otros (Reynaert *et al.*, 2002; Rockey, 2003). Si bien la mayoría de los estudios implican la señalización de calcio en respuesta a la contractilidad inducida por ET-1 (Pinzani *et al.*, 1992), también lo hay independiente del calcio (Melton, Datta and Yee, 2006). A medida que se activan las CEH, aumenta la expresión de la proteína citoesquelética α -SMA (Ramadori *et al.*, 1990; Rockey *et al.*, 1992), lo que confiere potencial contráctil a las células.

1.7 Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)

El TGF- β es el miembro mejor estudiado de una familia de factores de crecimiento celular, ubicuos, multifuncionales y esenciales para la supervivencia, que tienen un papel importante para el desarrollo embrionario, proliferación celular, diferenciación, apoptosis, inflamación, reparación de tejidos, la respuesta inmune y producción de la MEC (Roberts, 1999; Gressner, 2002a; Dooley and ten Dijke, 2012; Gomes *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2018). Se han descrito cinco isoformas de TGF- β en diferentes organismos. En los mamíferos se han descrito tres formas de TGF- β (β 1, β 2 y β 3), las cuales residen en diferentes cromosomas (19q13, 1q41 y 14q24 en humanos, respectivamente), pero poseen 80% de homología en secuencia de aminoácidos, mientras que las isoformas 4 y 5 se han identificado en aves y anfibios, respectivamente (Bissell, Roulot and George, 2001; Peralta-Zaragoza, Lagunas-Martínez and Madrid-Marina, 2001). En estado inactivo, el TGF- β se encuentra unido al péptido asociado a latencia (LAP). Después de secretarse, TGF- β se activa por medio de la proteólisis de la proteína asociada a TGF- β y está listo para unirse a sus receptores y dar paso a la

señalización correspondiente (Bissell, Roulot and George, 2001; Peralta-Zaragoza, Lagunas-Martínez and Madrid-Marina, 2001; Hernandez-Cañaveral *et al.*, 2004). La activación de este factor puede ser por varias causas, pH extremo, altas temperaturas, proteólisis limitada, desglicosilación de LAP, o por un mecanismo particular de activación, iniciado por la unión del complejo latente de TGF- β 1 a la trombospondina 1 (TSP-1) (Kondou *et al.*, 2003; de Caestecker, 2004). El TGF- β se secreta a partir de las CEH activadas y se sabe que es un mediador esencial de la fibrogénesis (Gressner, 2002a; Dooley and ten Dijke, 2012).

En la fibrosis hepática, TGF- β está directamente implicado en la sobreexpresión de COL1, TIMPs y inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), contribuyendo de esta manera al establecimiento y avance de la enfermedad (Armendariz-Borunda *et al.*, 1990; Tsuchida *et al.*, 2003b). También estimula la producción de otros componentes de la MEC como la fibronectina y proteoglicanos, y favorece la supervivencia de miofibroblastos a través de la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK) y la proteína quinasa B (AKT) (Horowitz *et al.*, 2007). Las señales río abajo de TGF- β incluyen una familia de moléculas bifuncionales conocidas como Smads, sobre las cuales muchas señales extracelulares e intracelulares convergen para afinar y mejorar los efectos de TGF- β durante la fibrogénesis (Inagaki y Okazaki, 2007). Además TGF- β estimula el colágeno en las CEH a través de un mecanismo dependiente de peróxido de hidrógeno y C/EBP. La respuesta de Smads en células estrelladas difiere entre lesión aguda y crónica para favorecer aún más la producción de MEC (Tahashi, 2002; Liu *et al.*, 2003; Dooley and ten Dijke, 2012).

1.8 Matriz extracelular (MEC)

En el hígado la MEC constituye aproximadamente el 0.5% del peso húmedo del hígado y su composición es de gran importancia (Geerts, 2001). La MEC es una red compleja con moléculas definidas y organizadas, para determinar la histoarquitectura del tejido, proporcionando a las células un andamio y señales que dirigen la polarización, migración, proliferación, supervivencia y diferenciación (Schuppan *et al.*, 2001); además abarca factores de crecimiento y MMPs que están específicamente unidos por los componentes de la MEC; por lo tanto podemos decir que la MEC son conjuntos poliméricos flexibles que se reforman continuamente de acuerdo a las necesidades prevalecientes y en respuesta a los estímulos externos como el daño a tejido. La MEC tiene diferentes densidades, esta es densa en las tríadas porta, alrededor de las venas centrales y en la cápsula de Glisson; en el espacio de Disse [separa el epitelio (hepatocitos) del endotelio sinusoidal] hay pequeñas cantidades de MEC de baja densidad que pueden subdividirse en la matriz pericelular en contacto directo con las células, el material basal similar a una lámina que forma un soporte para el endotelio y los procesos de las CEH, y los paquetes de colágeno intersticial que refuerzan la arquitectura del espacio de Disse (Geerts *et al.*, 1990; Geerts, 2001; Schuppan *et al.*, 2001). Aunque la cantidad de material de la MEC en el espacio de Disse es poca y de baja densidad, su composición es de gran importancia para el mantenimiento de las diferentes funciones de las células residentes del hígado (hepatocito, CEH, endotelio sinusoidal y células de Kupffer) ya que de eso depende la expresión de su fenotipo correcto; por lo tanto un cambio en la composición de la MEC resultará en un cambio de fenotipo, ya que las células confían en la MEC correcta para expresar su fenotipo *in vivo*

(Geerts *et al.*, 1990; Geerts, 2001; Schuppan *et al.*, 2001). La comunicación entre las células y la MEC está mediada por receptores transmembrana como integrinas (mecanorreceptores que proporcionan un enlace físico de transmisión de fuerza entre la MEC y el citoesqueleto), proteoglicanos transmembrana o moléculas que están asociadas con los receptores de matriz, controlando actividades celulares como la adhesión, diferenciación, migración, proliferación o apoptosis; y es este contacto el que en parte mantiene a las CEH con un fenotipo inactivo, además de la transducción de señales y el ensamblaje del citoesqueleto (Geerts, 2001; Schuppan *et al.*, 2001; Rockey, Du and Shi, 2019). Los tres tipos de células que delimitan el espacio de Disse (hepatocitos, células endoteliales y células estelares) expresan todos los componentes de la MEC, en la figura 4 se muestran las principales moléculas de MEC que se encuentran en el hígado normal y fibrótico, además se incluyen las proteínas que son secuestradas específicamente por las moléculas de MEC como la fibrina, plasmina, el activador del plasminógeno de la urocinasa (UPA), PAI-1, la transglutaminasa tisular, la lisil oxidasa, los factores de crecimiento/citocinas, las MMPs y TIMPs

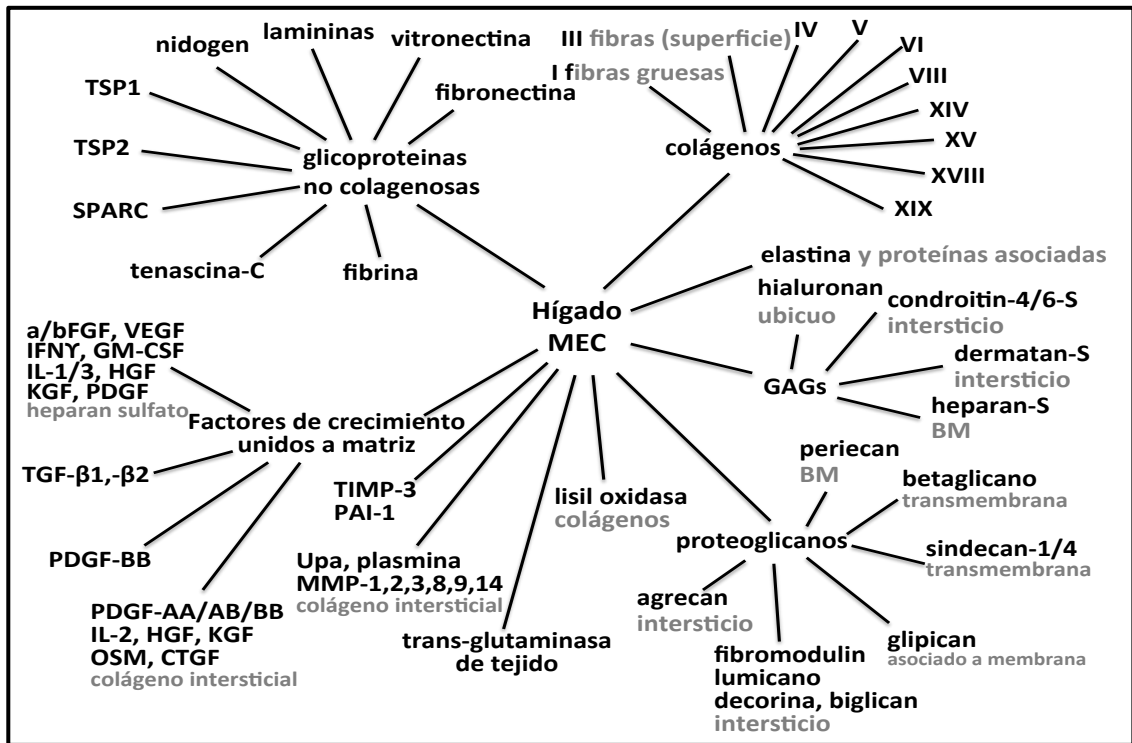


Figure 4. Resumen de las principales moléculas de MEC que se encuentran en el hígado normal y fibrótico. Descripción general de colágenos, glucoproteínas no colágenas, elastina, glucosaminoglicanos y proteoglicanos que se expresan en el hígado. Figura tomada de Schuppan et. al. (Schuppan *et al.*, 2001)

La fibrosis refleja un equilibrio entre la producción de matriz y la degradación. A medida que el hígado se vuelve fibroso, se producen cambios cualitativos significativos en la MEC, y el contenido total de colágenos y componentes no colagenosos aumenta hasta diez veces. La MEC de baja densidad se transforma a alta densidad (anormal) que compromete la función de los hepatocitos y conduce a una mayor activación de las CEH, y una consecuencia inevitable de la acumulación de MEC fibrótica (y la contracción de miofibroblastos) es un aumento progresivo de la rigidez del tejido, continuando el ciclo. Por lo tanto, al igual que la producción de matriz, la degradación de la MEC es un evento clave en la fibrosis hepática que es regulable y susceptible a las terapias. La

interrupción temprana de la MEC hepática normal por proteasas degradantes de la MEC acelera su reemplazo por la matriz cicatricial, que tiene efectos nocivos sobre la función celular.

La señalización biomecánica, mediada a través de una mayor rigidez del tejido, es un mecanismo crucial para promover y mantener el fenotipo miofibroblástico contráctil diferenciado para continuar el proceso fibrótico. Las proteínas de adhesión celular, como las integrinas, median interacciones complejas célula-célula y célula-MEC en las respuestas de curación de heridas. Las integrinas transducen señales bidireccionales que regulan el comportamiento celular, incluida la proliferación, motilidad, diferenciación, supervivencia y apoptosis. Durante la fibrogénesis, el aumento de la expresión de las integrinas αv en los miofibroblastos hepáticos (Henderson, N. C. *et al.*, 2013) y de la integrina $\alpha v\beta 6$ en los colangiocitos activados modifica la respuesta celular a los estímulos fibrogénicos. La integrina $\alpha v\beta 6$ puede unirse y activar TGF- β latente, y la expresión de integrina $\alpha v\beta 6$ aumenta en el hígado fibrótico humano y en modelos animales (Popov, Y. *et al.*, 2008). Uno de estos mecanismos es a través de MMP2 (Yu and Stamenkovic, 2000), que estimula la activación del TGF- β al disociarlo del LAP (Wipff *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2011), y se ha relacionado con integrinas, desconectándolas de la MEC, promoviendo la apoptosis por pérdida de la señalización de supervivencia mediada por MEC y por inducción activa de apoptosis mediada por integrinas (Levkau *et al.*, 2002). La importancia de este mecanismo regulador en la fibrosis ha sido destacada por el desarrollo de STX-100 (Biogen Idec), un anticuerpo monoclonal humanizado específico para la integrina $\alpha v\beta 6$, que altera selectivamente la activación de TGF- β en el tejido fibrótico; este medicamento se encuentra en ensayos clínicos de fase II en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Pellicoro *et al.*, 2014).

Durante la activación de las CEH la α -SMA es transactivada por el factor de respuesta sérica (SRF), lo que conduce a la polimerización de α ondu y la formación de fibras de tensión, que sirven como citoesqueleto funcional de actina y transmiten señales mecánicas al núcleo para regular la expresión de COL1. Así la dinámica del citoesqueleto de actina durante la activación de las CEH juega un papel crítico para los atributos morfológicos y funcionales de las CEH y en la expresión de COL1 (figura 5) (Shi and Rockey, 2017; Rockey, Du and Shi, 2019).

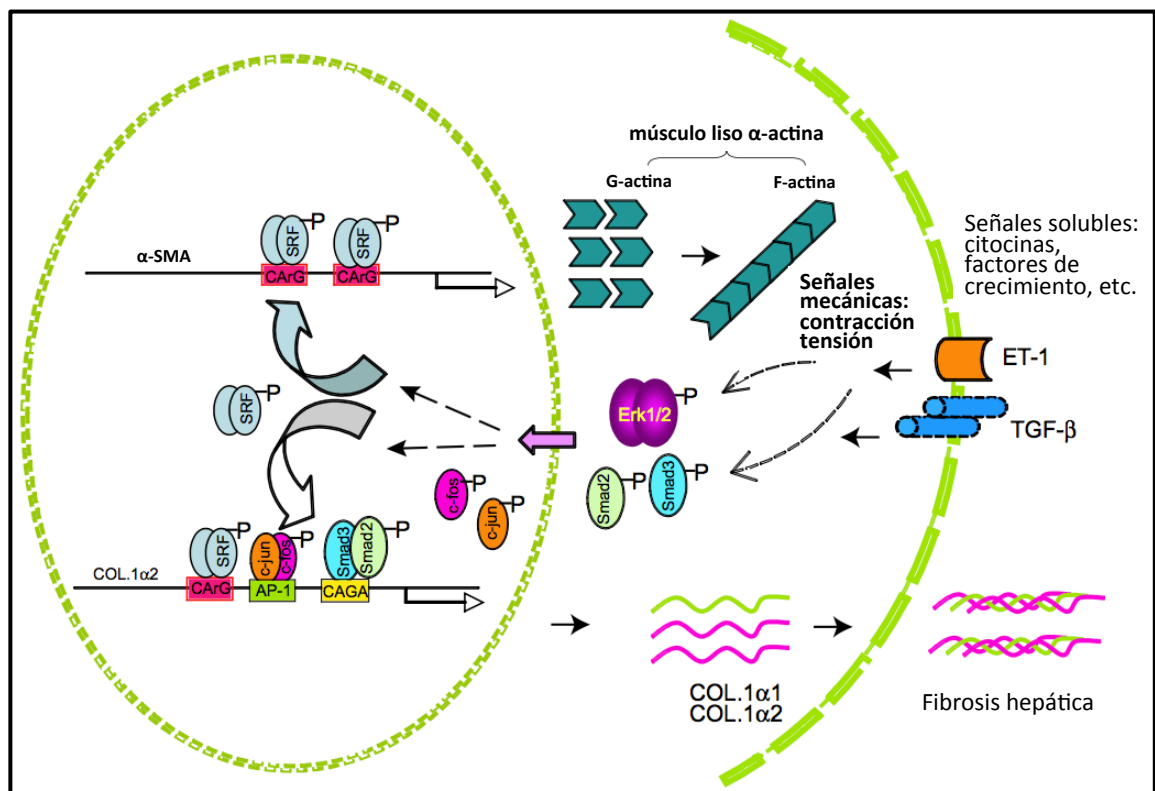


Figura 5. Un mecanismo molecular propuesto por Rockey et. al. subyacente al efecto de α -SMA sobre la diferenciación de miofibroblastos hepáticos y la fibrogénesis hepática. La α -SMA es transactivada por el factor de respuesta sérica (SRF) durante la activación de las CEH, lo que conduce a la polimerización de actina y la formación de fibras de estrés, que transmiten señales mecánicas al núcleo para regular la expresión de COL1. Figura tomada de Rockey et. al. (Rockey, Du and Shi, 2019).

1.9 Metaloproteinasa (MMPs)

Las MMPs son fundamentales para el proceso de remodelación de la fibrosis. Se trata de endopeptidasas multifuncionales que contienen calcio y zinc capaces de degradar componentes de la MEC, factores de crecimiento, citocinas y receptores de señalización y adhesión asociados a la superficie celular (Benyon and Arthur, 2001; Iredale, 2001; Campana and Iredale, 2015). Las MMPs se dividen en cinco categorías según su especificidad de sustrato (tabla 3) y todas las MMPs son sintetizadas por diferentes tipos de células hepáticas (McCrudden and Iredale, 2000). Las CEH son la fuente principal de MMP1, MMP2, MMP9, MMP13 (el equivalente de roedor de MMP1) y estromelisina (Arthur *et al.*, 1992; Milani *et al.*, 1995; Vyas *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2017).

Tabla 3. Clasificación de las MMPs.

Categoría	
Colagenasas intersticiales	MMP-1, MMP-8, MMP-13
Gelatinasas	MMP-2, MMP-9 y proteína de activación de fibroblastos
Estromelisinas	MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11
Tipo de membrana	MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25
MetaloeLASTasa	MMP-12

Un determinante importante de la fibrosis progresiva es la incapacidad de degradar el aumento de la matriz intersticial o cicatriz. La MMP1 es la principal proteasa que puede degradar el COL1, el colágeno principal en el hígado fibrótico (Brinckerhoff,

Rutter and Benbow, 2000). La MMP3 tiene la capacidad de activar a la MMP1 y MMP9, las cuales son muy importantes para la degradación de proteínas de MEC durante la fibrosis. La MMP9 (gelatinasa B), es un fuerte proteolítico de las gelatinas y son principalmente producidas por las células de Kupffer (Arthur, 2000); es una de las enzimas más activas durante el curso de la enfermedad, desempeñando un papel importante en la remodelación de la MEC por la digestión de muchas moléculas, entre ellas el COL1 (Tsuchida *et al.*, 2003a). Además de las MMPs, los TIMPs también pueden afectar el resultado de la fibrosis (Wang *et al.*, 2011; Jackson *et al.*, 2017).

Las MMPs pueden participar en la promoción del proceso apoptótico mediante la generación de fragmentos inductores de apoptosis, que puede ser el resultado tanto de la síntesis/deposición de la MEC como de la proteólisis a través de enzimas que degradan la matriz, como las MMPs (figura 6) (Levkau *et al.*, 2002).

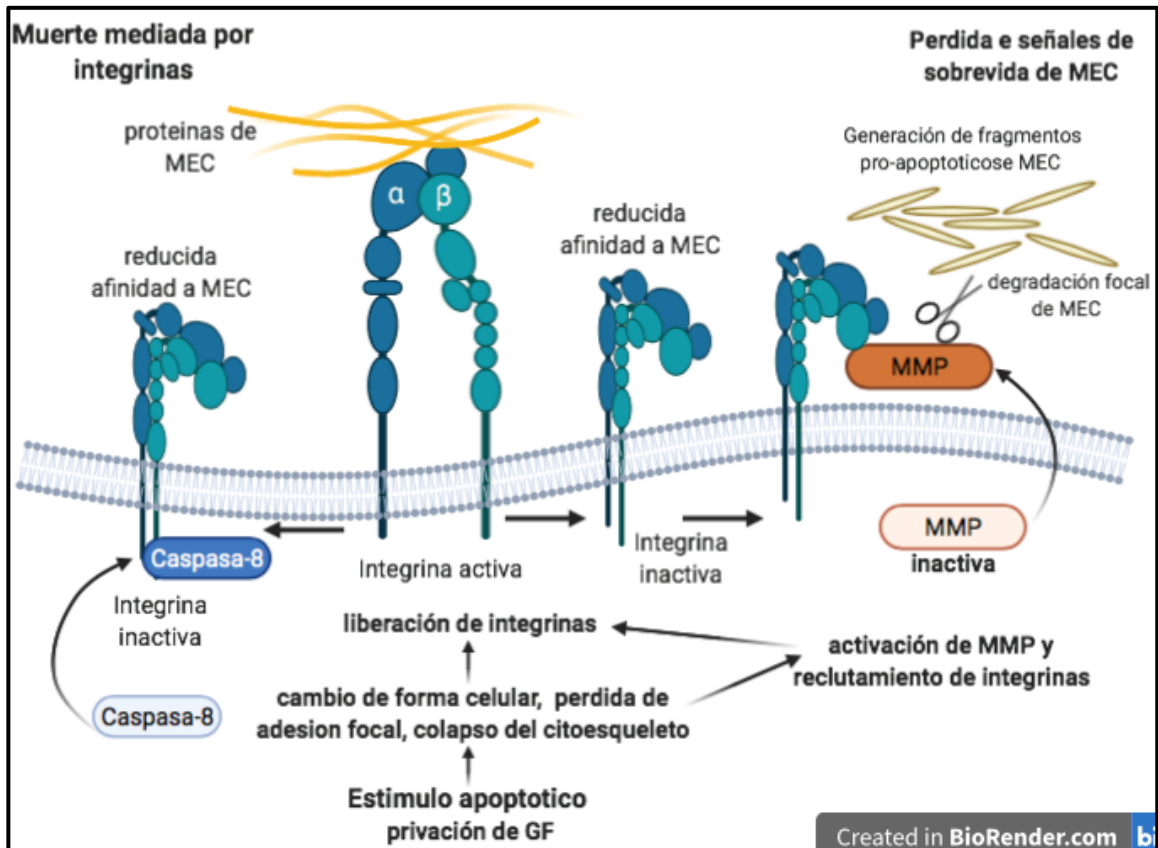


Figura 6. Diagrama Esquemático de la regulación de integrinas y MMPs durante apoptosis endotelial. Figura basada en Levkau et. al. creada con Biorender (Levkau *et al.*, 2002).

1.10 Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs)

La regulación de la actividad de las MMPs se produce en muchos niveles, entre los que se encuentra su inactivación mediante la unión a TIMPs (Jackson *et al.*, 2017). Estas proteínas secretadas de manera endógena inhiben todas las MMPs, pero tienen mayor especificidad y selectividad frente a miembros de las familias ADAM y ADAMTS (del inglés, a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motif). Cada TIMP se dirige a múltiples enzimas y cada metaloproteinasas tiene una sorprendentemente amplia gama de sustratos proteicos que son capaces de desencadenar respuestas celulares fundamentales. Por lo tanto, la inhibición mediada por TIMPs

controla una cascada piramidal inherente a la homeostasis tisular (figura 7) y las perturbaciones de TIMPs conducen a resultados biológicos complejos e impredecibles específicos del tejido.

Las CEH producen únicamente TIMP1 y TIMP2 (Boigk *et al.*, 1997; Arthur, 2000), y la producción de estas proteínas durante la lesión hepática podría inhibir la actividad de las MMPs, lo que lleva a una degradación reducida de la MEC acumulada durante la lesión hepática. TIMP1 tiene función antiapoptótica en las CEH (Murphy *et al.*, 2002), por lo tanto, su expresión sostenida en la lesión hepática aumentará la población de CEHa al evitar su eliminación. En apoyo del papel de TIMP1 *in vivo*, la sobreexpresión transgénica de TIMP1 en el hígado o la administración de anticuerpos neutralizantes de TIMP1 retrasan la regresión de la fibrosis hepática en animales experimentales (Yoshiji *et al.*, 2002). Las MMPs y TIMPs en conjunto son de mucha importancia no sólo en la fisiología de la remodelación y reparación de la MEC, sino también en el desarrollo del proceso fibrogénico.

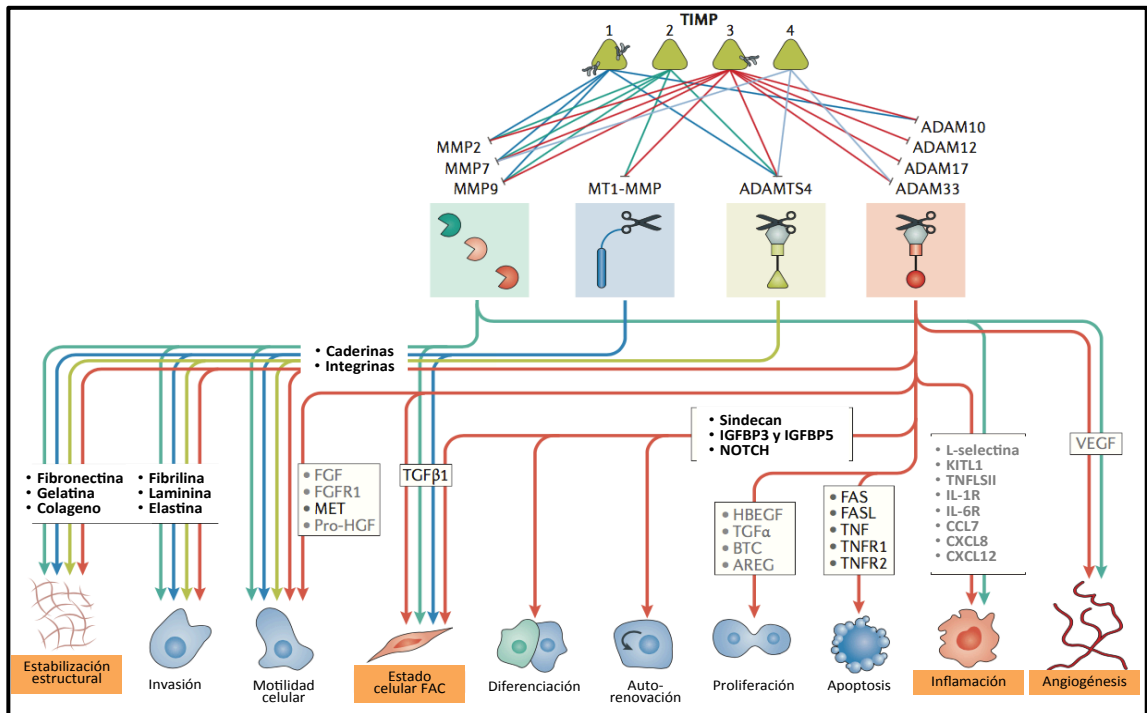


Figura 7. TIMPs, sus blancos y la superposición con la función celular. Los TIMPs controlan una variedad de funciones celulares mediante la superposición de diferentes perfiles de MMPs. La jerarquía de las relaciones entre inhibidores, proteasas, sustratos y procesos celulares se representa en cuatro niveles. Los TIMPs inhiben las MMPs que degradan una variedad de sustratos para generar señales celulares diversas y cruciales que regulan los aspectos tanto estructurales como celulares de la arquitectura de los tejidos. Figura tomada de Jackson et. al. (Jackson *et al.*, 2017). FAC, fibroblasto asociado a cáncer.

1.11 Mitocondria

Las mitocondrias forman una red dinámica e interconectada que está íntimamente integrada con otros compartimentos celulares. Realizan funciones diversas e interconectadas, producen ATP y muchos intermedios biosintéticos y participan en casi todos los aspectos de la función celular tales como: mantenimiento de células madre, cáncer, metabolismo, diferenciación, muerte celular (apoptosis), autofagia, inflamación y senescencia, respuesta inmune innata y migración (figura 8) (Yasukawa *et al.*, 2009; Nunnari and Suomalainen, 2012; Kasahara *et al.*, 2013; Khacho *et al.*, 2016; Filadi, Pendin and Pizzo, 2018; Murphy and Hartley, 2018; Sorrentino, Menzies and Auwerx, 2018; Suomalainen and Battersby, 2018). En la mayoría de las células, las mitocondrias se organizan en una red tubular y dinámica que se somete a una remodelación continua, esta naturaleza cambiante y adaptable de las mitocondrias que involucra su morfología y distribución subcelular se conoce como dinámica mitocondrial. Los dos mecanismos principales de la dinámica de la membrana mitocondrial son la fusión y la fisión (división).

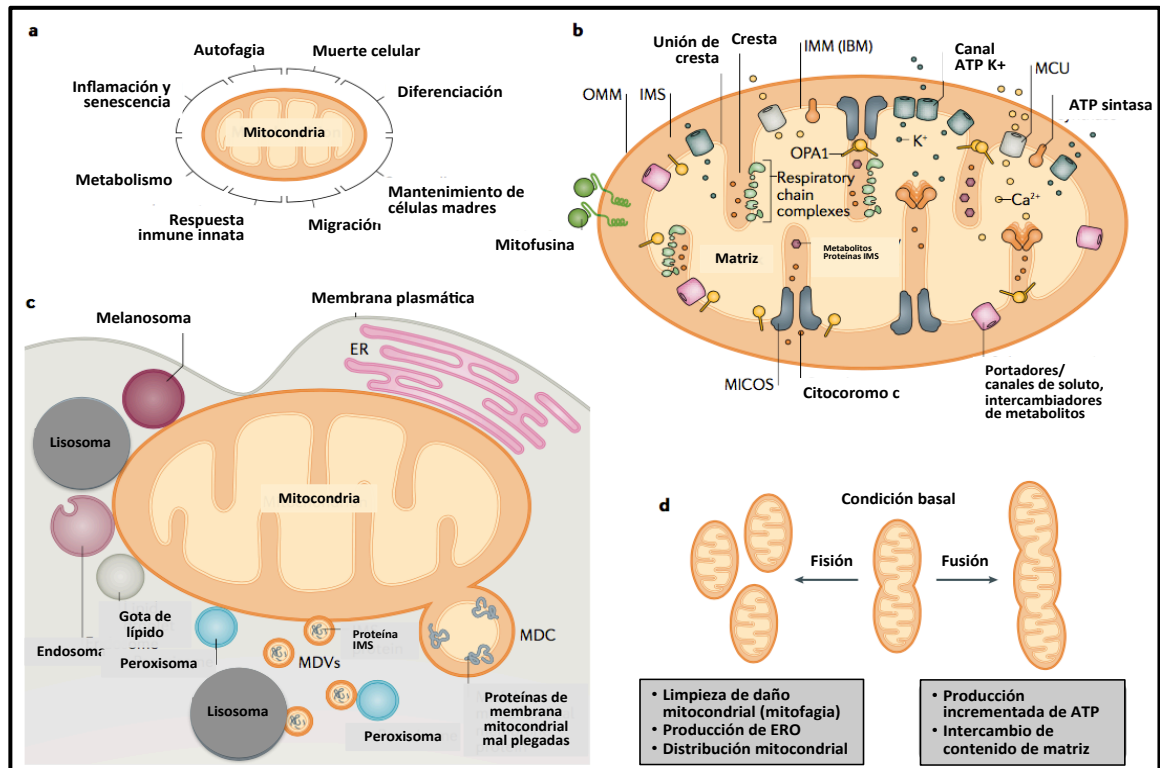


Figura 8. Estructura y función mitocondrial. A) Las mitocondrias coordinan diversas funciones celulares. Se enumeran los procesos clave que dependen de las mitocondrias. B) Estructura mitocondrial. La luz mitocondrial está rodeada por dos membranas: la membrana mitocondrial externa (OMM) y la membrana mitocondrial interna (IMM). C) El OMM establece redes de interacciones con otros orgánulos, incluidos los sitios de contacto de membrana con el retículo endoplásmico (RE), la membrana plasmática, los lisosomas y los endosomas, las gotas de lípidos, los peroxisomas y los melanosomas. Estos sitios de contactos de membrana regulan las funciones mitocondriales. Además, las mitocondrias liberan vesículas derivadas de mitocondrias (MDV) y compartimentos derivados de mitocondrias (MDC), que incorporan componentes mitocondriales. D) La forma mitocondrial es fundamental para la actividad mitocondrial (metabólica). Los dos mecanismos principales de la dinámica de la membrana mitocondrial son la fusión y la fisión (división). Figura tomada de Giacomello et. al. (Giacomello *et al.*, 2020).

El hecho de que la apariencia mitocondrial cambia según el contexto celular tienen al menos dos implicaciones. Primero, sugieren que la morfología mitocondrial puede ser modulada dinámicamente, por los componentes estructurales (lípidos y proteínas) y vías de señalización. Segundo, que la morfología mitocondrial participa en la adaptación mitocondrial a demandas celulares y tisulares específicas, y gobierna la respuesta

mitocondrial a las señales citosólicas (Pernas and Scorrano, 2016). Por lo tanto, la desregulación de la dinámica mitocondrial, en particular de la fusión y la fisión, se ha relacionado con varios trastornos genéticos en humanos y los efectores moleculares de estos procesos estén sujetos a varias modificaciones post-traslacionales, que permiten el acoplamiento de la dinámica de la membrana mitocondrial a la señalización celular, lo que refleja la sensibilidad y la capacidad de respuesta de la dinámica mitocondrial a los estados celulares (Giacomello *et al.*, 2020).

Las mitocondrias son un orgánulo altamente dinámico en constante fisión y fusión, y su equilibrio regula su morfología y la función normal de estas. En los mamíferos, la fusión de las mitocondrias está regulada por dos mitofusinas, mitofusina 1 (MFN1) y mitofusina (MFN2), ambas mitofusinas son esenciales para el desarrollo, realizando funciones parcialmente redundantes y distintas, dependiendo de la etapa de desarrollo (Chen *et al.*, 2003). MFN1 y MFN2 se expresan de forma ubicua y muestran diferentes niveles de expresión en diferentes tejidos (Filadi, Pendin and Pizzo, 2018). Además de participar en la fusión, MFN2 participa en la interacción mitocondrias-mitocondrias y en la yuxtaposición de las mitocondrias con otros orgánulos, particularmente con el retículo endoplásmico (RE) (de Brito and Scorrano, 2008) y su expresión se ha relacionado con enfermedad hepática crónica (Chen *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2020).

El hígado es un órgano vital en los mamíferos y desempeña un papel central en la homeostasis del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas en el cuerpo, y las mitocondrias integran estas vías; en este contexto, las mitocondrias, específicamente MFN2, participan en las enfermedades hepáticas. Se ha visto que en células de hepatocitos humanos (L02), la expresión de MFN2 disminuyó significativamente en

condiciones de tratamiento con glucoquenosodesoxicólico (GCDCA), el principal componente tóxico del ácido biliar; además, la sobreexpresión de MFN2 (debido al aumento de la fusión mitocondrial) disminuye la fragmentación mitocondrial y revierte el daño mitocondrial observado en las células L02 tratadas con GCDCA (Chen *et al.*, 2013). En células HSC-T6 se demostró que la sobreexpresión de MFN2 inhibía la vía de señalización de TGF- β 1/Smad, desencadenando la regulación negativa de los marcadores asociados con la fibrosis hepática, y en un modelo murino (ratones C57BL/6), la sobreexpresión de MFN2 mejora la fibrosis hepática inducida por CCl₄ con infiltración de células inmunes significativamente disminuida (Zhu *et al.*, 2020).

1.12 Estrategias antifibróticas

Un fármaco con actividad antifibrótica ideal y específica del hígado debe evadir los efectos adversos sobre las proteínas de matriz extrahepática y debe selectivamente atenuar la excesiva deposición de colágena sin afectar la síntesis de MEC normal, por lo cual recientemente, la inhibición del daño parenquimal, la inflamación hepática y la modulación o reversión de la activación de las CEH son de gran interés para la búsqueda de potenciales fármacos antifibróticos.

Hasta el momento no se dispone de una terapia de eficacia comprobada que permita revertir o inhibir el proceso fibrogénico, que sirvan de base para el desarrollo de tratamientos farmacológicos eficientes. El empleo de fármacos con propiedades antioxidantes como vitamina E (Parola *et al.*, 1992) silimarina, fosfatidil-colina (Ma, Jingbo and Charles S, 1996), S-adenosil-L-metionina, retinoides y quercetina (Mizobuchi *et al.*, 1998; Godichaud *et al.*, 2000) y casticina (Zhou *et al.*, 2017) en

diferentes modelos experimentales mostraron que suprimen la respuesta fibrótica al daño oxidativo, sin embargo de algunos compuestos faltan estudios que valoren su seguridad y eficacia.

Además la falta de selectividad celular *in vivo* de los fármacos que muestran un efecto antifibrótico *in vitro* es otro importante problema de los medicamentos en uso, que pueden terminar produciendo importantes efectos secundarios, como la apoptosis de macrófagos y linfocitos T por el uso de la gliotoxina (Waring and Beaver, 1996), el riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunitarias y neoplásicas por el empleo de antagonistas del TGF- β (Prud'homme and Piccirillo, 2000; Peralta-Zaragoza, Lagunas-Martínez and Madrid-Marina, 2001), o el riesgo de desarrollar tumores malignos por el uso de los agonistas de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (Everett, Galli and Crabb, 2000). Surge entonces la necesidad de disponer de fármacos antifibróticos que puedan actuar selectivamente en las CEH activadas. Las CEH, son hasta el momento, las principales células fibrogénicas a nivel hepático, volviéndose de esta forma, unos de los blancos terapéuticos más importantes para el tratamiento (García *et al.*, 2002; Fallowfield, 2011; Rockey, 2013).

1.13 Plantas con actividad antifibrotica

Las plantas han sido usadas por practicantes de la medicina tradicional por miles de años para el tratamiento de diversas enfermedades. Los productos naturales han demostrado ser una excelente fuente de moléculas novedosas, algunas de las cuales han funcionado como fármacos o han sido inspiración para la síntesis de algunos otros (Domitrović and Potočnjak, 2016). Existen evidencias científicas considerables en que

agentes fitogénicos pueden tener beneficios significativos sobre la disfunción y curso de estas enfermedades del hígado. Algunas de las plantas más estudiadas en enfermedades hepáticas son por ejemplo: *Silybum marianum* (cardo mariano) (Fehér *et al.*, 2015; Wah Kheong, Nik Mustapha and Mahadeva, 2017), *Rosmarinus officinalis* (romero) (Rašković *et al.*, 2014; Bahri *et al.*, 2017), *Synara scolymus* (alcachofa) (Speroni *et al.*, 2003; Salem *et al.*, 2015) y algunas más como *Glycyrrhiza glabra* (licor de raíz) (Li *et al.*, 2014). En la tabla 4 se muestra una revisión de algunas plantas que han mostrado actividad hepatoprotectora.

Tabla 4. Plantas y hongos con actividad hepatoprotectora.

Planta	Actividad
<i>Tripterygium wilfordii</i> (Chong <i>et al.</i> , 2011)	Inhibición transcripcional de NFκB inducida por TNF-α en CEH-T6. Supresión de la deposición de colágeno inducida por TNF-α y TGF-β1 y la secreción de α-SMA en CEH-T6.
<i>Alnus firma</i> (Lee <i>et al.</i> , 2011)	Actividad inhibidora de la proliferación celular en CEH-T6.
<i>Terminalia chebula</i> (Chuang <i>et al.</i> , 2011)	Efectos antiproliferativos en células CEH-T6. Disminución de la expresión de Smd2, Smad3 y Smad4, y la síntesis de colágeno, procolágeno I (α1) y III, Suprime la activación de PAI-1
<i>Aspergillus fumigatus</i> (Sutton <i>et al.</i> , 1994; Wright <i>et al.</i> , 2001; Kweon <i>et al.</i> , 2003; Orr <i>et al.</i> , 2004)	Induce la apoptosis de las CEH Posee un efecto inmunodepresor
<i>Stephania tetrandra</i> (Huang <i>et al.</i> , 1999; Park <i>et al.</i> , 2000)	Induce la apoptosis de las CEH Efecto antioxidante Induce la reducción de la presión venosa portal
<i>Salvia miltiorrhiza</i> (Nan <i>et al.</i> , 2001; Liu <i>et al.</i> , 2002; Kim <i>et al.</i> , 2003)	Inhibe la proliferación de las CEH Disminuye la activación de las CEH y la expresión de proteínas de la MEC por el TGF-β1 Induce la apoptosis de las CEH
<i>Silybum marianum</i> (Boigk <i>et al.</i> , 1997; Jia <i>et al.</i> , 2001; Abenavoli <i>et al.</i> , 2010)	Disminuye los valores del RNA mensajero del procolágeno α1(I), TIMP1 y TGF-β1.
<i>Betula platyphylla</i> (Lee <i>et al.</i> , 2012)	Inhibieron significativamente la proliferación de HSC Disminución del contenido de colágeno Aumenta la actividad de Caspasa-3/7.
<i>Liriodendron tulipifera</i> (Jeong <i>et al.</i> , 2015)	Atenuación de la proliferación de las CEH-T6 activadas. Reducción de la deposición de colágeno en las CEH-T6 activadas. Disminución de la producción TNF-α inducido por lipopolisacáridos en RAW264.7 células macrófagos.
<i>Caesalpinia sappan</i> (Kadir <i>et al.</i> , 2014)	Normalización de la expresión de las proteínas TGF-β1, αSMA, PCNA, MMP y TIMP1.
<i>Cnidium monnieri</i> (Shin <i>et al.</i> , 2011)	Inhibición de la proliferación de CEH Reducción del contenido de colágeno en las CEH-T6.
<i>Camellia sinensis</i> (Tsai <i>et al.</i> , 2013)	Prevención de la fibrosis hepática inducida por CCl4 por disminución del nivel de hidroxiprolina en el hígado Reducción de fibrosis hepática por observaciones histológicas.

1.13.1 *Turnera diffusa*

Se ha reportado que existe una relación entre la actividad antioxidante y hepatoprotectora de extractos o compuestos obtenidos a partir de productos naturales (Krithika *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2012; Rupeshkumar, Kavitha and Basu, 2012). México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo. El grupo de investigación de la Dra Noemi Waskman de Torres reportó la actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto metanólico de *Turnera diffusa* ha través de un modelo *in vitro* en células HEPG2 tratadas con CCl₄ y observaron que disminuía los niveles de AST (figura 9A) (Salazar-Aranda *et al.*, 2011; Torres-González *et al.*, 2011). Se fraccionó el extracto de la planta y se logró aislar el agente responsable de la actividad hepatoprotectora de *T. diffusa*, llamado hepatodamianol, un flavonoide C-glicosilado, el cual fue evaluado en el mismo modelo *in vitro* y resultó mejor que la silimarina (figura 9B). Debido a que la obtención de la molécula pura es difícil y costosa se establecieron las condiciones para obtener un extracto estandarizado de *T. diffusa* (EETD) que sirviera como base para un posible medicamento herbolario (tabla 5) (Delgado-Montemayor *et al.*, 2017, 2020).

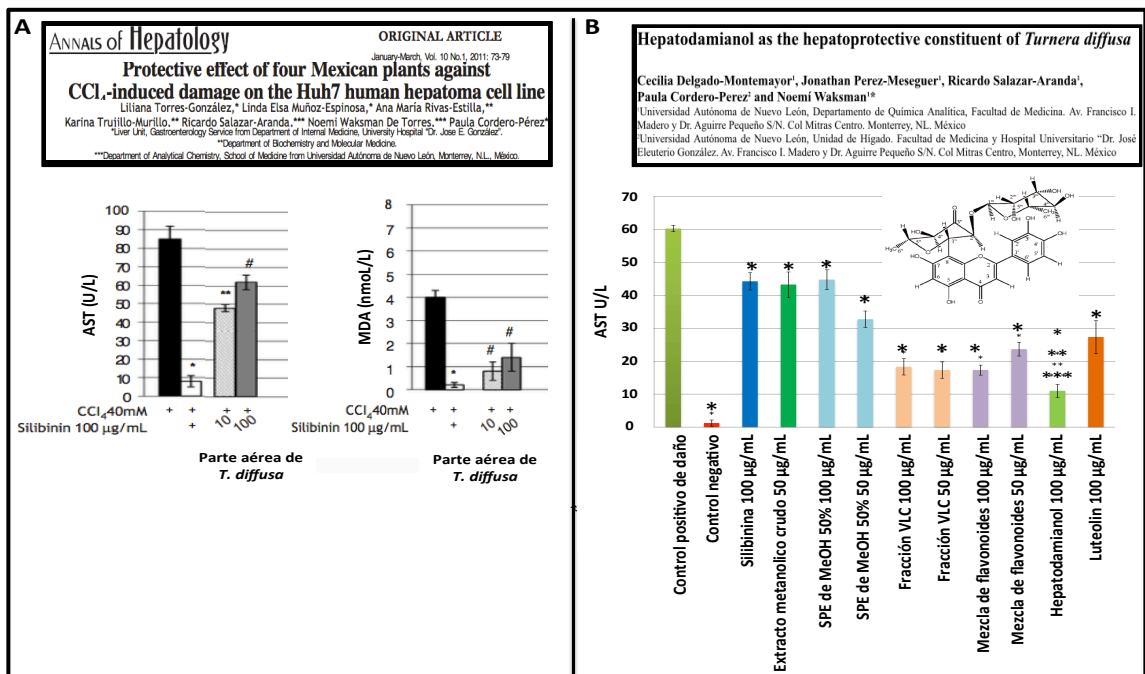


Figura 9. Resultados obtenidos de la evaluación de *T. diffusa* por el grupo de investigación. A) Resultados de la actividad hepatoprotectora del extracto metanólico de *Turnera diffusa* ha través de un modelo *in vitro* en células HEPG2 tratadas con CCl₄. B) Resultados de la actividad hepatoprotectora del hepatodamianol evaluado en el mismo modelo *in vitro*.

Tabla 5. Parámetros evaluados y valores esperados para EETD.

Característica	Valor
Cuantificación de Hepatodamianol por HPLC	161.47 ± 52.23 mg de hepatodamianol/g de extracto
Identificación de Hepatodamianol (flavonoide) por RMN	Presentar las señales para el 1D-TOCSY selectivo para los sistemas de espines de 6''' (219Hz) y 6'' (564Hz)
Solventes residuales	Con 24 h de liofilizado, señales de solventes menores a la señal de N ₂
Flavonoides totales	Con 24 h de liofilizado, señales de solventes menores a la señal de N ₂
Actividad antioxidante (DPPH)	CE50 60.09 ± 8.33 µg/mL
Identificación de flavonoides	Mostrar los iones [M+H] ⁺ 579, 595, 575, 577, 561 y corresponder con los patrones de fragmentación
Actividad hepatoprotectora	En el modelo <i>in vitro</i> liberar 38.63 ± 3.26 UI/L de AST

1.14 Flavonoides

Los flavonoides, son metabolitos secundarios de las plantas, son frecuentemente compuestos no tóxicos, con bajo potencial de interacción farmacológica y activación procarcinogénica, y han mostrado efectos de actividades con potencial farmacológico *in vitro* e *in vivo*. Tienen la capacidad de modular las vías de señalización para actividad antiinflamatoria, antiapoptótica, antiestática y antifibrótica específica (Domitrović and Potočnjak, 2016). Los efectos hepatoprotectores de los flavonoides se han atribuido con frecuencia a la actividad antioxidante (Cao, Mak and Lieber, 2006). Algunas vías de señalización moduladas para flavonoides son Nrf2/ARE (factor 2 relacionado con NF-

E2 p45/elemento de respuesta antioxidante), PDGF, HMGB1 (High mobility group box 1 protein), TNF, IL-6 e IL-1 β desencadenando un efecto antiinflamatorio (Domitrović and Potočnjak, 2016).

Por otro lado, la actividad antifibrótica de diferentes flavonoides se ha demostrado que modula vías de señalización como WNT (Wingless e Int-1), TGF- β , Hippo pathway-YAP/TAZ, PDGF, estrógeno, Shh (Sonic hedgehog), TLR (Toll-like Receptor), Fas y Ang1 (angiotensina I) que desencadenan un efecto antifibrótico (Domitrović and Potočnjak, 2016).

También, diferentes flavonoides modulan vías de señalización como TNF, HGF y Fas que desencadenan un efecto antiapoptótico (Domitrović and Potočnjak, 2016).

1.15 Modelos de estudio *in vitro* de CEH

En función del papel fundamental de las CEH en el inicio y la progresión de la fibrogénesis hepática, algunos problemas básicos como la regulación de los componentes de la MEC, el metabolismo retinoide, los aspectos de contractilidad y los mecanismos de señalización intracelular se abordan en cultivos primarios. Para tratar de superar la necesidad del aislamiento celular primario, el cual es un proceso caro, laborioso, que requiere gente capacitada, aprobación de comités de ética para y el cuidado de animales, las células son una población heterogénea que se debe trabajar en los primeros días de cultivo; se han desarrollado líneas celulares inmortalizadas de CEH, mediante inmortalización espontánea en cultivo a largo plazo, expresión estable del antígeno T del virus de simio 40 (SV40) o expresión ectópica de telomerasa. Con esto se busca que las CEH evoquen la mayor parte de las características del fenotipo activado *in*

vivo, ofreciendo la ventaja de un suministro inmediato e “ilimitado” de células, que permiten la realización de experimentos a largo plazo, fenotipo homogéneo y específico y la posibilidad de que muchos investigadores trabajen en el mismo sistema en condiciones de cultivos simples y fácilmente estandarizadas en diferentes laboratorios. La extensa caracterización molecular sugiere que varias de estas líneas son modelos atractivos para abordar distintos temas, lo que ha acelerado el progreso en el esclarecimiento de la biología de las CEH y la fibrosis hepática. Pero aun las distintas líneas celulares estables de CEH difieren en características de perfiles de expresión de RNA, transfectabilidad y/o en su estado de activación, así como en los marcadores que expresan por lo que se considera necesario validar y/o correlacionar los resultados o hallazgos en estas líneas en células de cultivos primarios y en modelos *in vivo*. Existe una gran variedad de líneas celulares estables que se muestran en la tabla 6 (Herrmann, Gressner and Weiskirchen, 2007; Friedman, 2008b).

Las líneas celulares LX-1 y LX-2 humanas debido a su amplia caracterización son las más utilizadas. Las células LX-1 se generaron mediante transformación con un plásmido que codifica el antígeno T grande SV40 bajo el control de un promotor del virus del sarcoma de Rous y las células LX-2 mediante la inmortalización espontánea de un subconjunto temprano de células LX-1 que crecieron en condiciones de suero reducidas (1% en lugar de 10% de suero fetal bovino) (Xu *et al.*, 2005). Ambas líneas celulares LX secretan pro-colágeno $\alpha 1(I)$ y complejos de degradación de matriz como pro MMP2, metaloproteinasa de matriz de membrana tipo 1 (MT1-MMP) y TIMP2 y preservan características clave de las CEH en absorción, acumulación y convirtiendo retinol en éster de retinilo. Además las líneas celulares expresan α -SMA, vimentina y proteína ácida fibrilar glial (GFAP), así como el receptor para el factor de crecimiento

derivado de plaquetas tipo β (PDGFR β P), receptor de dominio de discoidina 2 (DDR2) y el receptor de leptina OB-R_L, que son componentes clave en la respuesta fibrogénica que demuestran que el fenotipo de ambas líneas LX es más similar a la de las CEH activadas.

Específicamente se ha demostrado que las células LX-2 son respondedoras a PDGF, promoviendo la proliferación (Xu *et al.*, 2005); a TGF- β provocando la sobreexpresión de COL1 α 1, PAI-1, proliferación, MMP-2, TIMP-1, COLIII y α -SMA (Xu *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006); en presencia de Leptina sobreexpresando TIMP1, COL1 α 1 y MMP1 (Cao *et al.*, 2004; Cao, Mak and Lieber, 2006, 2007); y en presencia de etanol sobreexpresando COL1 α 1, α -SMA y CTGF (Chen *et al.*, 2011).

Tabla 6. Líneas celulares inmortalizadas de CEH de ratón, rata y humano, y sus características bioquímicas.

Línea celular	Origen	Método de Inmortalización	Proteínas de citoesqueleto					Proteínas de matriz y adhesión				MMPs y TIMPs		Retinol			Citocinas		Características
			Desamina	α -SMA	GFAP	Vimentina	Fibronectina	Colágeno I	Colágeno III	Colágeno IV	Laminina	MMP2	TIMP1	Ret.-Uptake	Esterificación	CRBP-1	TGF- β 1	IL-6	
GRX	Ratón	Espontanea	+	+	+	+	+	+	+	+	N	N	+	+	+	N	N	Deriva del tejido fibrótico de ratón con enfermedad hepática esquistosómica. Inmortalización espontánea	
SV68-IS			+	+	+	N	N	N	+	N	N	N	N	+	+		N	N	
A640-IS(39 °C)			+	+	N	+	+	+	+	+	+	N	N	+	N		N	N	
A640-IS(33 °C)			-	+	N	+	+	+	+	+	+	N	N	+	N		N	N	
M1-4HSC			+	+	+	+	N	N	N	N	N	N	N	-	-		N	N	
M-HT			(+)	+	+	+	N	N	N	N	N	N	N	-	-		N	N	
A7			N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+	+		N	N	
739																			Derivadas de hígado de rata normal o tratado con CCl ₄ , que tienen niveles variables de expresión del gen de colágeno y capacidad de respuesta a la IL-6.
CFSC	Rata																	Inmortalización espontánea	
NFSC		Espontánea	+	N	N	+	+	+	-	+	N	N	+	N		+	+	Inmortalización espontánea	
CFSC-2G		Espontánea																	
HSC-T6		SV-40 1-T/pe	+	+	+	+	+	+	+	-	+	N	+	+	+	+	+	N	Uso para estudios del metabolismo de los retinoides. Realizada por transfección con el antígeno T grande SV40.

SV68c-IS		SV-40 1-T/pe	+	+	+	N	N	N	+	N	N	N	N	+	+		N	N	Realizada por transfección con el antígeno T grande SV40.
PAV-1		Espontánea	+	+	-	+	+	+	N	+	+	N	N	+	+		N	N	Metabolismo de los retinoides similares a las de las células primarias
HSC-PQ			+	+	N	+	+	+	+	-	+	N	N	-	N		N	N	Presenta características clave de las células estrelladas primarias
BSC			+	+	+	N	N	+	N	N	N	N	N	N	N		N	N	
MFBY2			N	+	+	N	N	+	+	N	N	N	+	N	N		N	N	
MFBY2 MFBY2(+LAP)			N	-	-	N	N	+	+	N	N	N	+	N	N		N	N	
T-HSC/CI6			+	+	+	N	N	+	N	N	N	N	N	N	N		+	N	
LI90	Human	Aislado de tumor	-	+	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	Acumulan vitamina A, expresan una gran cantidad de componentes de la matriz.	
GRAF-X		SV-40 1-T/tr	N	+	N	+	+	+	N	+	+	+	N	+	+		N	N	Realizada por transfección con el antígeno T grande SV40.
LX-1		SV40 T	N	+	+	+	N	+	N	N	N	+	+	+	+		N	N	
LX-2		Espontánea	N	+	+	+	N	+	N	N	N	+	(+)	+	+		N	N	Ventaja particular relativa transfectabilidad con mayor eficiencia (Friedman 2008)
hTERT-HSC		hTERT	N	+	+	N	+	+	N	N	+	N	N	+	N		N	+	
HSC 180			N	+	N	N	N	+	N	N	N	+	+	N	N		+	N	

La expresión de los marcadores individuales se mostró a nivel de proteína o mRNA

*R. Borojevic, personal communication. †M. Rojkind, personal communication.

La tabla es una combinación de Geerts et. al., Friedman y Herrmann et. al. (Geerts, 2001; Herrmann, Gressner and Weiskirchen, 2007; Friedman, 2008b).

CAPITULO 2

2.1 Justificación del Estudio.

Hasta el momento no se dispone de una terapéutica de eficacia comprobada que permita revertir o inhibir el proceso fibrogénico hepático. El daño hepático crónico persistente o agudo intermitente causa la remodelación de la arquitectura hepática a través de la activación de las CEH induciendo fibrosis, eventualmente cirrosis y finalmente hepatocarcinoma (en algunos casos), si el inductor de daño no es retirado, no se da tratamiento o no se modifican otros factores que apoyan la progresión de la enfermedad. El número de muertes relacionadas con cirrosis hepática en la población mundial superó el millón en 2010. Y en México es la quinta causa de mortalidad general, con alrededor de 28,000 defunciones cada año.

Una consecuencia de la lesión hepática o la inflamación crónica del hígado es la activación de las CEH y diferenciación en células de tipo miofibroblasto, lo cual es causa importante de la fibrosis hepática (Crispe, 2003b). Una de las características únicas de las CEH activadas es el aumento en la expresión de los componentes y moduladores de la MEC que incluyen α -SMA, COL1 α 1, MMPs y TIMPs (Geerts, 2001; Iredale, 2003), marcadores en el desarrollo y la progresión de la fibrosis (Iredale, 2003). El exceso de producción de α -SMA y COL1 α 1 puede ser encontrado debido a la

estimulación con TGF- β , este se secreta a partir de CEH activadas y se sabe que es un mediador esencial de la fibrogénesis (Fallowfield, 2011; Rockey, 2013).

No existe un tratamiento estándar para la fibrosis hepática, por lo que actualmente, se siguen buscando compuestos que permitan revertir y/o inhibir el proceso fibrogénico, que sirvan de base para el desarrollo de tratamientos farmacológicos eficientes. Desde tiempos ancestrales, las plantas han sido fuente importante de compuestos bioactivos contra diversas enfermedades. En trabajos previos, se ha reportado que el uso *in vitro* del EETD en células hepáticas, disminuye el daño causado por CCl₄, de acuerdo a los niveles de AST y MDA liberado por estas. Parte de los procesos principales en el establecimiento del daño hepático es la inducción de la remodelación de la matriz extracelular, fenómeno orquestado por la activación de las CEH. Sin embargo, poco se sabe de los mecanismos moleculares subyacentes y como estos afectan las vías de transducción de señales y la expresión de moléculas asociadas a daño. Por lo que poder establecer a tarves de que mecanismos moleculares son los responsables de la actividad hepatoprotectora del EETD es importante para plantear su aplicación como una estrategia terapéutica contra la cirrosis hepática.

2.2 Hipótesis

El extracto estandarizado de *Turnera diffusa* desencadena mecanismos moleculares que pueden ser asociados con hepatoprotección en las células estelares hepáticas (LX-2)

2.3 Objetivo General

Estudiar los mecanismos moleculares relacionados con la actividad de hepatoprotección desencadenada por la exposición a extracto estandarizado de *Turnera diffusa* en células estelares hepáticas humanas (LX-2)

2.4 Objetivos específicos

1. Evaluar la citotoxicidad del extracto estandarizado de *Turnera diffusa* en células estelares hepáticas humanas.
2. Establecer el modelo de activación en las células estelares hepáticas humanas *in vitro*.
3. Identificar la capacidad del extracto estandarizado de *Turnera diffusa* para modular factores pro-fibrogénicos (α -SMA, COL1 α 1 y TGF- β) inducidos por TGF- β 1 en células estelares hepáticas humanas *in vitro*.

4. Analizar la capacidad del extracto estandarizado de *Turnera diffusa* de modular modificadores de matriz extracelular (MMP2 y TIMP1) inducidos por TGF- β 1 en células estelares hepáticas humanas *in vitro*.
5. Evaluar la modulación del extracto estandarizado de *Turnera diffusa* en marcadores de transición epitelial mesenquimal y dinámica mitocondrial inducidos por TGF- β 1 en células estelares hepáticas humanas *in vitro*.

CAPITULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Cultivo celular y tratamientos

Se utilizó la línea celular LX-2 (células hepáticas estelares) (Xu *et al.*, 2005). Las células se mantuvieron en medio DMEM (11965-092 Gibco, Grand Island, NY, USA) con 2% de SFB (Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% de penicilina y estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, USA), y 1% de glutamina (Gibco, Grand Island, NY, USA); y para realizar el subcultivo las células se trataron con tripsina 1X (25-054-C1, Corning). Para los distintos tratamientos, las células se sembraron 24 h con medio completo y suero fetal bovino (SFB) al 2%, posteriormente se les retiró el medio y se agregó medio sin SFB por 12 h, después de este tiempo se agregó el medio con los diferentes tratamientos a utilizar, etanol, TGF- β 1 (cat# 100-21C, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y extracto estandarizando, definiendo este tiempo como el tiempo cero, las células se incubaron por 24, 48 y 72 h, en todos los tratamientos se utilizó DMSO 0.1% (cat# D2650-100ML, Sigma Life Science).

3.1.1 Conteo celular (Tinción por exclusión)

El conteo de células se realizó con el colorante azul tripano (Trypan Blue Stain 0.4%, 151250-061, GIBCO) utilizando una cámara de Neubauer (Superior, Marienfeld, Germany).

Para contar las células se realizó una dilución 1:10 de la suspensión celular; en un tubo se agregaron 10 μL de la suspensión celular a 90 μL de azul tripano. Se tomaron 10 μL de la dilución y se colocaron en la cámara de Neubauer por capilaridad. En el conteo solo se tomaron en cuenta las células que se encontraban en los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 de la cámara (figura 10) que no estuvieran teñidas con el colorante. El cálculo del número de células por mililitro se realizó mediante la siguiente fórmula: $\# \text{ células/mL} = (\text{total celular}/4) * (\text{factor de dilución}) * (10,000)$.

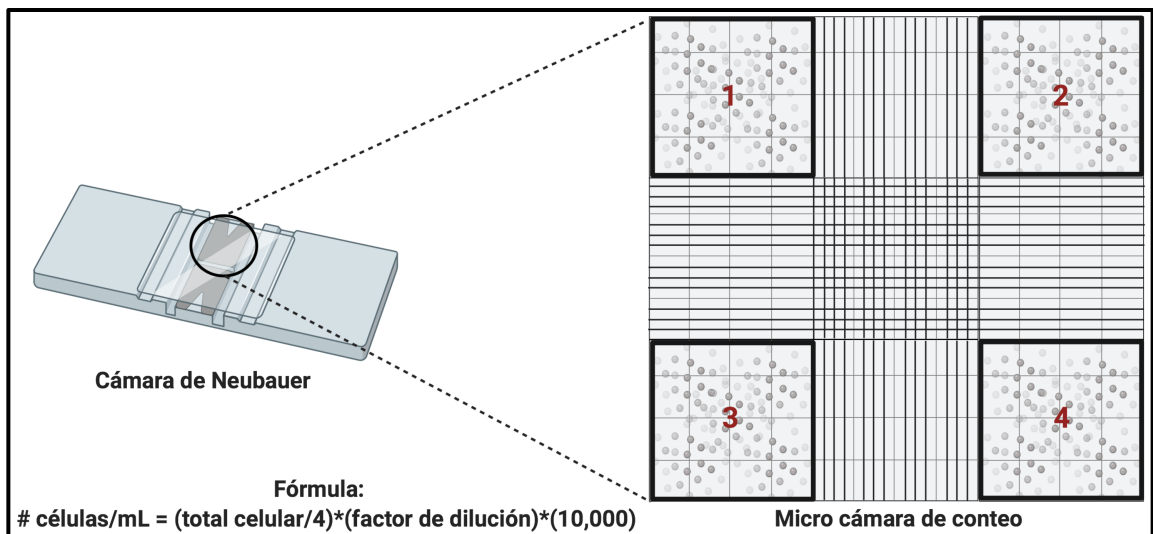


Figura 10. Cámara de Neubauer. En la figura se muestra la cámara de Neubauer, como se realiza el conteo en la micro-cámara y la fórmula para realizar los cálculos. Creado con BioRender.com

3.1.2 Congelamiento de las líneas celulares

Para el congelamiento celular se realizó un conteo y se estima la cantidad por frasco de 75 cm², a partir de esto se tomó la cantidad necesaria de células resuspendidas en medio DMEM completo (2% de SFB, 1X de penicilina y estreptomicina y 1X de glutamina) para tener de 1 a 2 millones de células por criovial. En un criovial se agregaron 100 µL de DMSO (con el fin de preservar la membrana celular al almacenar en el nitrógeno líquido) y 900 µL de medio completo con células (1 a 2 millones) para obtener 1 mL de solución, esto se homogenizó con pipeteo suave. Inmediatamente se pasó el vial a un contenedor de congelamiento gradual (Nalgene) por lo menos durante 4 hr a -80 °C y posteriormente se llevan a confinamiento final a -80 °C y/o nitrógeno líquido.

3.1.3 Descongelamiento celular

Las células se descongelan en DMEM, 2% SFB, 1X penicilina/estreptomicina y glutamina 1X. Una vez descongeladas, las células se expanden en medio con SFB al 2% utilizando los mismos componentes enumerados anteriormente. El vial que contenía las células fue retirado de congelación e inmediatamente incubado en un baño de agua a 37 °C, se monitoreó hasta que las células estuvieron completamente descongeladas (la viabilidad celular máxima depende de la descongelación rápida y completa de las células congeladas, además de no agitar las células en vórtice). Se uso una pipeta de 1 mL para transferir las células a un frasco T25 con 5 mL de medio completo (precalentado a 37

°C) previamente agregado al frasco, se mezcló suavemente con movimientos circulares. Las células posteriormente fueron incubadas a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%. A las 12-14 hr, se intercambió el medio que contenía DMSO (proviniente de las células congeladas) por medio completo.

3.1.4 Subcultivo celular

Cuando las células tenían aproximadamente un 80% de confluencia, se subcultivaron. Se retiró el medio del frasco de cultivo y se agregó 1 o 3 mL de tripsina (precalentada a 37 °C) al frasco T25 o T75 respectivamente e incubó a 37 °C durante 3-5 minutos. Mediante la inspección de la placa se aseguró la disgregación completa de las células, para detener la acción de la enzima se agregó 1 o 3 mL de medio completo (precalentado a 37 °C) al frasco T25 o T75 respectivamente. La mezcla de células disociadas se transfirió a un tubo cónico de 15 mL, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células, se descartó el sobrenadante y se agregaron de 2 a 3 mL de medio completo (precalentado a 37 °C) al tubo cónico y se re-suspendieron las células suavemente mediante pipeteo (sin agitar las células en vórtice). La proporción de división típica fue de hasta 1:2 a 1:4 para T25 o T75 respectivamente hacia un frasco T75.

3.2. Ensayo de viabilidad celular.

Las células LX-2 fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 4×10^3 células/pozo; después de 24 h fueron tratadas con 0.1% DMSO, 0-100 mM de etanol, 1 ng/mL de TGF- β 1, 0-10 mg/mL de EETD y/o 0-100 mM de silibinina (cat# S0417-10G, Sigma Life Science), por 24, 48 y 72 h. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT (cat# 11465007001, Cell Proliferation kit I, Roche, Mannheim, Alemania) de acuerdo a las condiciones del fabricante y se leyó a 600 y 570 nm en un lector de microplacas (Microdrop Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). El cálculo de porcentaje de viabilidad se realizó mediante la comparación de las diferentes condiciones con las células no tratadas las cuales corresponden al 100% de viabilidad celular.

3.3 Extracción de proteínas e inmunotransferencia.

3.3.1 Extracción de proteínas

Se sembraron 3×10^5 células en placas de 6 pozos, se les aplicó el tratamiento a evaluar (DMSO, etanol, TGF- β 1 y/o EETD) y utilizando un buffer de lisis de proteínas se extrajo la proteína total a las 24, 48 y 72 h post-tratamiento. Se eliminó el medio de la placa con pipeta y puntilla desechable, se agregó suavemente 1 mL de PBS frío para lavar y se retiró con pipeta. Después del lavado, se agregó el buffer de lisis de proteínas 1X preparado recientemente (no mas de 15 días), conteniendo Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, Triton X-100 1%, dicloro difenil tricloroetano 1 mM

(DTT, en inglés dithiothreitol), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF, en inglés phenylmethylsulfonyl fluoride), y cóctel completo de inhibidores de proteasas, de acuerdo a condiciones de manufactura (cat# 11697498001, Roche, Mannheim, Germany). La cantidad de buffer de lisis a utilizar dependió de la concentración final deseada de las proteínas en solución de acuerdo a la cantidad celular final estimada, en nuestro caso 50 μL por pozo en placa de 6 pozos. Posteriormente se raspó con raspador (estéril) el contorno del pozo y el centro en un solo sentido, girando la placa en sentido de las manecillas del reloj, a modo de coleccionar las células en todas las posiciones. Se transfirió el líquido a un tubo de 1.5 mL, se mezcló por vortex 10 segundos y se incubó en hielo por 20 min, se centrifugó 5 min a 13,000 rpm a 4 °C para obtener el sobrenadante (proteína) transfiriéndolo a un tubo nuevo y se determinó la concentración de proteína total por el método de Bradford (cat# 5000006, Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad) utilizando una curva como estándar de BSA (cat# A2153-50G, Sigma Life Science) como referencia. Los extractos de proteína cuantificados se conservaron a -80°C hasta su uso.

3.3.2. Cuantificación por el método de Bradford

En una micro placa de 96 pozos se preparó lo siguiente: 1) Blanco: 160 μL de agua miliQ mas 40 μL del reactivo de Bradford (cat# 5000006, Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad); 2) Curva estándar para la cual se preparó un stock único de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (tabla 7) y 3) Muestra: 159 μL de agua miliQ mas 40 μL del reactivo de Bradford mas 1 μL del extracto de proteína sin diluir o diluido 1:2 o 1:3. Primero se agregó el agua, posteriormente las muestra o estándares y finalmente el reactivo de

Bradford, se mezcló con pipeta y punta estéril hasta asegurar la homogeneidad de la muestra, y se dejó reposar la reacción por 5 min. La reacción se leyó a 600 nm en un lector de microplacas (Microdrop Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) y se estimó la concentración de proteína, utilizando la ecuación de la recta obtenida con la curva estándar de referencia (BSA, Sigma Aldrich). Una vez preparada la reacción es estable por una hora.

Tabla 7. Preparación de curva estándar de BSA.

Stock 0.5 µg/µL	Agua (µL)	Reactivo Bradford (µL)	[final] µg/µL
1	159	40	0.5
2	158	40	1
4	156	40	2
6	154	40	3
8	152	40	4
10	150	40	5
12	148	40	6
14	146	40	7

3.3.3. SDS-PAGE

Se prepararon geles de poliacrilamida de 7x10 cm, los cuales constaban de un gel separador a una concentración de 12% y un gel concentrador al 5% (tabla 8 y 9).

Tabla 8. Preparación del gel de poliacrilamida concentrador.

CONCENTRADOR AL 5%						
Solución	Geles	1	2	3	4	6
H₂O Milli-Q	mL	3.65	7.3	10.95	14.6	21.9
Poliacrilamida 30%	mL	0.625	1.25	1.875	2.5	3.75
Buffer TRIS 1M pH 6.8	mL	1.7	3.4	5.1	6.8	10.2
SDS 10%	μL	50	100	150	200	300
PSA 10%	μL	50	100	150	200	300
TEMED	μL	10	20	30	40	60

Nota: H₂O, agua; buffer TRIS, tris hidroximetil aminometano; SDS, dodecilsulfato sódico; PSA, persulfato amónico y TEMED, tetrametiletilendiamina.

Tabla 9. Preparación del gel de poliacrilamida separador.

SEPARADOR									
		11%				12%			
Solución	Geles	1	2	3	4	1	2	3	4
H₂O Milli-Q	mL	2.8	5.6	8.4	11.2	2.5	5	7.5	10
Poliacrilamida 30%	mL	3.7	7.4	11.1	14.8	4.0	8.1	12.1	16.1
Buffer TRIS 1M pH 8.8	mL	3.3	6.6	9.9	13.2	3.3	6.6	9.9	13.2
SDS 10%	μL	100	200	300	400	100	200	300	400
PSA 10%	μL	100	200	300	400	100	200	300	400
TEMED	μL	10	20	30	40	10	20	30	40

Nota: H₂O, agua; buffer TRIS, tris hidroximetil aminometano; SDS, dodecilsulfato sódico; PSA, persulfato amónico y TEMED, tetrametiletilendiamina.

Se tomaron 40 µg de proteína y se mezclaron con buffer de carga 4x en una proporción 1:4 en un tubo cónico de 1.5 mL, se desnaturalizaron las proteínas calentando a 95 °C por 5 min y se pusieron en hielo. Previamente se armó la cámara y se le colocó buffer de corrida 1X para equilibrar el gel y posteriormente se cargaron las muestras, incluyendo el marcador de peso molecular precisión Plus Protein Standards Dual Color (cat# 1610374, Bio-Rad). Los geles se corrieron a 80 V durante 10 min para permitir la entrada de la muestra al gel y posteriormente a 80-120 V por aproximadamente 2 h y finalmente se desmontaron los geles para continuar con la transferencia.

3.3.4. Transferencia

Las muestras fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Amersham Hybond P 0.45 µm (cat 10600023, Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) a 4 °C a 120 V por 2 h, o a 30 V durante toda la noche (12 h). Se recortaron las membranas Hybond-P PVDF con las dimensiones de 6 cm de ancho por 8 cm de largo, se sumergió la membrana en metanol 100% (v/v) por un minuto, posteriormente se lavó la membrana con agua Milli-Q por 5 min hasta no ver trazas de metanol, y se equilibró la membrana con buffer de transferencia 1X durante 15 min antes de realizar la transferencia. Además se equilibraron 4 piezas de papel filtro, 4 esponjas y un cassette por cada gel a transferir en buffer de transferencia 1X en una charola grande.

Se sacó el gel de la cámara de electroforesis inmediatamente terminando de correr el gel, y se removió y descartó el gel concentrador. El gel se colocó

cuidadosamente sobre la membrana, un filtro, esponja y el cassette de transferencia (todo previamente equilibrado,) se eliminaron las burbujas con la pipeta (rodando la pipeta sobre el filtro), se colocó un papel filtro humedecido sobre el gel, la esponja y se armó el set. El set se colocó en la cámara de transferencia con el buffer frío y los hielos de buffer de corrida 1X previamente congelados, se transfirió a 4 °C a 120 V por 2 h o a 30 V por toda la noche.

3.3.5. Tinción rojo de Ponceau

Después de la transferencia se tiñó la membrana con el reactivo rojo de Ponceau, con la finalidad de la evaluación de la transferencia, observando que no hubiera burbujas y que estuvieran presentes todas las bandas de proteínas en la membrana. Se enjuagó la membrana teñida con buffer TBS-Tween 1X utilizando un agitador mecánico, y se hicieron lavados de 5 a 10 minutos cada uno hasta eliminar el colorante.

3.3.6. Western Blot

Se sumergió la membrana en el buffer de bloqueo con leche al 5% y se incubó por 1 h de preferencia a 4 °C (puede quedarse toda la noche), posteriormente se lavó la membrana con T-TBS 1X para eliminar restos del buffer de bloqueo (3 lavados de 10 min), se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en T-TBS 1X con 2.5% de leche toda la noche a 4 °C. Las membranas fueron incubadas con cada uno de los siguientes anticuerpos (tabla 10): anti- α -SMA (ab32575, Abcam, Cambridge, MA, USA) con dilución 1:1000, anti-TGF- β (500-M66, PeproTech) con dilución 1:1000,

anti-TIMP1 (ab109125, Abcam) con dilución 1:1000, MFN2 (Ab56889, Abcam) con dilución 1:1000 y anti-GAPDH (MAB5718, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) con dilución 1:2500. Se retiró el anticuerpo primario, las membranas se lavaron tres veces con T-TBS 1X por 10 min en agitación a TA, luego se incubaron con IgG anti-ratón o IgG anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Promega, Madison, WI, EE.UU.) ambas a una dilución 1:10,000 por 2 h y en agitación de preferencia a 4 °C, las membranas se lavaron con 3 veces con buffer T-TBS 1X por 10 min en agitación a TA. La detección de la señal de proteína presente en la membrana se midió mediante quimioluminiscencia utilizando un sustrato ECL Clarity™ Western (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) y ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad). Cada experimento fue realizado por triplicado y se hizo un análisis densitométrico de la expresión relativa de cada proteína con el software Image J, para el análisis estadístico se uso una prueba de ANOVA considerándose estadísticamente significativo con una $p < 0.05$.

Tabla 10. Tabla de anticuerpos utilizados y dilución a la que se trabajó.

Anticuerpo	Peso/hospedero	no de catalogo	Dilución
Anti-mouse	NA	W4021, Promega	1:10,000
Anti-rabitt	NA	W4011, Promega	1:10,000
TIMP-1	23 kDa (rabbit)	ab109125, Abcam	1:1,000
α-SMA	42 kda (rabbit)	ab32575, Abcam	1:1,000
TGF- β	44, 31, 13 (mouse)	500-M66, PeproTech	1:1,000
MFN-2	86 kDa (mouse)	ab56889, Abcam	1:1,000
GAPDH	39 kDa (mouse)	MAB5718, R&D Systems	1:2,500
β -actina	43 kDa (mouse)	MAB1501, clone C4, Merck Millipore	1:10,000

3.3.7. Remoción de anticuerpos (stripping out)

Para deshacer la unión antígeno anticuerpo para la detección de alguna otra proteína se colocó la membrana en buffer de remoción de anticuerpos (stripping out) 1X completo durante 30 min a 50 °C con agitación (evitando la evaporación), se lavó la membrana tantas veces como fuera necesario con buffer TBS-Tween 1X hasta eliminar los remanentes de l-mercaptoetanol. Nuevamente se sumergió la membrana en el buffer de bloqueo con leche al 5% e incubó por 1 h de preferencia a 4 °C o toda la noche. Posteriormente se lavó la membrana con T-TBS 1X para eliminar restos del buffer de bloqueo (3 lavados de 10 min).

3.4 Extracción de RNA.

Se realizó extracción de RNA total a partir de células LX-2 tratadas como se mencionó anteriormente utilizando TRIzol (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.), cloroformo (Merck) y realizando lavados con isopropanol (Merck) y etanol al 75% en agua DEPC (Diethyl pyrocarbonate, Sigma-Aldrich, D5758-25ML), la pastilla fue re-suspendida en 30 µe de agua DEPC.

En todos los ensayos para extracción de RNA se sembraron 100,000 células por pozo (LX-2) en placas de 24 pozos, y se siguió el esquema de tratamiento a utilizar dependiendo del ensayo. A las células cultivadas en placas después del tratamiento (24, 48 y 72 h) se les retiró el medio, inclinando la placa y con pipeta de manera suave (no se utilizó bomba de vacío para retirar el medio), posteriormente se agregaron 250 µL del

reactivo TRIzol a la placa de cultivo para lisar las células y se pipeteó el lisado varias veces para homogeneizar, el lisado se guardó en microtubos de 1.5 mL a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su extracción (no mas de un año), esto con la finalidad de recolectar todos los tiempos de los tratamientos. Las muestras se sacaron del congelador y se permitió su descongelación a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se incubaron durante 5 minutos (ya descongeladas) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteínas, se agregaron $200\text{ }\mu\text{L}$ de cloroformo por 1 mL de reactivo TRIzol utilizado para la lisis (por tanto se utilizaron $50\text{ }\mu\text{L}$ por muestra), los tubos se mezclaron vigorosamente en vortex por mínimo 30 segundos y se incubaron por 2-3 minutos a temperatura ambiente (TA) y se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a $12,000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. En la centrifugación la mezcla se separó en tres fases: una fase orgánica roja inferior de fenol-cloroformo (contiene proteína), una interface blanca lechosa (contiene DNA), y una fase acuosa superior incolora (contiene RNA). Se transfirió la fase acuosa que contiene el RNA total a un micro tubo nuevo de 1.5 mL, evitando transferir la capa orgánica o de interface, se agregó $1\text{ }\mu\text{L}$ de glucógeno, esto con la finalidad de poder ver la pastilla a simple vista y se agregó 1 mL de 2-propanol por mL de reactivo TRIzol (por tanto se utilizaron $250\text{ }\mu\text{L}$ por muestra), se mezcló vigorosamente por inversión, y la mezcla se dejó reposar por 10 minutos a TA, en caso de no poder continuar con el procedimiento las muestras se guardaron en este paso del procedimiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis. Las muestras con 2-propanol se centrifugaron a $12,000 \times g$ durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, el precipitado de RNA total se formó como un gránulo blanco-transparente en el lado y el fondo del tubo, se decantó el sobrenadante cuidando no tirar la pastilla de RNA. El sedimento de RNA se lavó agregando 1 mL de etanol al 75% (diluido en agua DEPC), se agitó en vortex por mínimo 30 segundos, se centrifugó a $15,000 \times g$ durante 15

minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante cuidando no tirar la pastilla de RNA, se repitió el lavado con etanol al 75% (diluido en agua DEPC) nuevamente. Después de los dos lavados y descartar el sobrenadante a las muestras se les dio un spin en centrifuga para retirar las trazas de etanol al 75% (diluido en agua DEPC) con una pipeta, el sedimento de RNA se dejó secar durante 5 a 10 minutos mediante secado al aire o al vacío, no permitiendo que el sedimento de RNA se seque por completo, ya que esto disminuye su solubilidad. La pastilla de RNA se disolvió en 30 µL agua DEPC y para facilitar la disolución, se mezcló pipeteando repetidamente con una micropipeta y se incubó a 55-60 °C durante 10-15 minutos.

3.5 Cuantificación de RNA total y cDNA.

La cuantificación del RNA total y el cDNA amplificado se realizó mediante la técnica de espectrofotometría en nanodrop 2000 (Thermofisher scientific).

Los ácidos nucleicos tienen una absorbancia máxima a 260 nm. La relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm se utilizó como medida de pureza en las extracciones de DNA y RNA. Una relación de 260/280 de ~ 1.8 se aceptó como pura para el DNA; una proporción de ~ 2.0 se aceptó como pura para el RNA. Las relaciones anormales de 260/280 generalmente indican que una muestra está contaminada por fenol residual, guanidina u otro reactivo utilizado en el protocolo de extracción, en esos casos la relación es baja. También pueden encontrarse proporciones inexactas a concentraciones muy bajas de ácidos nucleicos (<10 ng/µL). La contaminación química residual de los procedimientos de extracción de ácido nucleico puede dar lugar a una sobreestimación de la concentración de ácido nucleico y/o influir negativamente en el análisis posterior.

La contaminación química de las muestras con relaciones pobres de 260/280 a menudo se puede identificar mediante el examen de los espectros completos.

La relación A260/A230 también debe estar por encima de 2.0. Una relación baja de A260/230 indica contaminación con las soluciones de lavado, sales caotrópicas, fenoles o proteínas, es muy probable que sea debido a la contaminación de las muestras con buffer de lavado.

3.6 Retrotranscripción y qPCR para la detección de la expresión de *COL1 α 1*, α -*SMA*, *TGF- β* , *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *MFN2* y β -*actina*.

El RNA se sometió a retrotranscripción (RT-PCR), se utilizaron 300 ng de RNA para la síntesis de cDNA con la enzima M-MLV RT (Life Technology; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (tabla 11 y 12), y el cDNA obtenido fue cuantificado.

Tabla 11. Condiciones de reacción para RT-PCR (M-MLV) a partir de RNA total con oligonucleótidos random y MMLV.

Concentración inicial	Concentración final
Oligonucleótidos random (500 µg/mL)	1 µL (0.5 µg totales)
RNA mensajero	300 ng
H₂O	Hasta completar 11.5 µL
Calentar a 72 °C por 10 min, poner en hielo y dar un spin	
Buffer 5x	4 µL (1X)
DTT 0.1 M	2 µL
RNaseOUT 40 U/µL	0.5 µL (20 U totales)
dNTPs 10 mM, Mix (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro)	1 µL
MMLV-RT (200 U/ µL)	1 µL (200 U)
Volumen final de 20 µL	

Tabla 12. Programa utilizado para RT-PCR (MMLV) a partir de RNA total con oligonucleótidos random y MMLV.

Tipo de ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	72 °C	10 min	1
Alineamiento	25 °C	10 min	1
Extensión	37 °C	60 min	1
Extensión final	95 °C	5 min	1
Conservación	4 °C	Infinito	Infinito

Los cDNA fueron utilizados para la detección de *COL1a1*, *α-SMA*, *TGF-β1*, *MMP2*, *TIMP1*, *MFN2* y *β-actina* (control endógeno) mediante PCR en tiempo real (qPCR). El termociclador de PCR en tiempo real utilizado fue un StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Se utilizó SYBR green para la detección y se utilizaron los oligonucleótidos mostrados en la tabla 13. Para cada reacción de qPCR, se utilizaron los siguientes reactivos: 10 µL de SYBR-Green PCR Master Mix 2x (Applied

Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), 200 - 400 nM de cada cebador, 200 ng de cDNA, y completando a un volumen total de 20 μ L con H₂O (tabla 14). Las condiciones de los ciclos térmicos fueron 95 °C durante 10 minutos y 40 ciclos de 95 ° C durante 15 s y 60 ° C durante 60 s (tabla 15). Se utilizó el ensayo TaqMan para tilizó el Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La expresión de β -actina se utilizó como gen endógeno y se calcularon el número de veces de la expresión génica mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados en qPCR.

Oligonucleótido	5' a 3'
COL1α1	Fwd -CGATGGATTCCAGTTCGAGTATG
	Rv-CTTGCAGTGGTAGGTGATGTT
MMP2	Fwd -GACAGGTGATCTTGACCAGAAT
	Rv-GTGTGTAGCCAATGATCCTGTA
α-SMA	Fwd -CTACTGCTGAGCGTGAGATTG
	Rv-CAGGCAACTCGTAACTCTTCTC
TGF-β	Fwd -CCCACAACGAAATCTATGACAAGT
	Rv-AGCAACACGGGTTTCAGGTA
TIMP1	Fwd -CAATTCCGACCTCGTCATCAG
	Rv-CCTAAGGCTTGGAACCCTTTATAC
SNAI1	Fwd -CCACGAGGTGTGACTAACTATG
	Rv-ACCAAACAGGAGGCTGAAATA
MFN2	Fwd -CCTTCCTTGAAGACACGTACAG
	Rv-GATGCCTCTCACTTTGGATAGG

Tabla 14. Condiciones de reacción específicas para qPCR a partir de cDNA de los genes *COL1a1*, *α-SMA*, *TGF-β1*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *MFN2* y *β-actina*.

TGF-β		COL1a1	
Reactivos	Volumen Final	Reactivos	Volumen Final
Mezcla de reacción (2x) PowerUP SYBR Green	10 μL (1x)	Mezcla de reacción (2x) PowerUP SYBR Green	10 μL (1x)
Oligonucleótido Fwd (2.5 μM)	3.2 μL (400 nM)	Oligonucleótido Fwd (2.5 μM)	3.2 μL 400 nM
Oligonucleótido Rv (2.5 μM)	3.2 μL (400 nM)	Oligonucleótido Rv (2.5 μM)	1.6 μL 200 nM
cDNA (200 ng totales)	2 μL	cDNA (200 ng totales)	2 μL
H ₂ O	1.6 μL	H ₂ O	3.2 μL
Volumen total	20 μL	Volumen total	20 μL
TIMP1		α-SMA	
Reactivos	Volumen Final	Reactivos	Volumen Final
Mezcla de reacción (2x) PowerUP SYBR Green	10 μL (1x)	Mezcla de reacción (2x) PowerUP SYBR Green	10 μL (1x)
Oligonucleótido Fwd (2.5 μM)	3.2 μL (400 nM)	Oligonucleótido Fwd (2.5 μM)	3.2 μL (400 nM)
Oligonucleótido Rv (2.5 μM)	3.2 μL (400 nM)	Oligonucleótido Rv (2.5 μM)	3.2 μL (400 nM)
cDNA (200 ng totales)	2 μL	cDNA (200 ng totales)	2 μL
H ₂ O	1.6 μL	H ₂ O	1.6 μL
Volumen total	20 μL	Volumen total	20 μL
MMP2		SNAI1	
Reactivos	Volumen Final	Reactivos	Volumen Final
Mezcla de reacción (2x) PowerUP SYBR Green	10 μL (1x)	Mezcla de reacción (2x) PowerUP SYBR Green	10 μL (1x)
Oligonucleótido Fwd (2.5 μM)	3.2 μL (400 nM)	Oligonucleótido Fwd (5 μM)	1 μL (250 nM)
Oligonucleótido Rv (2.5 μM)	1.6 μL (200 nM)	Oligonucleótido Rv (5 μM)	1 μL (250 nM)
cDNA (200 ng totales)	2 μL	cDNA (200 ng totales)	2 μL
H ₂ O	3.2 μL	H ₂ O	6 μL
Volumen total	20 μL	Volumen total	20 μL
	MFN2		
	Reactivos	Volumen Final	
	Mezcla de reacción (2x) PowerUP SYBR Green	10 μL (1x)	
	Oligonucleótido Fwd (5 μM)	1.6 μL (400 nM)	
	Oligonucleótido Rv (5 μM)	1.6 μL (400 nM)	
	cDNA (200 ng totales)	2 μL	
	H ₂ O	4.8 μL	
	Volumen total	20 μL	

Tabla 15. Programa utilizado para la qPCR a partir de cDNA de los genes *COL1a1*, *α -SMA*, *TGF- β 1*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *MFN2* y *β -actina*.

Tipo de ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Dual-Lock DNA polymerase	95 °C	10 min	1
Desnaturalización	95 °C	15 seg	40
Alineamiento/Extensión	60 °C	60 seg	40

3.7 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado y los datos se analizaron mediante la prueba t de Student o el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para la comparación entre dos grupos o entre varios grupos, respectivamente. El programa utilizado fue GraphPad Prism 6 (Northside Dr. Suite, San Diego, CA, EE. UU.). Todos los datos se expresaron como media \pm SEM y se consideró una diferencia estadísticamente significativa con un valor $p < 0.05$.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Evaluación del EETD en la viabilidad celular de HepG2.

Se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante la técnica de MTT, este ensayo colorimétrico se basa en la escisión de la sal amarilla de tetra-zolium MTT a cristales de formazán púrpura por el metabolismo activo de las células y por lo tanto viables (proliferación celular), esta reducción celular involucra el nucleótido de piridina, cofactores NADH y NADPH.

Para evaluar la actividad antifibrótica del EETD en células LX-2 y tener una línea celular para comparar los resultados obtenidos, se decidió utilizar la línea celular de hepatocarcinoma celular humano (HepG2), para esto se evaluó la citotoxicidad del EETD en esta línea mediante un ensayo de MTT. Se evaluó un rango de concentraciones que fue desde 0.05 a 10 mg/mL durante 24h (figura 11), con la finalidad de encontrar aquella concentración que permitiera conocer la mínima cantidad del EETD con mas del 80% de la viabilidad celular, observándose que la viabilidad no fue significativamente

afectada a las concentraciones de 0.5, 0.1 y 0.05 mg/mL. Por lo que se concluyó que a dosis menores de 1.0 mg/mL no presenta un efecto letal en la línea celular HepG2 y se conserva más del 90% de viabilidad celular.

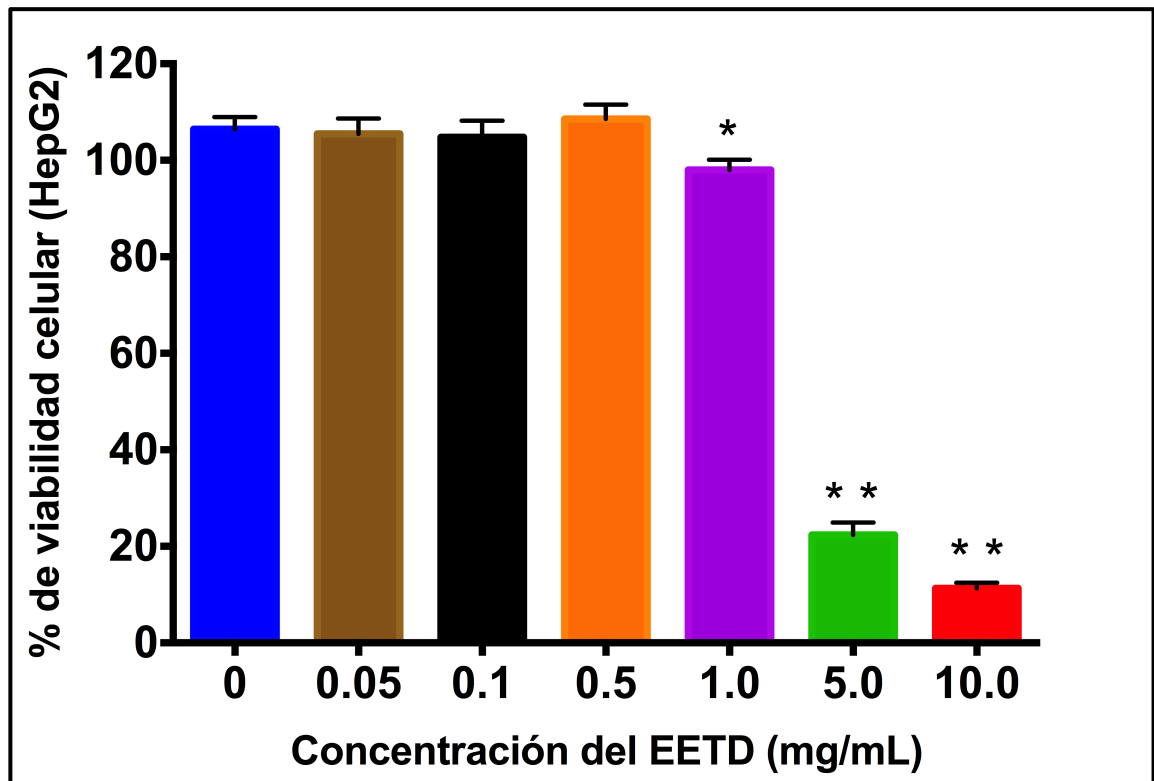


Figura 11. Efecto del EETD en la viabilidad celular de HepG2 a las 24 h. Las barras indican el porcentaje de viabilidad de las células HepG2 tratadas con el EETD (0 - 10 mg/mL) por 24 h, se realizó mediante el ensayo de MTT. * $p < 0.001$ y ** $p < 0.0001$.

Debido a que las CEH son las principales células orquestadoras de la fibrosis y el objetivo de este proyecto fue la elucidación de posibles vías moduladas por el EETD y no una interacción entre distintos tipos celulares, concluimos que no era necesaria una línea control para comparar los resultados con la línea celular LX-2, por tanto no se continuó con los ensayos en células HepG2.

4.2 Evaluación del EETD, TGF- β , silibinina y etanol en la viabilidad celular de LX-

2

TGF- β 1 es la principal citocina pro-fibrogénica, por tanto ésta se utilizó para promover la activación de las CEH, por tanto se evaluó la viabilidad de las células LX-2 en presencia de ésta hasta las 72 h. De acuerdo a la literatura una concentración de 1 ng/mL de TGF- β 1 provoca expresión estadísticamente significativa de marcadores pro-fibróticos como mRNA-*COL1 α 1* y *α -SMA* comparada con el control sin TGF- β 1 (Ikeda et al., 2011), por lo que se decidió realizar el ensayo de viabilidad para la concentración de 1.0 ng/mL. En la figura 12A se observa que a la concentración de 1.0 ng/mL de TGF- β 1 hasta las 72h se mantiene la viabilidad celular por encima del 90% comparado con el control sin tratamiento (100% de viabilidad). Con este ensayo se pudo determinar que podríamos utilizar la cantidad de 1 ng/mL de TGF- β 1 para las posteriores evaluaciones en la línea celular LX-2.

El etanol es un conocido inductor de fibrosis en el hígado, por esto se decidió utilizar este compuesto como inductor de estrés celular para activar a las CEH. Esta reportado que a una concentración de 25 mM de etanol en un modelo *in vitro* de células LX-2 se obtiene expresión de mRNA estadísticamente significativa de los marcadores pro-fibrogénicos *α -SMA* y *COL1 α 1* (Chen et al., 2011). Por tanto se evaluó la viabilidad celular de las células LX-2 en presencia de etanol a concentraciones de 0 a 100 mM hasta 72 h. Se observó viabilidad celular de mas del 70% hasta la concentración de 50 mM y mas del 60% para la concentración de 100 mM hasta las 72 h en las células LX-2 (figura 12B).

La silibinina es el componente más activo de la silimarina presente en el cardo mariano (*Silybum marianum*). Su mecanismo de acción es complejo y altamente beneficioso en la protección de los hepatocitos contra hepatotoxicidad, en parte por estrés oxidativo, inducida por fármacos y químicos *in vivo* e *in vitro*. Por tanto se evaluó la viabilidad celular de LX-2 en presencia de silibinina a concentraciones de 0 a 100 μM hasta las 72 h, para ser utilizada como control de protección de activación de las células LX-2 (Ezhilarasan *et al.*, 2016). Se observó que todas las concentraciones utilizadas de silibinina conservaron mas del 90% de la viabilidad celular hasta las 72 h (figura 12C), indicando que el compuesto no provoca la muerte celular de LX-2.

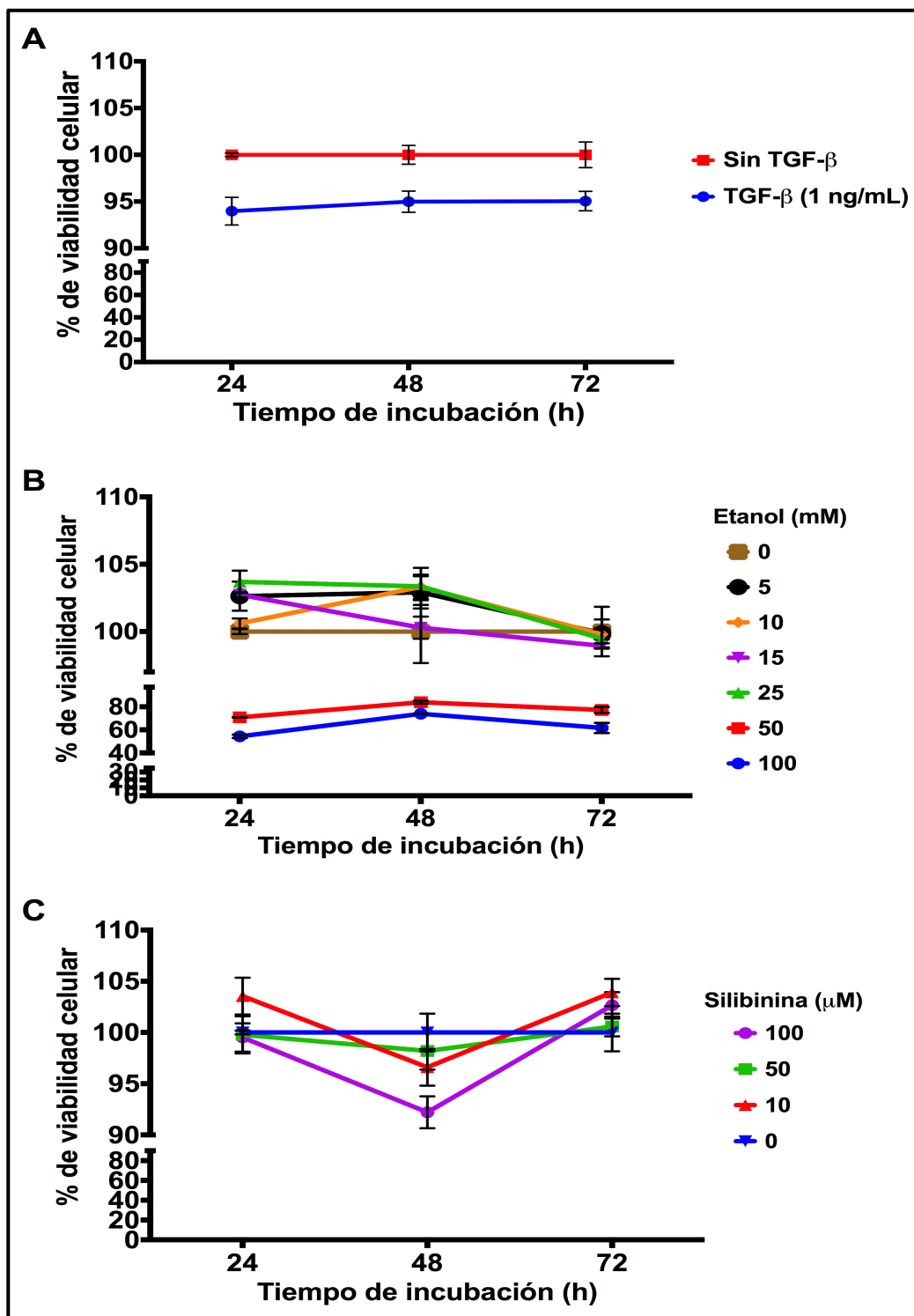


Figura 12. Efecto de TGF-β1, etanol y silibinina en la viabilidad celular de LX-2 hasta las 72h. Los puntos de las líneas continuas indican el porcentaje de viabilidad de las células LX-2 tratadas con los diferentes compuestos a evaluar hasta las 72 h. A) TGF-β1 (0 - 1 ng/mL). B) Etanol (0 – 100 mM). C) Silibinina (0 - 100 μM). La viabilidad fue medida por el ensayo de MTT y todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Para la posterior evaluación de la actividad antifibrótica del EETD, se procedió a determinar las concentraciones de éste que no fueran citotóxicas para la línea celular LX-2 mediante un ensayo de MTT. Se utilizó un rango de concentraciones del EETD de 0.05 a 10 mg/mL a las 24 h (figura 13A), con la finalidad de elegir las concentraciones que no disminuyeran la viabilidad celular por debajo del 60%. Se observó que la viabilidad celular estuvo por encima del 60% en concentraciones menores a 1 mg/mL durante 24 h; al contrario, se observó una reducción significativa de la viabilidad celular (>80%) cuando las células se incubaron con 5,0 y 10,0 mg/mL de EETD (figura 13A). Además, el tratamiento con EETD durante 24 h inhibió la proliferación de células LX-2 de una manera dependiente de la concentración (figura 13A). La concentración inhibitoria 50 (IC50) del EETD fue de 1,148 mg/mL en células LX-2 (figura 13B). Con base en esto, la evaluación de la citotoxicidad del EETD hasta 72 h, se realizó utilizando un rango de concentraciones de 0.05 a 5.0 mg/mL en células LX-2 en diferentes puntos de tiempo (24, 48 y 72 h). Se encontró que a concentraciones mayores de 0.15 mg/mL del EETD, la proliferación celular disminuye de una manera dependiente del tiempo (figura 13C). A concentraciones de 1.0 y 5.0 mg/mL, el EETD inhibió la proliferación desde puntos de tiempo tempranos (24 h); mientras que a concentraciones de 200 a 500 µg/mL (0.2 a 500 mg/mL), la viabilidad celular disminuyó hasta el 60 o 30 % respectivamente a las 72 h y a concentraciones menores a 200 µg/mL mantuvieron la viabilidad celular alrededor del 70% (figura 13C). Con base en estos resultados, se decidió utilizar el EETD en las concentraciones de 100 y 200 µg/mL hasta las 72 h porque no demostró efecto citotóxico.

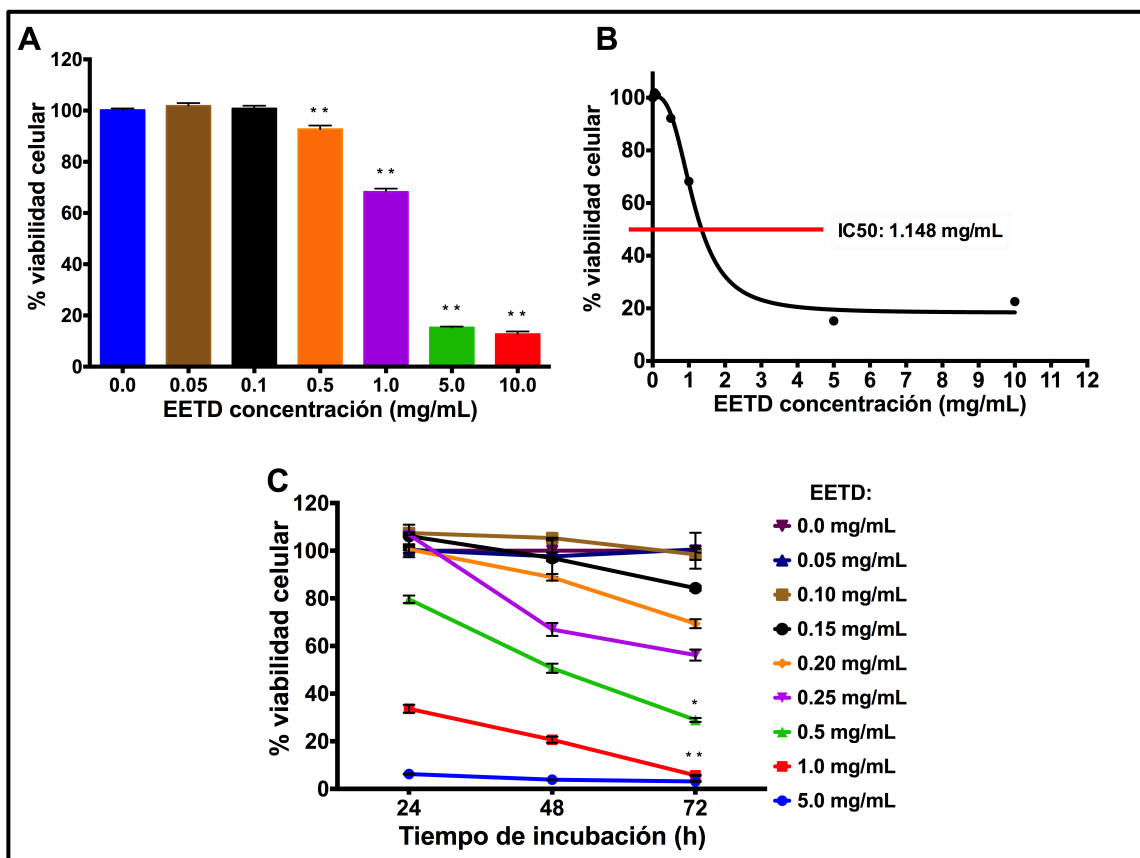


Figura 13. Efecto del EETD sobre la viabilidad celular de LX-2. A) Evaluación de la viabilidad celular de LX-2 expuestas al EETD a concentraciones de 0 a 10 mg/mL durante 24 h, las barras indican el porcentaje de viabilidad celular. B) Grafica del IC50 de 1,148 mg/mL del EETD en células LX-2. C) Evaluación de la viabilidad celular de LX-2 expuestas a concentraciones de 5.0 a 0.05 mg/mL de EETD durante 24, 48 y 72 h. La viabilidad se midió mediante el ensayo MTT y todos los experimentos fueron realizados por triplicado. * $p < 0.01$ y ** $p < 0.0001$.

La finalidad de los ensayos de viabilidad fue buscar las concentraciones a utilizar de los diferentes compuestos que no provocaran muerte celular y permitieran la evaluación biológica de la actividad del EETD en combinación con estos en la línea celular LX-2. En la tabla 16 se resumen los resultados de interés obtenidos de los compuestos evaluados en los ensayos de viabilidad.

Tabla 16. Viabilidad celular mediante el ensayo de MTT en la línea celular LX-2 de compuestos evaluados hasta 72 h.

COMPUESTO	Concentración	Viabilidad (%)
EETD	0.2 mg/mL (200 µg/mL)	70
Etanol	50 mM	76
TGF-β1	1 ng/mL	100
Silibinina	100 µM	100

4.3 Establecimiento del modelo de activación con TGF-β1 y etanol en la línea celular LX-2.

Para el establecimiento del modelo de activación, se cultivaron células LX-2 en medio completo durante 24 h, posteriormente se retiró el SFB y se aplicó el tratamiento correspondiente, TGF-β1 (10 ng/mL) o etanol (50 mM), evaluándose la expresión de mRNA-*α-SMA* y *COL1α1* a tres puntos de tiempo (24, 48 y 72 h). En la figura 14A se observa que en todos los tiempos hay sobreexpresión de mRNA-*COL1α1* y únicamente a las 72 h para la expresión de mRNA-*α-SMA* (figura 14B).

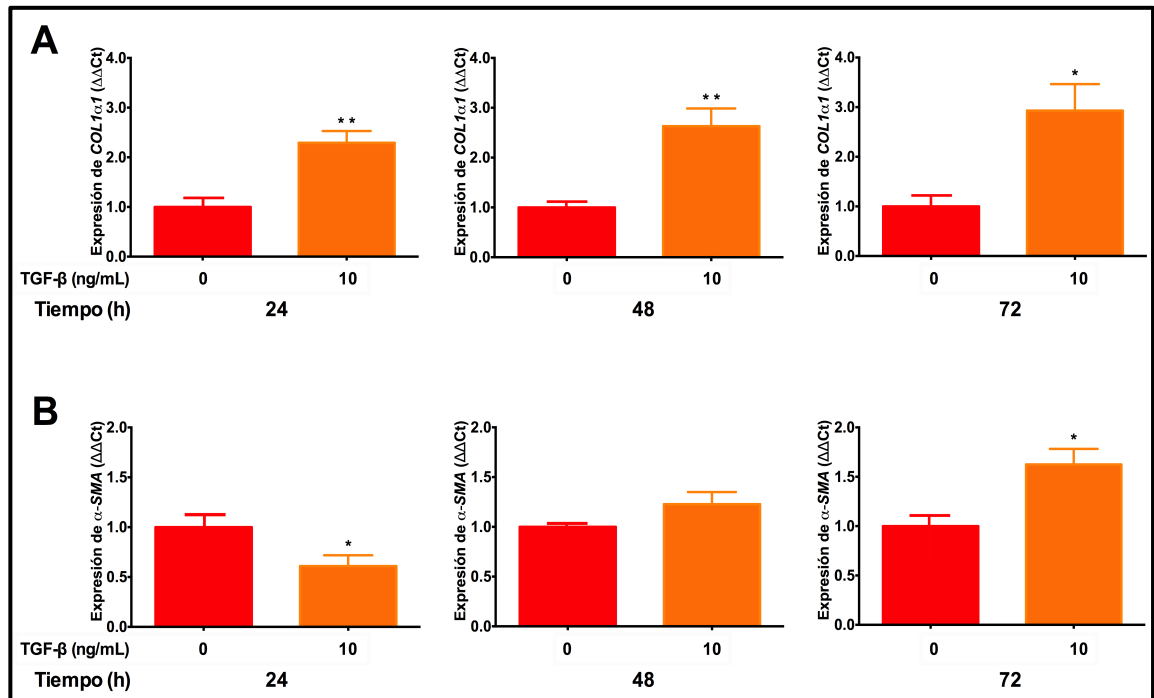


Figura 14. Efecto de TGF-β en la expresión de α -SMA y COL1 α 1 en células LX-2. A) Expresión de mRNA-COL1 α 1 en células LX-2 tratadas con TGF-β1 (10 ng/mL). B) Expresión de mRNA- α -SMA en células LX-2 tratadas con TGF-β1 (10 ng/mL). Las células LX-2 se sembraron en placas de 24 pocillos en medio completo durante 24 h, se retiró el medio con SFB, se aplicó el tratamiento con TGF-β1 (10 ng/mL) y se midió la expresión de los marcadores por RT-qPCR a las 24, 48 y 72 h. Se usó β -actina como control. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, las barras representan n=6. *TGF-β1 versus sin TGF-β1 (*p<0.01 y **p<0.0001).

En la evaluación de la expresión de mRNA- α -SMA y COL1 α 1 con el estímulo de etanol (50 mM) observamos que únicamente hay sobreexpresión de mRNA-COL1 α 1 a las 24 h (figura 15A), y que no hay cambios significativos en la expresión de mRNA- α -SMA a ningún tiempo (figura 15B).

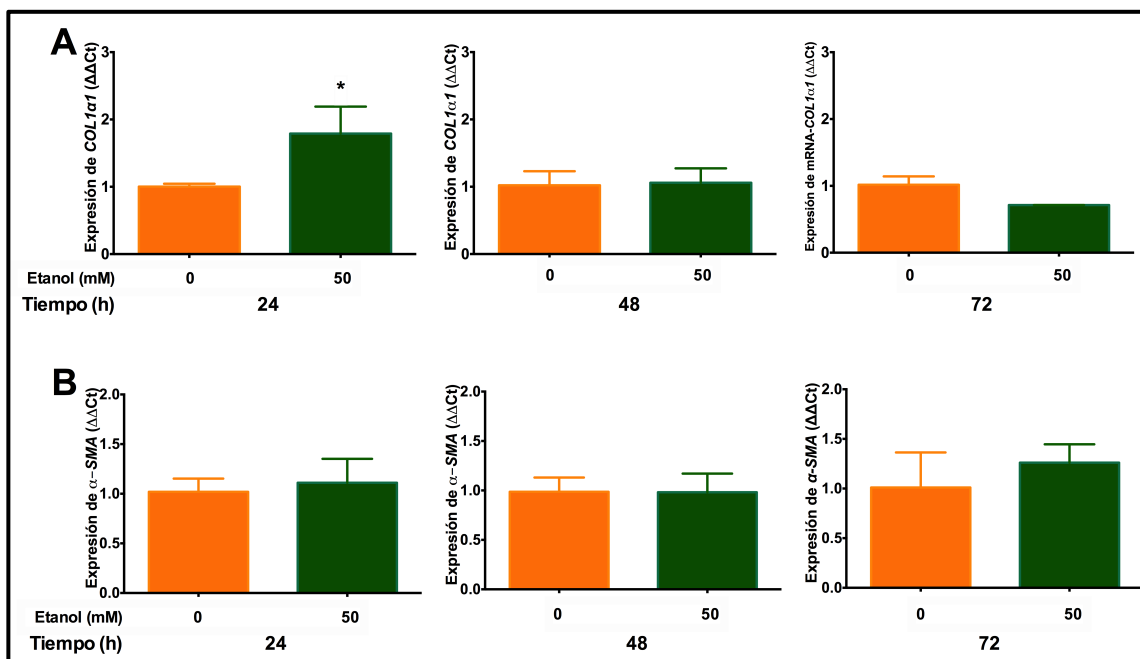


Figura 15. Efecto de etanol en la expresión de α -SMA y COL1a1 en células LX-2. A) Expresión de mRNA-COL1a1 en células LX-2 tratadas con etanol (50 mM). B) Expresión de mRNA- α -SMA en células LX-2 tratadas con etanol (50 mM). Las células LX-2 se sembraron en placas de 24 pocillos en medio completo durante 24 h, se retiró el medio con SFB, se aplicó el tratamiento con etanol (50 mM) y se midió la expresión de los marcadores por RT-qPCR a las 24, 48 y 72 h. Se usó β -actina como control. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, las barras representan n=6. *Etanol 50 mM versus sin etanol (*p<0.05).

4.4 Los efectos del EETD en la expresión de marcadores COL1a1 y α -SMA en la línea celular LX-2 en presencia de TGF- β 1 y etanol en dos modelos distintos.

La evaluación de los marcadores pro-fibrogénicos COL1a1 y α -SMA se abordó de dos maneras distintas (figura 16). El primer abordaje fue la evaluación del efecto pre-exposición al EETD y posteriormente a los inductores de activación TGF- β 1 o etanol en la línea celular LX-2 (figura 16A), con el objetivo de saber si el EETD preserva o protege a las CEH del daño causado por TGF- β 1 o etanol. El segundo abordaje fue la evaluación del efecto de modulación de daño causado por los inductores de activación y

posterior exposición al EETD, con el objetivo de saber si el EETD fue capaz de revertir o atenuar el daño causado por TGF- β 1 o etanol (figura 16B).

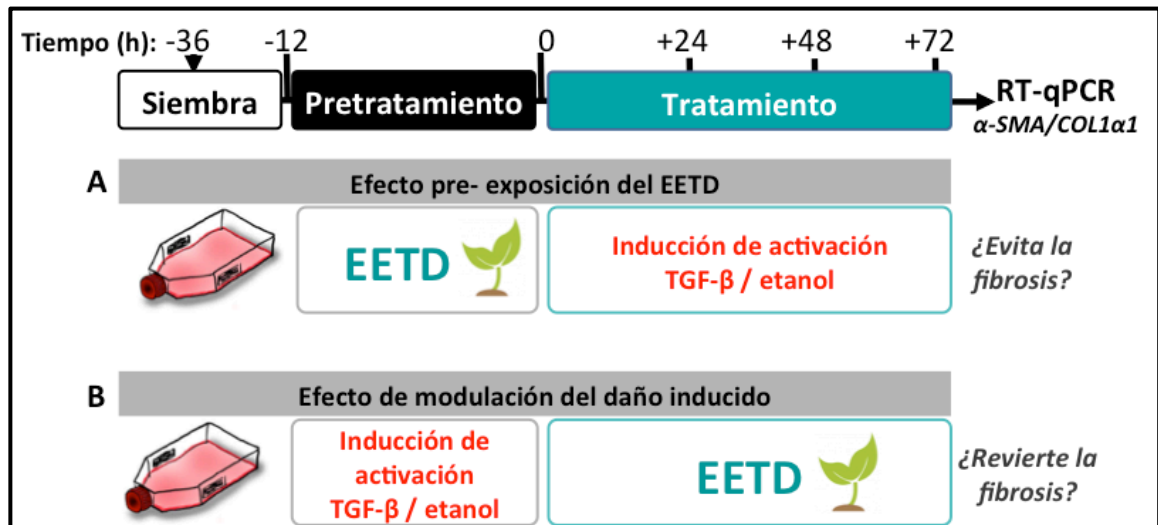


Figura 16. Esquema de tipos de tratamiento en células LX-2. En el esquema se observa la línea cronológica a utilizar en cada uno de los tratamientos. A) Esquema representativo para el tratamiento de efecto pre-exposición al EETD y posteriormente a los inductores de activación TGF- β 1 o etanol. B) Esquema representativo para el tratamiento del efecto de modulación de daño causado por los inductores de activación y posterior exposición al EETD.

4.4.1 Los efectos del EETD en la expresión de los marcadores *COL1α1* y *α-SMA* en el tratamiento de efecto pre-exposición al EETD y posteriormente a los inductores de activación TGF- β 1 o etanol.

En el modelo de pre-exposición al EETD, se cultivaron células LX-2 en medio completo durante 24 h, se les retiró el SFB y se aplicó el EETD (150 μ g/mL) durante 12 h, nuevamente se retiró el medio y se agregó el inductor de activación correspondiente TGF- β 1 (1 ng/mL) o etanol (50 mM) y/o EETD (150 μ g/mL), evaluándose la expresión de mRNA-*α-SMA* y *COL1α1* a tres puntos de tiempo (24, 48 y 72 h).

En el modelo de pre-exposición al EETD con TGF- β 1 (1 ng/mL) como inductor de activación, se observó sobreexpresión de mRNA-*COL1 α 1* con el tratamiento con TGF- β 1 en todos los tiempos, teniendo mayor expresión a las 24 h y disminuyendo con respecto al tiempo (figura 17A). Cuando las células estuvieron en presencia del EETD (150 μ g/mL) y TGF- β 1 (1 ng/mL) hubo subexpresión de mRNA-*COL1 α 1* a las 24 y 48 h con respecto al control con TGF- β 1 (1 ng/mL), pero aun así la expresión fue mayor que en el control sin tratamiento; a las 72 h este efecto ya no fue observado (figura 17A). Cuando las células estuvieron expuestas únicamente al EETD (150 μ g/mL) la expresión de mRNA-*COL1 α 1* aumentó con respecto al control sin tratamiento únicamente a las 24 h; pero a las 48 y 72 h la expresión disminuyó hasta por debajo de los niveles del control sin tratamiento (figura 17A).

En la expresión de mRNA- *α -SMA* hubo sobreexpresión en presencia de TGF- β 1 a las 24 h, mientras que a las 48 y 72 h se expresó por debajo de los niveles del control sin tratamiento, y en presencia de EETD (150 μ g/mL) y TGF- β 1 (1 ng/mL) se atenuó desde las 24 h con respecto a la expresión con únicamente TGF- β 1 (1 ng/mL), y continuó la disminución de la expresión hasta por debajo de los niveles del control desde las 48 h (figura 17B). Cuando las células estuvieron expuestas únicamente al EETD (150 μ g/mL) la expresión de mRNA- *α -SMA* aumentó con respecto a la expresión del control sin tratamiento a las 24 h, a las 48 y 72 h la expresión disminuyó hasta por debajo de los niveles del control sin tratamiento.

En conclusión, en el tratamiento para evaluar el efecto del pre-tratamiento con el EETD en presencia de TGF- β 1, se observó que el EETD atenúa los niveles de la expresión de mRNA-*COL1 α 1* a las 24 y 48 h, y únicamente la expresión de mRNA- *α -SMA* a las 24 h (figura 17).

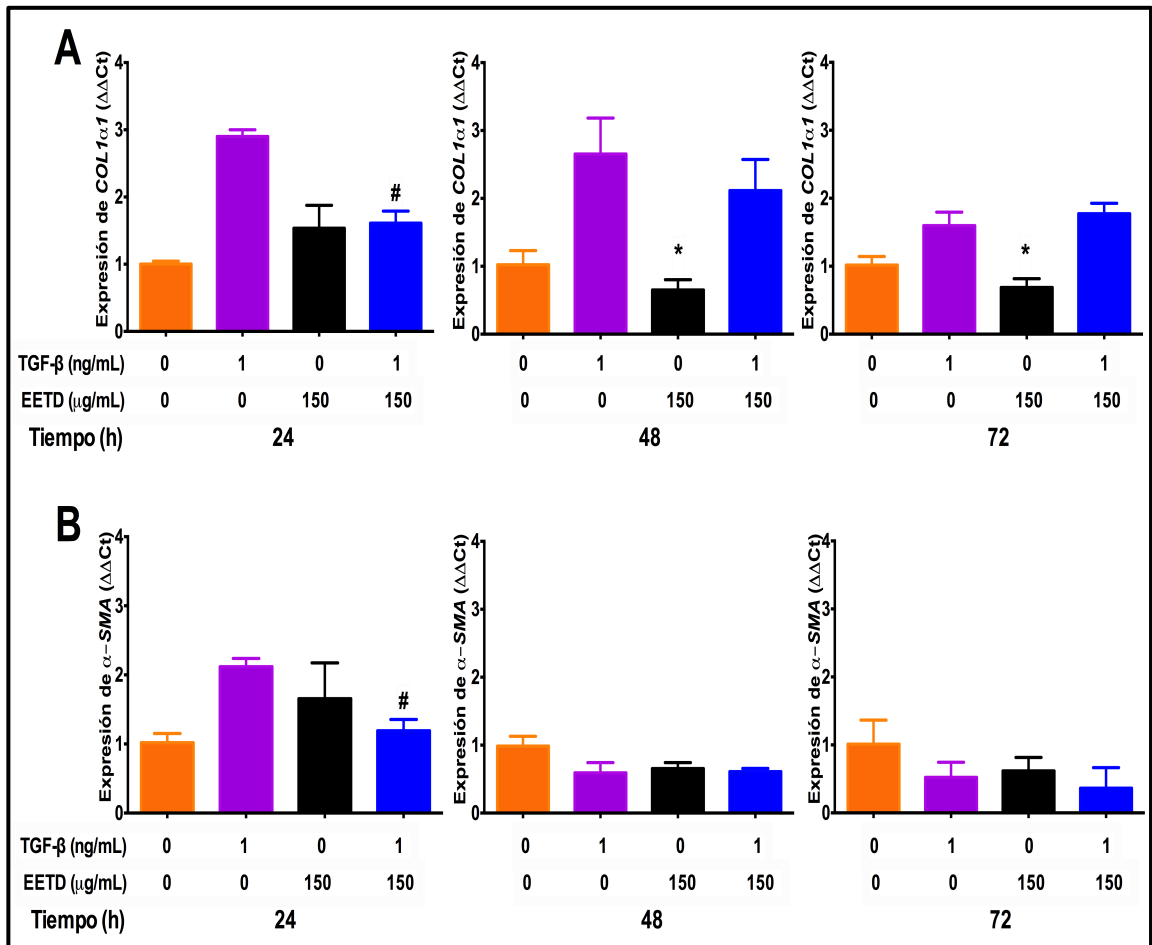


Figura 17. Expresión de α -SMA y COL1 α 1 en el modelo de pre-exposición al EETD con TGF- β 1 (1 ng/mL) como inductor de activación en células LX-2. A) Expresión de mRNA-COL1 α 1 células LX-2 tratadas con EETD (150 μ g/mL) y TGF- β 1 (1 ng/mL). B) Expresión de mRNA- α -SMA en células LX-2 tratadas con EETD (150 μ g/mL) y TGF- β 1 (1 ng/mL). Las células LX-2 se sembraron en placas de 24 pocillos en medio completo durante 24 h, se retiró el medio con SFB, se aplicó el pre-tratamiento con EETD (150 μ g/mL) durante 12 h, se retiró el medio se aplicó EETD (150 μ g/mL) y/o TGF- β 1 (1 ng/mL) y se midió la expresión de los marcadores por RT-qPCR a las 24, 48 y 72 h. Se usó β -actina como control. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, las barras representan n=3. *Condición versus sin TGF- β 1 y sin EETD (*p<0.05); y # condición versus TGF- β 1 (#p<0.05).

En el modelo de pre-exposición al EETD con etanol (50 nM) como inductor de activación, se observó sobreexpresión de mRNA-*COL1a1* con el tratamiento con etanol (50 nM), EETD (150 µg/mL) y en combinación (EETD y etanol) únicamente a las 24 h, no observándose ninguna tendencia a las 48 y 72 h (figura 18A).

En la expresión de mRNA-*α-SMA* el etanol (50 nM) no causó ninguna modulación en la expresión a ningún tiempo. El EETD (150 µg/mL) a las 24 h causa sobreexpresión de mRNA-*α-SMA*, la cual es atenuada incluso por debajo del control sin tratamiento a las 48 y 72 h. El tratamiento combinado con EETD (150 µg/mL) y etanol (50 nM) se observó sobreexpresión de mRNA-*α-SMA* a las 24 h, mientras que a las 48 y 72 h la expresión es parecida al control sin tratamiento (figura 18B). Por tanto hay sobreexpresión de mRNA-*COL1a1* y mRNA-*α-SMA* en presencia de etanol (50 nM) y/o EETD (150 µg/mL) únicamente a las 24 h (figura 18).

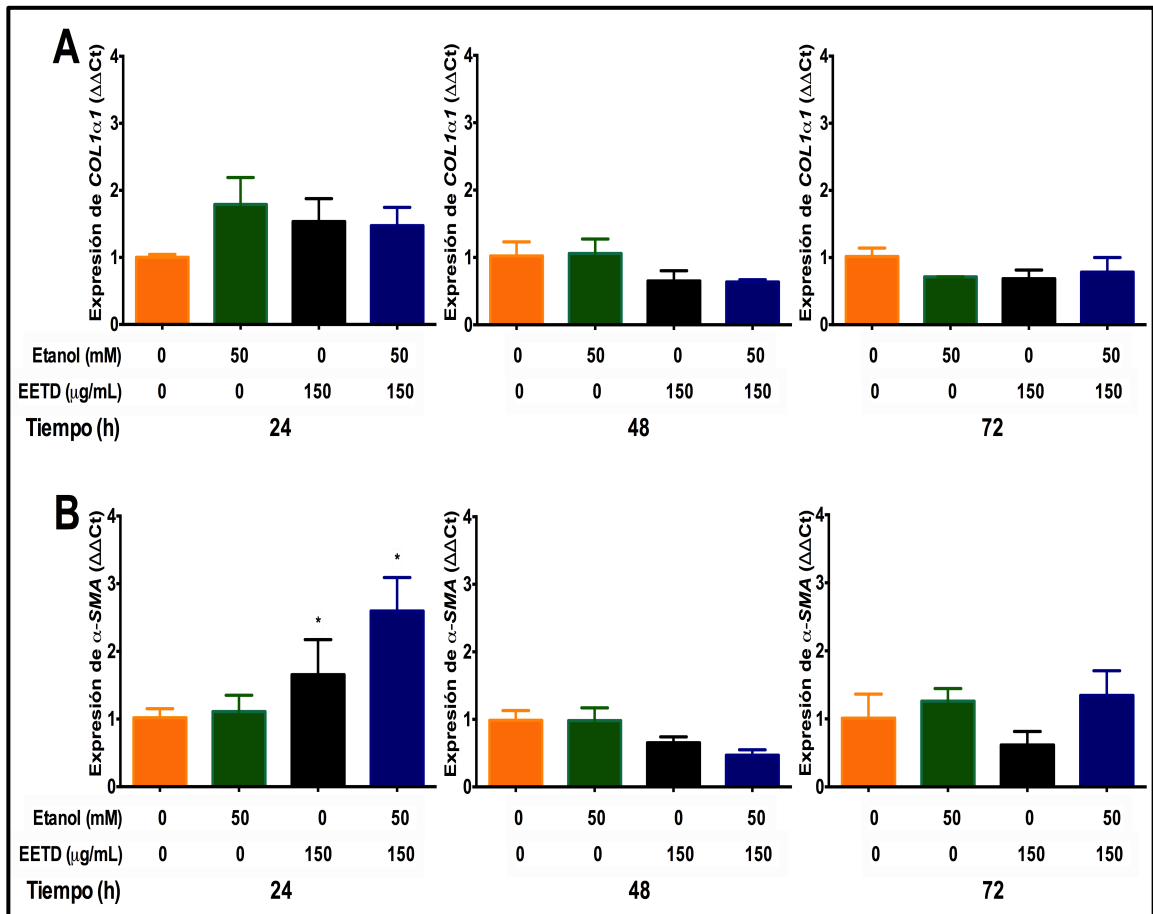


Figura 18. Expresión de α -SMA y COL1 α 1 en el modelo de pre-exposición al EETD con etanol (50 nM) como inductor de activación en células LX-2. A) Expresión de COL1 α 1 en células LX-2 tratadas con EETD (150 μ g/mL) y etanol (50 nM). B) Expresión de α -SMA en células LX-2 tratadas con EETD (150 μ g/mL) y etanol (50 nM). Las células LX-2 se sembraron en placas de 24 pocillos en medio completo durante 24 h, se retiró el medio con SFB, se aplicó el pre-tratamiento con EETD (150 μ g/mL) durante 12 h, se retiró el medio se aplicó EETD (150 μ g/mL) y/o etanol (50 nM) y se midió la expresión de los marcadores por RT-qPCR a las 24, 48 y 72 h. Se usó β -actina como control. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, las barras representan n=3. *Condición versus sin etanol y sin EETD (*p<0.05).

4.4.2 Los efectos del EETD en la expresión de los marcadores *COL1a1* y α -SMA en el tratamiento del efecto de modulación de daño causado por los inductores de activación y posterior exposición al EETD.

En el modelo de modulación de daño causado por los inductores de activación, TGF- β 1 (1 ng/mL) o etanol (50 mM) y posterior exposición al EETD (150 μ g/mL), se cultivaron células LX-2 en medio completo durante 24 h, se les retiró el SFB y se aplicó el tratamiento con TGF- β 1 (1 ng/mL) o etanol (50 mM) durante 12 h, nuevamente se retiró el medio y se agregó el inductor de activación correspondiente TGF- β 1 (1 ng/mL) o etanol (50 mM) y/o el EETD (150 μ g/mL), evaluándose la expresión de mRNA- α -SMA y *COL1a1* a tres puntos de tiempo (24, 48 y 72 h).

En el modelo de modulación de daño causado por el inductor de activación TGF- β 1 (1 ng/mL) y posterior exposición al EETD (150 μ g/mL), se observó sobreexpresión de mRNA-*COL1a1* en presencia de TGF- β 1 (1 ng/mL) únicamente a las 24 y 48 h con respecto al control sin tratamiento. En presencia del EETD (150 μ g/mL) se observó sub-expresión de mRNA-*COL1a1* a las 48 y 72 h con respecto al control sin tratamiento, y sub-expresión a las 48 h con respecto al control con TGF- β 1 (1 ng/mL), indicando que el EETD (150 μ g/mL) atenúa el efecto que el TGF- β 1 (1 ng/mL) provoca. Con el tratamiento combinado de TGF- β 1 (1 ng/mL) y EETD (150 μ g/mL), se observó sobreexpresión a las 24 h, pero a las 48 y 72 h hubo sub-expresión de mRNA-*COL1a1* con respecto al control sin tratamiento (figura 19A).

El tratamiento con TGF- β 1 (1 ng/mL) no provocó modificación de la expresión de mRNA- α -SMA en ningún tiempo. Con el tratamiento combinado de TGF- β 1 (1 ng/mL) y EETD (150 μ g/mL), se observó sobreexpresión a las 24 h, pero a las 48 y 72 h

hubo sub-expresión de mRNA- α -SMA, con respecto al control sin tratamiento. El EETD (150 μ g/mL) provoca sobreexpresión de mRNA- α -SMA desde las 48 h y a las 72 h se triplica, indicando que el EETD provoca la expresión de este marcador, pero en presencia del tratamiento combinado con EETD y TGF- β 1 este marcador está por debajo de los niveles del control sin tratamiento, por lo que se requiere comprobar estos resultados para discernir cuál es la probable causa de este efecto o si solo fue un artefacto (figura 19B).

Por tanto, la presencia del EETD atenuó el aumento de mRNA-*COL1a1* en presencia de TGF- β 1 desde las 48h y aumentó la expresión de mRNA- α -SMA a las 24 h en presencia de TGF- β 1, pero este efecto es perdido a las 72 h (figura 19).

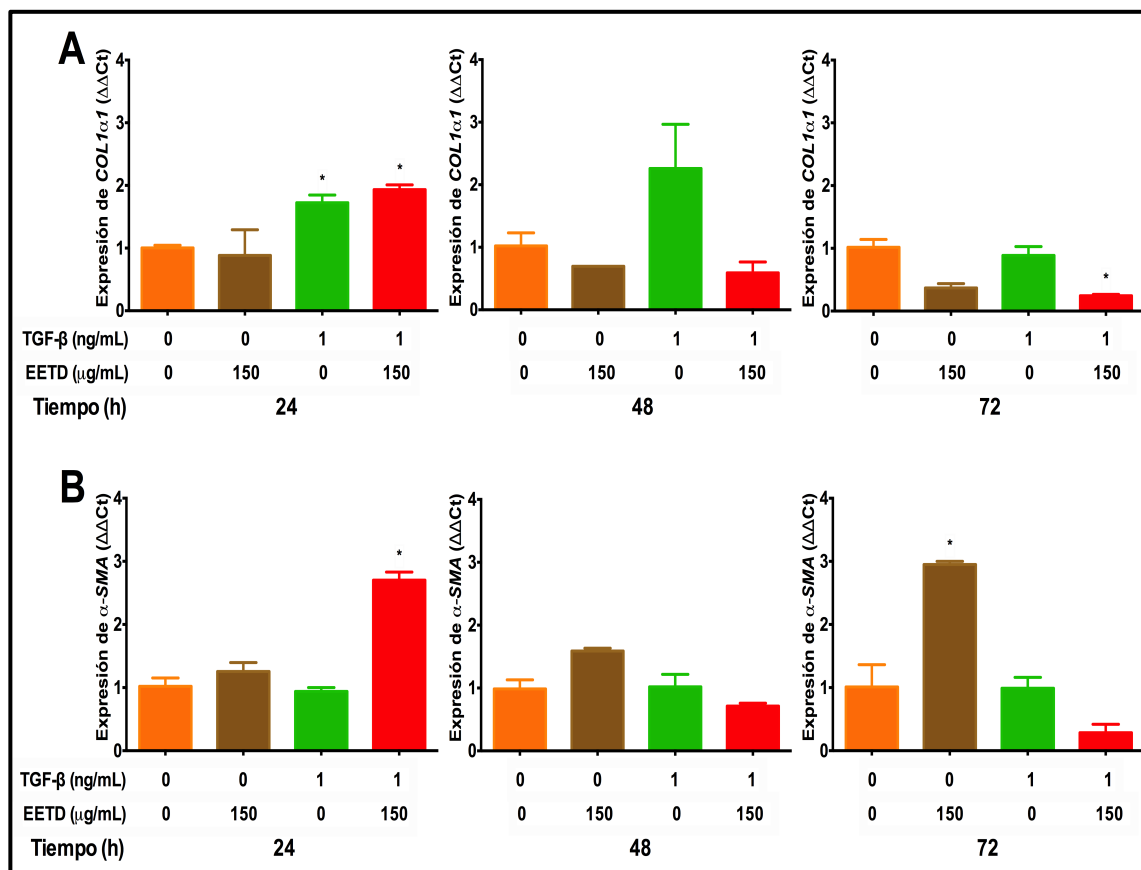


Figura 19. Expresión de α -SMA y COL1 α 1 en presencia de EETD en un esquema de pre-tratamiento con TGF- β 1 en células LX-2. A) Expresión de mRNA-COL1 α 1 en células LX-2 tratadas con EETD (150 ng/mL) y TGF- β 1 (1 ng/mL). B) Expresión de mRNA- α -SMA en células LX-2 tratadas con EETD (150 ng/mL) y TGF- β 1 (1 ng/mL). Las células LX-2 se sembraron en placas de 24 pocillos en medio completo durante 24 h, se retiró el medio con SFB, se aplicó el pre-tratamiento con TGF- β 1 (1 ng/mL) durante 12 h, se retiró el medio se aplicó EETD (150 μg/mL) y/o TGF- β 1 (1 ng/mL) y se midió la expresión de los marcadores por RT-qPCR a las 24, 48 y 72 h. Se usó β -actina como control. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, las barras representan n=3. *Condición versus sin TGF- β 1 y sin EETD (*p<0.05).

En el modelo de modulación de daño causado por el inductor de activación etanol (50 mM) y posterior exposición al EETD (150 μg/mL), se observó subexpresión de mRNA-COL1 α 1 en presencia del EETD (150 μg/mL) a las 48 y 72 h. En presencia de etanol (50 mM) se observó ligero aumento en la expresión de este marcador a 48 h, atenuándose este efecto a las 72 h disminuyendo incluso a niveles por debajo de la expresión de control sin tratamiento. En el tratamiento combinado etanol

(50 nM) y EETD (150 µg/mL), la expresión de mRNA-*COL1α1*, a las 48 y 72 h disminuyó incluso a niveles por debajo de la expresión de control sin tratamiento, especulando que el EETD atenúo los efectos de la expresión de mRNA-*COL1α1* desde tiempos tempranos, 24 h (figura 20A).

En el tratamiento con etanol (50 mM) hubo sobreexpresión de mRNA-*α-SMA* a las 24 h y disminuyó por debajo del control sin tratamiento a las 48 y 72 h. Con el tratamiento combinado con etanol (50 mM) y EETD (150 µg/mL), no se observó modulación de la expresión de mRNA-*α-SMA*, con respecto al control sin tratamiento, por tanto la sobreexpresión observada con el tratamiento con etanol fue atenuada por el EETD. El EETD (150 µg/mL) provocó sobreexpresión de mRNA-*α-SMA* desde las 48 h y a las 72 h se triplica, indicando que el EETD (150 µg/mL) provocó la expresión de este marcador, pero en presencia del tratamiento combinado con EETD (150 µg/mL) y etanol (50 mM) este marcador está por debajo de los niveles del control sin tratamiento, por lo que se requiere comprobar estos resultados para discernir cuál fue la probable causa de este efecto o si solo fue un artefacto (figura 20B).

Por tanto se observó que el EETD (150 µg/mL) atenúo los niveles de expresión de mRNA-*COL1α1* a las 48 y 72 h en presencia de etanol (50 nM), pero provocó el aumento de la expresión de mRNA-*α-SMA* a las 72h en presencia del EETD (150 µg/mL) (figura 20).

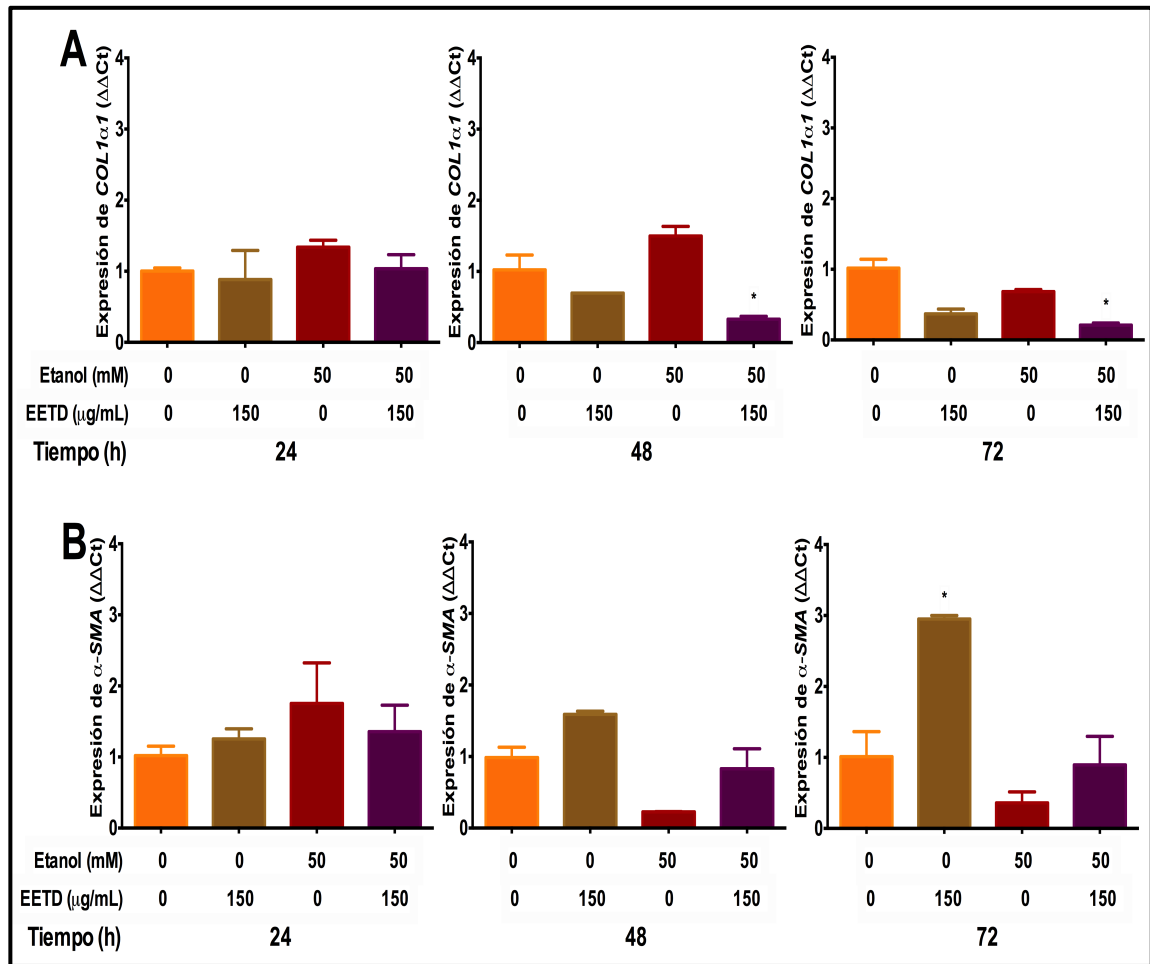


Figura 20. Expresión de α -SMA y COL1 α 1 en presencia de EETD en un esquema de pre-tratamiento con etanol en células LX-2. A) Expresión de mRNA-COL1 α 1 en células LX-2 tratadas con EETD (150 ng/mL) y etanol (50 nM). B) Expresión de mRNA- α -SMA en células LX-2 tratadas con EETD (150 ng/mL) y etanol (50 nM). Las células LX2 se sembraron en placas de 24 pocillos en medio completo durante 24 h, se retiro el medio con SFB, se aplico el pre-tratamiento con etanol (50 nM) durante 12 h, se retiro el medio se aplicó EETD (150 μ g/mL) y/o etanol (50 nM) y se midió la expresión de los marcadores por RT-qPCR a las 24, 48 y 72 h. Se usó β -actina como control. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, las barras representan n=3. *Condición versus sin etanol y sin EETD (*p<0.05).

4.5 Evaluación de las proteínas α -SMA y TIMP1 en presencia de TGF- β 1 a 5 ng/mL y etanol a 75 y 100 mM.

Para validar los resultados anteriormente obtenidos y observar si se podía tener un mayor estímulo de activación en las CEH en presencia de TGF- β 1 y etanol, se utilizó un modelo de aplicación de tratamiento al mismo tiempo sin ningún pre-tratamiento aumentando las dosis de TGF- β 1 a 5 ng/mL y etanol a 75 o 100 mM. Se cultivaron células LX-2 en medio completo durante 24 h, se les retiró el SFB y se aplicó el tratamiento con TGF- β 1 (5 ng/mL) o etanol (75 o 100 mM) y/o el EETD (150 μ g/mL), evaluándose la expresión a nivel de proteína de α -SMA y TIMP1 a tres puntos de tiempo (24, 48 y 72 h).

En la expresión proteica de α a las 24 y 72 h se observó un ligero aumento en la expresión en las células tratadas únicamente con la depleción de suero comparadas con el control sin tratamiento y con SFB. En las células tratadas con TGF- β 1 a las 72 h se observó un ligero aumento pero no fueron significativos (figura 21).

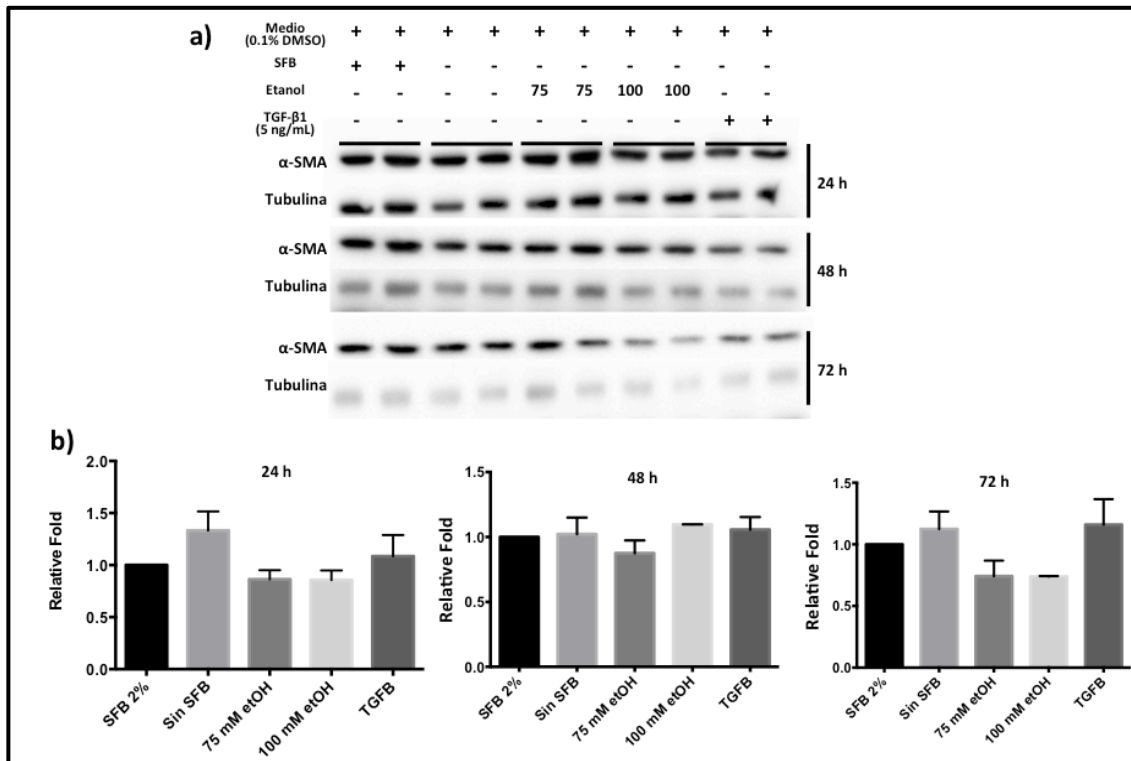


Figura 21. Expresión proteica de α -SMA en presencia de TGF- β 1 o etanol en células LX-2. A) Western blot de la expresión proteica de α -SMA (gel de poliacrilamida 12%). B) Graficas del promedio de la expresión proteica de α -SMA. Expresión proteica de α -SMA en células LX-2 tratadas con tratadas con TGF- β 1 (5 ng/mL) o etanol (75 o 100 mM). Las células LX-2 se sembraron en placas de 24 pocillos en medio completo durante 24 h, se retiro el medio con SFB, se aplicó TGF- β 1 (5 ng/mL) o etanol (75 o 100 mM) y se midió la expresión proteica de los marcadores por WB a las 24, 48 y 72 h. Se usó tubulina como control. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, las barras representan n=3.

En la expresión proteica de TIMP1 se observó un aumento de su expresión en las células depletadas de SFB en todos los tiempos, también se observó un ligero incremento en la expresión a las 72 h en las células tratadas con etanol 100 mM, así como en las células tratadas con TGF- β 1 a las 24 y 48 h. Con el tratamiento de etanol 75 mM no se observó modulación en la expresión de la proteína TIMP1 (figura 22).

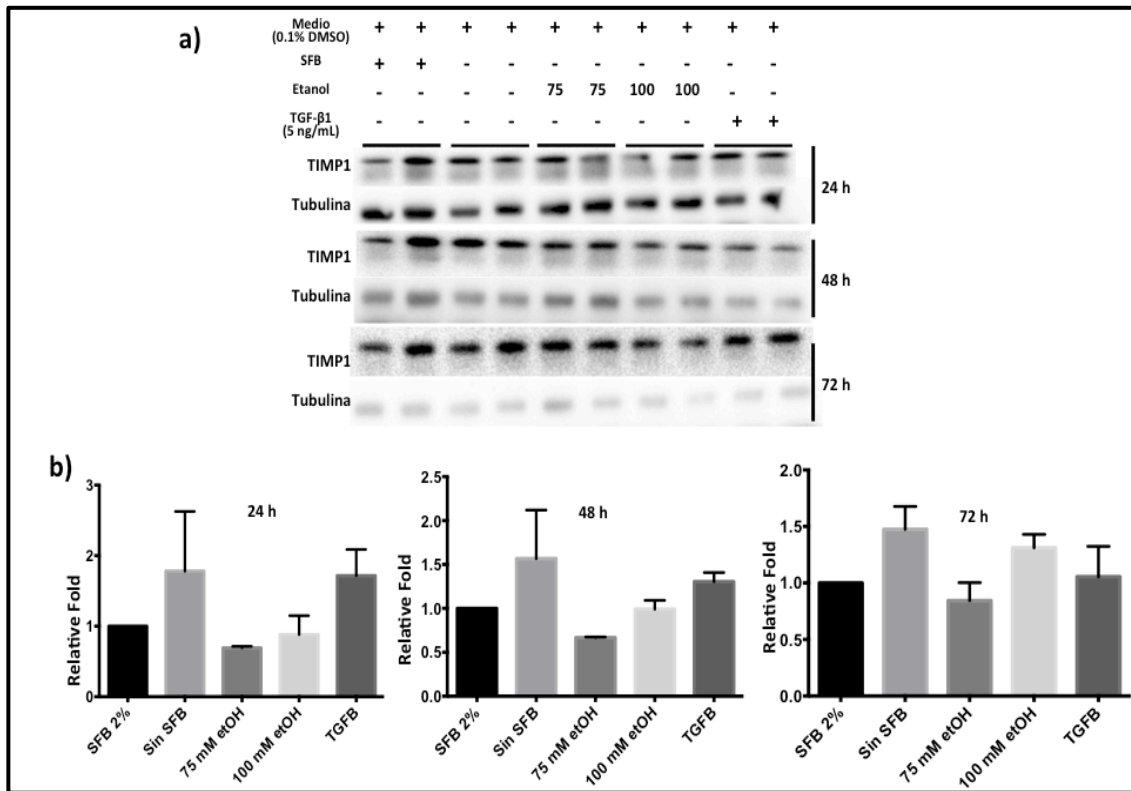


Figura 22. Expresión proteica de TIMP1 en presencia de TGF- β 1 o etanol en células LX-2. A) Western blot de la expresión proteica de TIMP1 (gel de poliacrilamida 12%). B) Graficas del promedio de la expresión proteica de TIMP1. Expresión proteica de TIMP1 en células LX-2 tratadas con tratadas con TGF- β 1 (5 ng/mL) o etanol (75 o 100 mM). Las células LX-2 se sembraron en placas de 24 pocillos en medio completo durante 24 h, se retiro el medio con SFB, se aplicó TGF- β 1 (5 ng/mL) o etanol (75 o 100 mM) y se midió la expresión proteica de los marcadores por WB a las 24, 48 y 72 h. Se usó tubulina como control. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, las barras representan n=3.

En la evaluación de las proteínas α -SMA (figura 21) y TIMP1 (figura 22), independientemente de la dosis evaluada de etanol (75 y 100 mM) y TGF- β 1 a 5 ng/mL no hubo diferencia significativa en la expresión de las proteínas en los distintos tiempos a las diferentes dosis, por lo que se deben evaluar mas marcadores o cambiar la dosis de estos compuestos para comprobar la estimulación de la expresión de marcadores pro-fibrogénicos con los tratamientos aplicados.

4.6 Evaluación de la morfología celular de LX-2 en presencia de EETD a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y TGF- β 1 a 10 ng/mL .

Para evaluar si la exposición al EETD a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y TGF- β 1 a 10 ng/mL induce alteraciones morfológicas (figura 23), se cultivaron células LX-2 en condiciones libres de SFB en presencia del EETD (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) solo o combinado con TGF- β 1 (10 ng/mL) a tres puntos de tiempo diferentes (24, 48 y 72 h) y fueron evaluados bajo un microscopio de contraste de fase. Observamos que las células LX-2 en presencia del EETD (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) conservan una forma estrellada (figura 23B, 24 h); pero cuando las células fueron expuestas a TGF- β 1 (10 ng/mL), la morfología celular cambió a una forma de huso adherente (forma alargada o estirada), formando racimos y dejando amplios espacios entre ellos (figura 23C, 24 h), a las 48 h se observó una gran cantidad de células muertas (figura 23C, 48 h) y a las 72 h muestra una mayor cantidad de muerte celular (figura 23C, 72 h). Cuando las células fueron expuestas al tratamiento combinado con TGF- β 1 (10 ng/mL) y EETD (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el patrón de huso adherente y racimos no se observó y la mayoría de las células mantuvieron su forma estrellada (figura 23D, 24 h), el efecto observado (muerte celular) a las 48 h con el tratamiento con TGF- β 1 (10 ng/mL) fue atenuado por el tratamiento con EETD (figura 23D, 48 h), repitiéndose el patrón de atenuación a las 72 h (figura 23D, 72 h). Por tanto concluimos que el EETD no modifica sustancialmente la morfología de las células LX-2 y evita la aparición morfológica típica de huso adherente y racimos de las células activadas, con disminución de la muerte celular observada (figura 23).

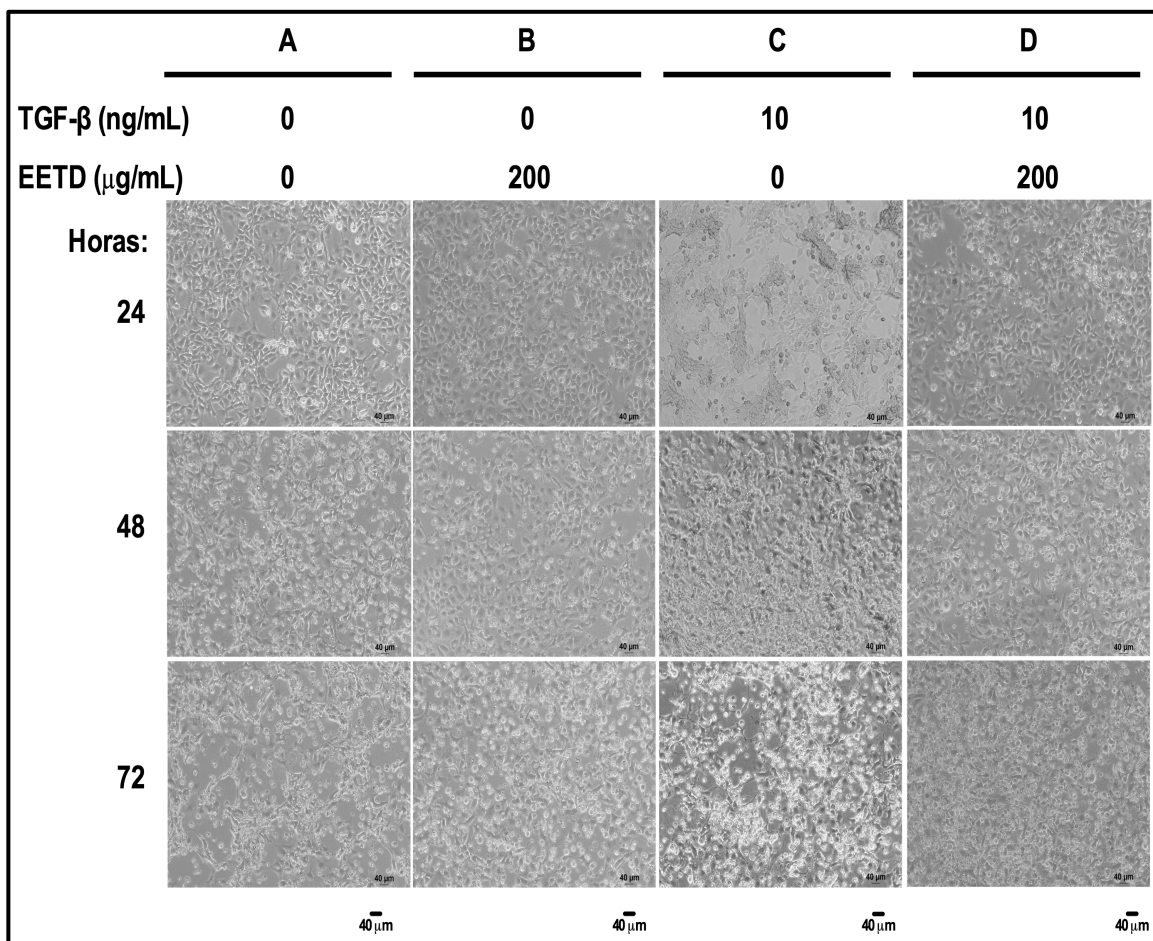


Figura 23. Efecto del EETD sobre la morfología de células LX-2 tratadas con TGF- β 1 y EETD. Las células LX-2 se trataron con 200 μ g/mL de EETD solo o combinado con TGF- β 1 (10 ng/mL) durante 24, 48 y 72 h, y las imágenes fueron obtenidas bajo un microscopio de contraste de fase.

4.7 Evaluación de la expresión de los marcadores TGF- β , COL1 α 1, α -SMA, MMP2, TIMP1, MFN2 y SNAI1 en presencia del EETD a 100 o 200 μ g/mL y TGF- β 1 a 10 ng/mL en células LX-2.

Para saber si EETD podía suprimir la activación de las células LX-2, las células LX-2 se sembraron durante 24 h en medio completo, se retiró el medio y se trataron con EETD (100 y 200 μ g/mL) solo o combinado con TGF- β 1 (10 ng/mL) en condiciones libres de SFB y se midió la expresión de los marcadores TGF- β , COL1 α 1, α -SMA,

MMP2, TIMP1, MFN2 y SNAI1 por RT-qPCR y/o WB en tres puntos de tiempo diferentes (24, 48 y 72 h).

4.7.1 El EETD atenúa los marcadores de expresión fibrogénica en células LX-2.

En la evaluación de la expresión del mRNA-*TGF-β*, la presencia del EETD a 200 μg/mL provoca una sobre-expresión del mRNA-*TGF-β* que se conserva hasta las 72 h y a el EETD a 100 μg/mL hasta las 48 h. En presencia de TGF-β1 (10 ng/mL) hubo sobreexpresión de mRNA-*TGF-β* únicamente a las 48 h. En el tratamiento combinado de EETD y TGF-β1 (10 ng/mL) hay sobre-expresión del mRNA-*TGF-β* que se conserva hasta las 72 h en ambas dosis del EETD (100 y 200 μg/mL) (figura 24A). En la expresión proteica de TGF-β se confirmó el resultado de expresión de mRNA-*TGF-β*, debido a sobreexpresión en presencia del EETD en todos los tiempos. En el tratamiento combinado con EETD y TGF-β1 (10 ng/mL) hay sobre-expresión de TGF-β a las 48 y 72 h (figura 24B).

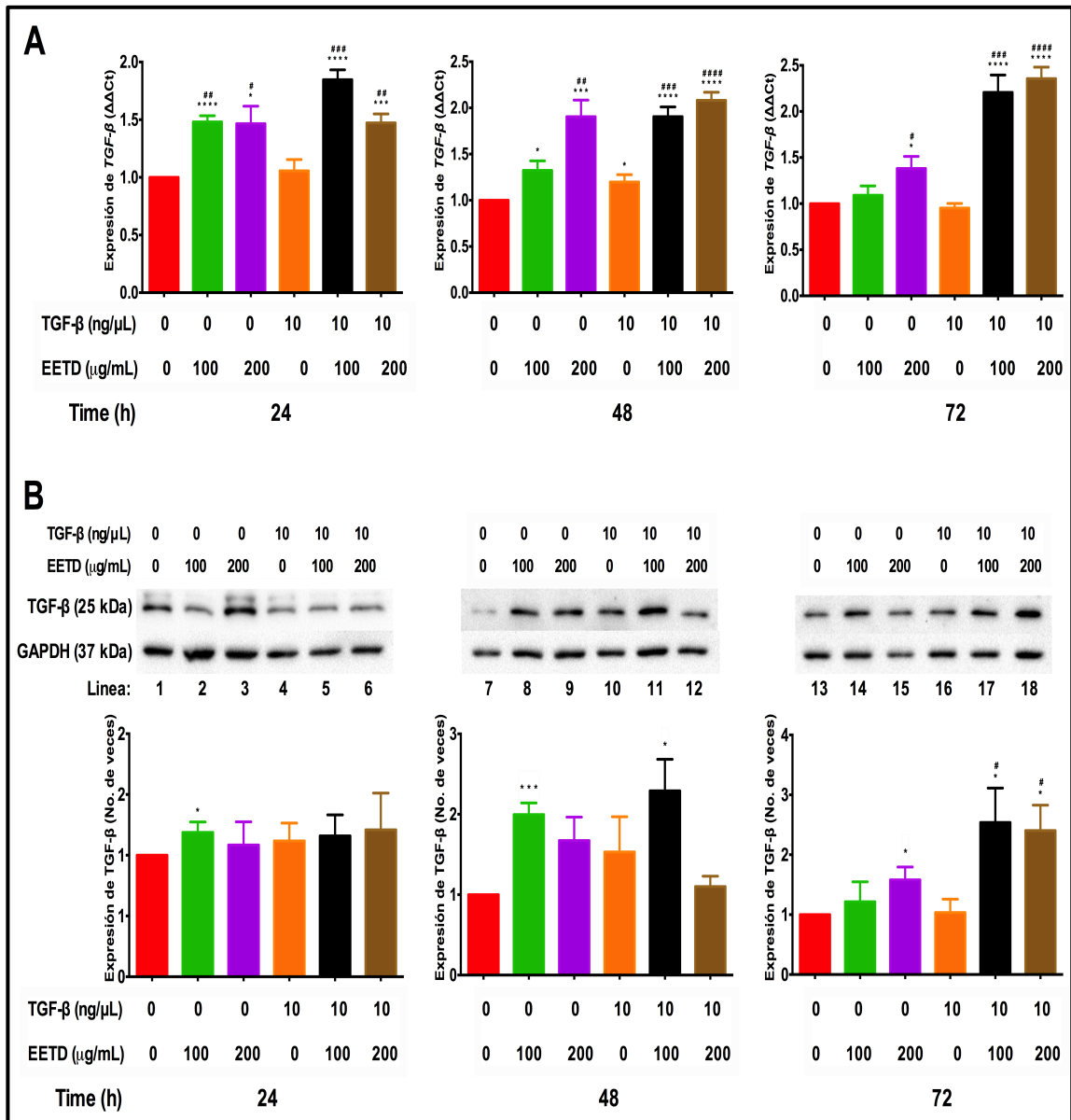


Figura 24. Efecto de EETD sobre la expresión de TGF-β en células LX-2 tratadas con TGF-β1. A) El mRNA-*TGF-β* se midió por RT-qPCR (n = 6). Las células LX-2 se sembraron en placas de 24 pocillos, se incubaron en medio sin SFB durante 24 h, seguido del tratamiento con EETD (100 o 200 μg /mL) a las 24, 48 y 72 h, solo o combinado con TGF-β1 (10 ng/mL). Se usó β-actina como control. B) La expresión proteica de TGF-β se analizó mediante Western Blot (n = 4). Las células LX-2 se sembraron en placas de 6 pocillos y se trataron como anteriormente. GAPDH se utilizó como control. *Condición versus sin TGF-β1 y sin EETD (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001) y #condición versus TGF-β1 (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 y ####p<0.0001).

Evaluamos la expresión de mRNA-*COL1 α 1* (figura 25A) a través de RT-qPCR en células tratadas con EETD en diferentes momentos descritos anteriormente. Encontramos que el tratamiento con EETD (100 o 200 μ g/mL) disminuye la expresión de los niveles de mRNA-*COL1 α 1*. Solo la concentración de 200 μ g/mL del EETD inhibió la expresión de mRNA-*COL1 α 1* en todos los tiempos. Observamos que, incluso a las 72 h, tiene un 65% más de inhibición de la expresión de mRNA-*COL1 α 1* que 100 μ g/mL del EETD. Como era de esperar, el tratamiento con TGF- β 1 (10 ng/mL) aumentó la expresión del nivel de mRNA-*COL1 α 1* en todos los tiempos, y en presencia del EETD, este efecto se atenuó en ambas concentraciones utilizadas (100 o 200 μ g/mL), pero la concentración de 200 μ g/mL del EETD presentó el máximo efecto en la inhibición de la expresión de los niveles de mRNA-*COL1 α 1* versus TGF- β 1 (10 ng/mL) (figura 25A), inhibiendo la expresión en todos los tiempos y manteniéndose hasta las 72h, alcanzando los niveles de la expresión basal de mRNA-*COL1 α 1* a las 48 y 72 h (figura 25A).

Además, evaluamos la expresión a nivel transcripcional y traduccional de α -SMA (figura 25A y 25B, respectivamente). En la evaluación transcripcional, la presencia del EETD (100 o 200 μ g/mL) aumento los niveles de mRNA- α -SMA y este aumento se perpetuó hasta las 72 h. El tratamiento con TGF- β 1 (10 ng/mL) aumenta la expresión del mRNA- α -SMA a las 72 h, y la presencia de EETD (100 o 200 μ g/mL) aumenta este efecto. EETD (100 μ g/mL) disminuye la expresión de la proteína α -SMA en todos los tiempos, pero a una concentración de 200 μ g/mL del EETD, este efecto se observó solo a las 48 h (figura 25B). En presencia de TGF- β 1 (10 ng/mL) y EETD, hubo una regulación a la baja de la proteína α -SMA desde las 48 h a 200 μ g/mL de EETD y solo se observó a las 72 h para 100 μ g/mL de EETD.

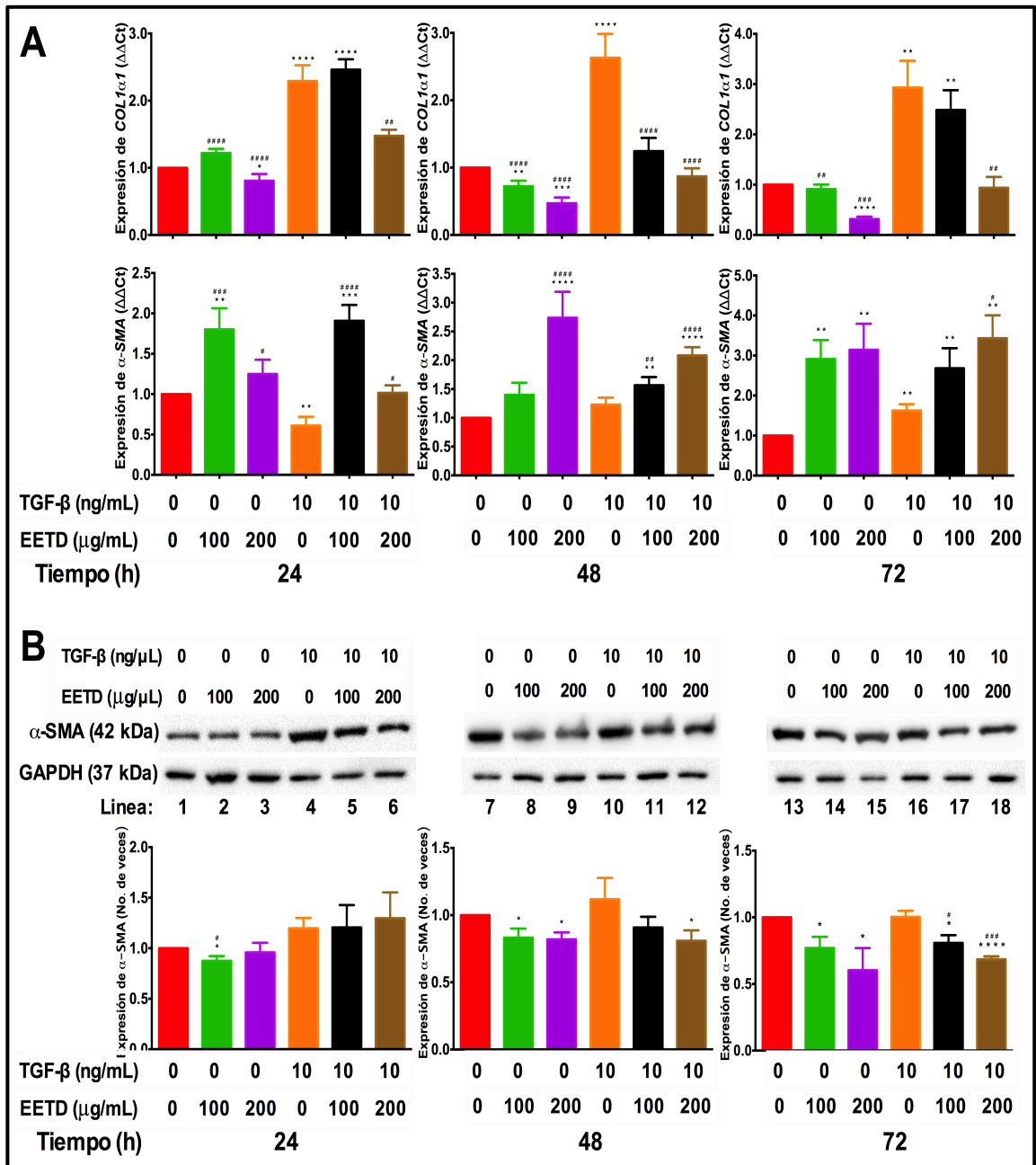


Figura 25. Efecto de EETD sobre α -SMA y COL1 α 1 en células LX-2 tratadas con TGF- β 1. A) La expresión del mRNA- α -SMA y COL1 α 1 se midieron por RT-qPCR (n = 6). Las células LX-2 se sembraron en placas de 24 pocillos, se incubaron en medio sin suero durante 24 h, seguido de tratamiento con EETD (100 o 200 μ g/mL) a las 24, 48 y 72 h, solo o combinado con TGF- β 1 (10 ng/mL). Se usó β -actina como control. B) La expresión proteica de α -SMA se analizó mediante Western Blot (n = 4). Las células LX-2 se sembraron en placas de 6 pocillos y se trataron como anteriormente. GAPDH se utilizó como control. *Condición versus sin TGF- β 1 y sin EETD (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001) y #condición versus TGF- β 1 (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 y ####p<0.0001).

4.7.2 El EETD modula la expresión de TIMP1.

Dado que observamos que el EETD reduce los niveles de expresión de mRNA-*COL1 α 1* y de proteína α -SMA, queríamos evaluar si el EETD estaba modificando moduladores de la matriz extracelular como MMP2 y TIMP1 (figura 26). Por lo tanto, las células LX-2 se trataron con EETD (100 y 200 μ g/mL) solo o combinado con TGF- β 1 (10 ng/mL) en condiciones libres de SFB en tres puntos de tiempo diferentes (24, 48 y 72 h).

Observamos que la expresión de mRNA-*MMP2* (figura 26A) aumentó en presencia del EETD (100 y 200 μ g/mL) y cuando las células LX-2 se expusieron además a TGF- β 1 (10 ng/mL), este efecto se intensificó. Hubo sobreexpresión de mRNA-*TIMP1* (figura 26A) en células LX-2 en presencia de EETD (100 y 200 μ g/mL) y el patrón se repitió cuando las células también fueron expuestas a TGF- β 1 (10 ng/mL), mostrando niveles de sobreexpresión aumentados. Pero la expresión de la proteína TIMP1 (figura 26B) mostró una regulación a la baja en las células LX-2 en presencia de EETD (48 y 72 h), con expresión del 30% para 100 μ g/mL de EETD a 44% para 200 μ g/mL de EETD con mayor inhibición a las 72 h comparado con el control sin tratamiento; en el tratamiento combinado de TGF- β 1 (10 ng/mL) y EETD, hubo una disminución en los niveles de expresión de la proteína TIMP1 a las 72 h para la dosis de 100 μ g/mL de EETD y en todos los tiempos para la dosis de 200 μ g/mL de EETD.

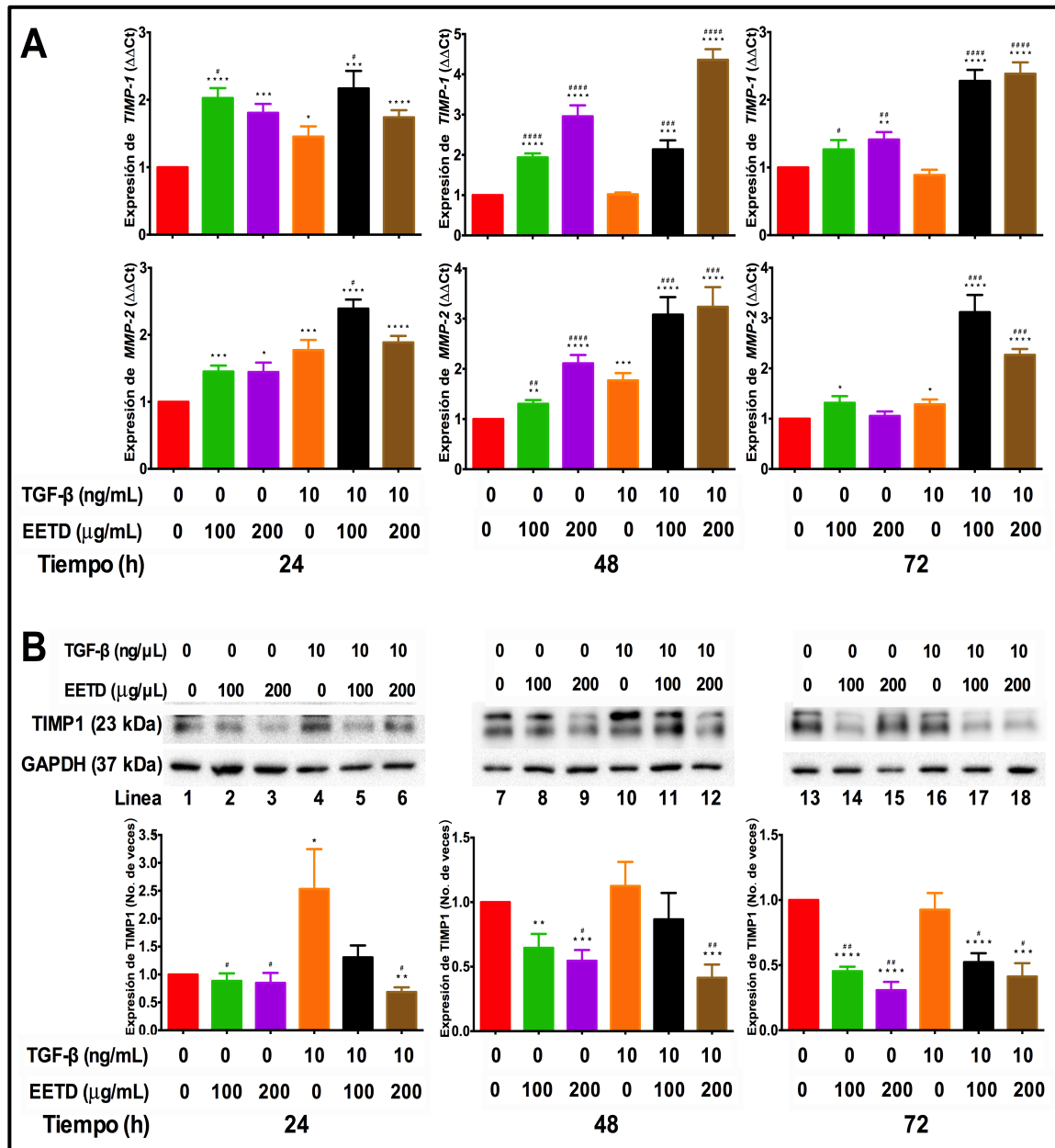


Figura 26. Efecto de EETD sobre MMP2 y TIMP1 en células LX-2 tratadas con TGF-β1. A) La expresión de mRNA-MMP2 y TIMP1 se midió por RT-qPCR (n = 6). Las células LX-2 se sembraron en placas de 24 pocillos, se incubaron en medio sin suero durante 24 h, seguido de tratamiento con EETD (100 o 200 μg /mL) a las 24, 48 y 72 h, solo o combinado con TGF-β1 (10 ng/mL). Se usó β-actina como control. B) La expresión proteica de TIMP1 se analizó mediante Western Blot (n = 4). Las células LX-2 se sembraron en placas de 6 pocillos y se trataron como anteriormente. GAPDH se utilizó como control. *Condición versus sin TGF-β1 y sin EETD (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001) y #condición versus TGF-β1 (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 y ####p<0.0001).

4.7.3 El EETD aumenta la expresión de mRNA de *SNAIL1*.

Para evaluar si EETD participa en el mecanismo de transición epitelio mesenquimal (TEM) (figura 27), las células LX-2 se trataron con EETD (100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) solo o combinado con TGF- β 1 (10 ng/mL) en condiciones libres de SFB a tres diferentes puntos de tiempo (24, 48 y 72 h) y luego se evaluó la expresión de mRNA-*SNAIL1*. En presencia de EETD hubo en todos los tiempos sobreexpresión de mRNA-*SNAIL1*, que aumentó incluso más que con la estimulación con TGF- β 1 (10 ng/mL), y con la estimulación de ambos (EETD y TGF- β 1), la expresión fue hasta cuatro veces más que el control.

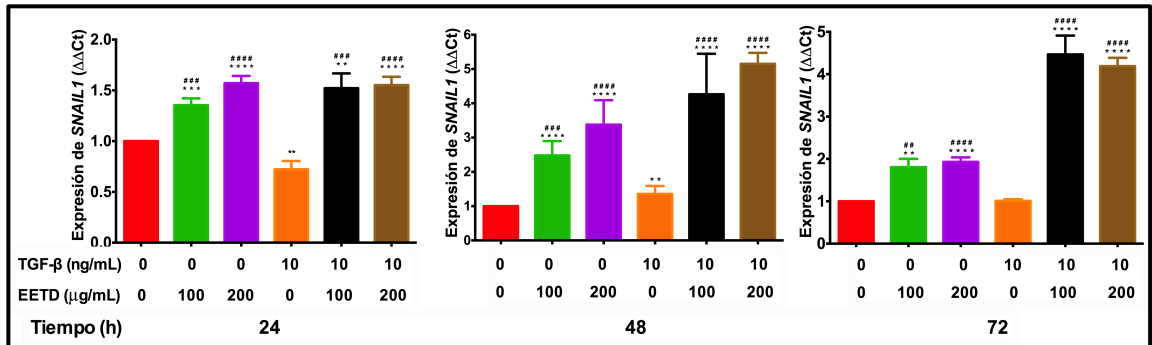


Figura 27. Efecto de EETD sobre *SNAIL1* en células LX-2 tratadas con TGF- β 1. A) La expresión de mRNA-*SNAIL1* se midió por RT-qPCR (n = 6). Las células LX2 se sembraron en placas de 24 pocillos, se incubaron en medio sin suero durante 24 h, seguido de tratamiento con EETD (100 o 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a las 24, 48 y 72 h, solo o combinado con TGF- β 1 (10 ng/mL). Se usó β -actina como control. *Condición versus sin TGF- β 1 y sin EETD (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$) y #condición versus TGF- β 1 (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ y #### $p < 0.0001$).

4.7.4 El EETD modula la expresión de MFN2.

Para evaluar la función mitocondrial en presencia de EETD, las células LX-2 se trataron con EETD (100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) solo o combinado con TGF- β 1 (10 ng/mL) en condiciones libres de SFB en tres puntos de tiempo diferentes (24, 48 y 72 h). Evaluamos los niveles de expresión de mRNA y proteínas de MFN2 (figura 28) y encontramos que los niveles de mRNA-*MFN2* estaban regulados al alza en presencia de EETD en todos los tiempos, incluso más que tras la estimulación con TGF- β 1 (10 ng/mL). La estimulación con ambos (EETD y TGF- β 1) también provocó sobreexpresión en todos los tiempos y este efecto fue más evidente en la dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EETD a las 72 h (figura 28A). La expresión de la proteína MFN2 disminuyó en presencia de EETD a las 24 (solo para 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 48 h (ambas dosis); en presencia de EETD y TGF- β 1, disminuyó comparado con TGF- β 1 en todos los tiempos, incluso comparado con el control sin tratamiento a las 48 y 72 h (figura 28B).

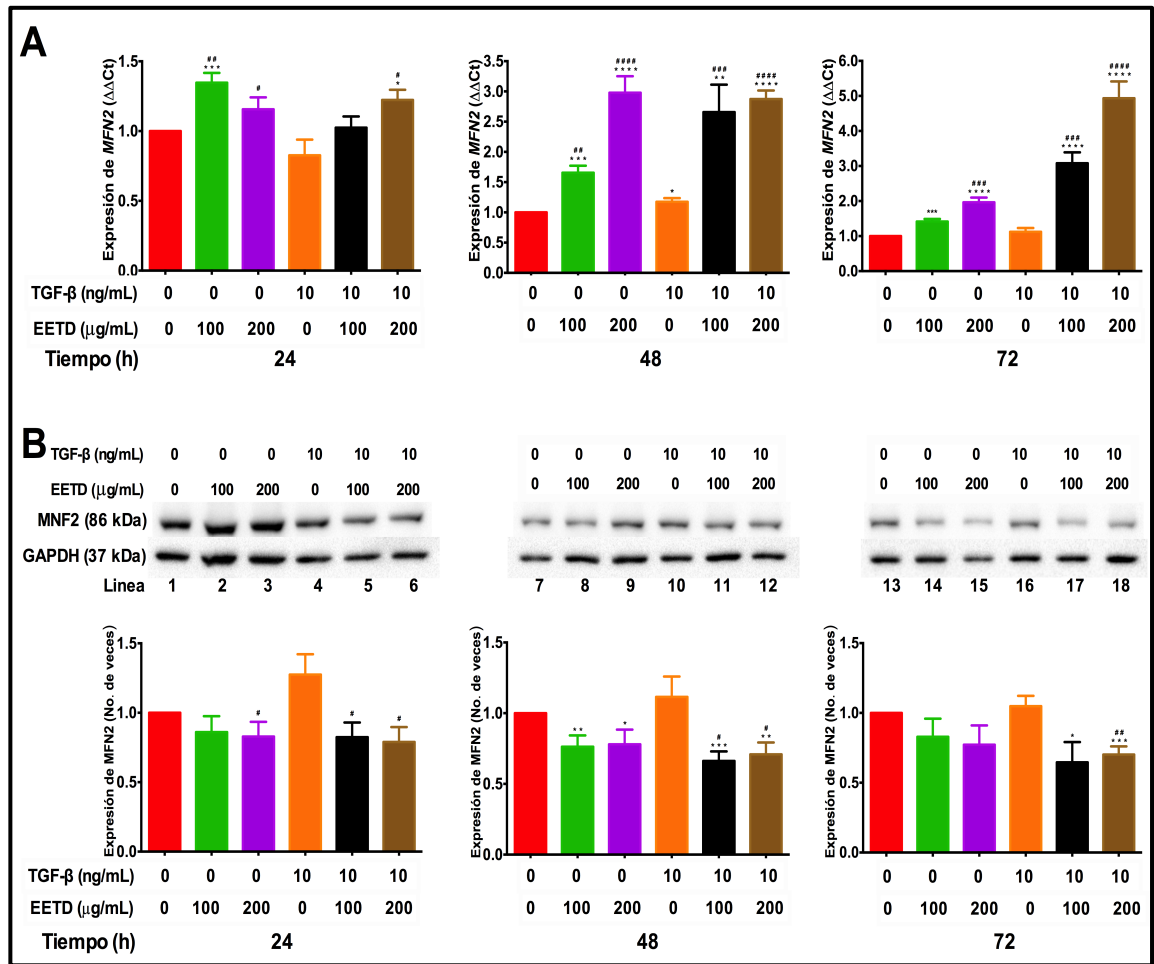


Figura 28. Efecto de EETD sobre MFN2 en células LX-2 tratadas con TGF-β1. A) La expresión de mRNA-*MFN2* se midió por RT-qPCR (n = 6). Las células LX-2 se sembraron en placas de 24 pocillos, se incubaron en medio sin suero durante 24 h, seguido de tratamiento con EETD (100 o 200 μg /mL) a las 24, 48 y 72 h, solo o combinado con TGF-β1 (10 ng/mL). Se usó β-actina como control. B) La expresión proteica de MFN2 se analizó mediante Western Blot (n = 4). Las células LX-2 se sembraron en placas de 6 pocillos y se trataron como anteriormente. GAPDH se utilizó como control. *Condición versus sin TGF-β1 y sin EETD (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001) y #condición versus TGF-β1 (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 y ####p<0.0001).

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

Las CEH son el principal tipo celular responsable de la fibrosis hepática, después de su activación en células fibrogénicas similares a los miofibroblastos (Wynn, 2008). En el presente trabajo, se exploró el potencial del EETD como agente antifibrótico y su papel en la modulación de la TEM y la dinámica de las mitocondrias en las células LX-2.

Se eligieron las células LX-2 debido a la expresión de moléculas clave que regulan la fibrosis hepática y proteínas involucradas en la remodelación de la matriz, lo que las hace muy adecuadas para estudios de fibrosis hepática humana basados en cultivos (Xu *et al.*, 2005; Weiskirchen *et al.*, 2013). Además, se utilizó TGF- β 1 como estímulo fibrogénico para las células LX-2 en condiciones libres de SFB porque es la principal citocina profibrogénica, un activador clásico de las CEH, uno de los orquestadores más importantes de la activación de éstas y su transdiferenciación a miofibroblasto; por tanto TGF- β 1 es un mediador clave durante el desarrollo de la fibrosis hepática (Gressner, 2002b), que promueve la remodelación y el depósito de

MEC activando genes blanco río abajo como MMPs y TIMPs (Gressner, 2002b) y que regula positivamente α -SMA y síntesis de COL1 α 1 (Hellerbrand *et al.*, 1999).

En este trabajo se evaluó la viabilidad celular de distintos compuestos en las células LX-2, el EETD (el principal objeto de estudio de este trabajo), etanol, TGF- β 1, y silibinina. En el caso de silibinina no se observó disminución de la viabilidad celular a ninguna concentración utilizada (0-100 μ M) lo que concuerda con lo reportado por Ezhilarasan y colaboradores (Ezhilarasan *et al.*, 2016, 2017). En el caso del etanol la viabilidad celular fue dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Para TGF- β 1 a la concentración probada (1 ng/mL) no se observó disminución en la viabilidad celular.

Con el fin de explorar el potencial del EETD como agente antifibrótico y que el efecto observado no fuera por daño celular, evaluamos su citotoxicidad en células LX-2. En este trabajo encontramos que el EETD en la línea celular LX-2 induce la muerte celular de manera dependiente de la concentración y tiempo (figura 12), siendo un hallazgo no reportado anteriormente, ya que no había sido probado el EETD en esta línea celular. De acuerdo a estos resultados decidimos utilizar concentraciones de 100 a 200 μ g/mL para su evaluación.

El establecimiento del modelo de activación con TGF- β 1 y etanol en las CEH se evaluó mediante la expresión de mRNA- α -SMA y COL1 α 1 (Hellerbrand *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2011; Ikeda *et al.*, 2011). TGF- β es una de las principales citocinas pro-fibrogénicas, es un activador clásico de las CEH, mediador clave durante el desarrollo de la fibrosis hepática, lo cual se observó en nuestro modelo como sobreexpresión de los marcadores pro-fibrogénicos mRNA- α -SMA y COL1 α 1 (figuras 14 y 15), así como lo reportado en la literatura (Hellerbrand *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2017).

En el caso del estímulo con etanol (figura 15) solo se observó sobreexpresión para el mRNA-*COL1a1* y ningún cambio en la expresión de mRNA- α -*SMA* en contraste con lo reportado en la literatura (Chen *et al.*, 2011).

El primer abordaje del efecto del EETD en las CEH fue la evaluación del efecto pre-exposición al EETD y posteriormente a los inductores de activación TGF- β 1 o etanol en la línea celular LX-2 (figura 17 y 18), con el objetivo de saber si el EETD preserva o protege a las CEH del daño causado por TGF- β 1 o etanol. En el modelo de pre-exposición al EETD (150 μ g/mL) con TGF- β 1 (1 ng/mL), se observó que el EETD (150 μ g/mL) solo o combinado con TGF- β 1 (1 ng/mL) atenúa los niveles de la expresión de mRNA-*COL1a1*; pero en la expresión de mRNA- α -*SMA* el EETD (150 μ g/mL) provocó sobreexpresión y combinado con TGF- β 1 (1 ng/mL) subexpresión en comparación con la expresión del control con TGF- β 1 (figura 17). En el modelo de pre-exposición al EETD con etanol (50 nM), se observó sobreexpresión de mRNA-*COL1a1* y mRNA- α -*SMA* en presencia de etanol y/o EETD (150 μ g/mL) (figura 18).

El segundo abordaje del efecto del EETD en las CEH activadas fue la evaluación del efecto de modulación de daño causado por los inductores de activación y posterior exposición al EETD (150 μ g/mL), con el objetivo de saber si el EETD es capaz de revertir o atenuar el daño causado por TGF- β 1 o etanol (figuras 19 y 20). En el modelo de modulación de daño causado por el inductor de activación TGF- β 1 (1 ng/mL) y posterior exposición al EETD (150 μ g/mL), la presencia del EETD atenuó el aumento de la expresión de mRNA-*COL1a1* provocado por la presencia de TGF- β 1 y aumentó la expresión de mRNA- α -*SMA* en presencia de TGF- β 1 (figura 19). En el modelo de modulación de daño causado por el inductor de activación etanol (50 mM) y posterior exposición al EETD (150 μ g/mL), el EETD atenúo los niveles de expresión de mRNA-

COL1 α 1 en presencia de etanol (50 nM), pero provoca aumento de la expresión de mRNA- α -SMA (figura 20).

En la evaluación a nivel de proteína de α -SMA (figura 21) y TIMP-1 (figura 22), se decidió aumentar el estímulo de activación de las CEH con dosis mayores de etanol (75 a 100 mM) y TGF- β 1 (5 ng/mL). Independientemente de la dosis evaluada para etanol (75 a 100 mM) y TGF- β 1 (5 ng/mL) no hubo diferencia significativa en la expresión de las proteínas en los distintos tiempos a las diferentes dosis.

Debido a estos resultados pudimos observar que los mecanismos moleculares desencadenados en las células LX-2 provocados por distintos agentes (TGF- β 1 y etanol) son variados, lo que explica en parte la variación en la expresión de mRNA de los marcadores evaluados (α -SMA y *COL1 α 1*). En resumen, en los dos modelos evaluados el EETD provoca atenuación de la expresión de mRNA-*COL1 α 1* solo o en combinación con TGF- β 1/etanol, y sobreexpresión de mRNA- α -SMA.

Por tanto, para tratar de esclarecer los datos obtenidos e intentar aumentar el estímulo de activación de las CEH decidimos probar dos concentraciones del EETD: 100 y 200 μ g/mL, con 10 ng/mL de TGF- β 1, en un modelo simple de aplicación de los tratamientos al mismo tiempo; los resultados obtenidos en este modelo con los diferentes marcadores evaluados se resumen en la tabla 17.

Tabla 17. Resumen del efecto del EETD (100 y 200 µg/mL) en las células LX-2 tratadas con TGF-β1 (10 ng/mL).

Gen	mRNA	PROTEÍNA	FUNCIONES
TGF-β	↑	↑	Multifuncional promueve la expresión de genes supresores/promotores de tumor (dependiente de contexto).
α-SMA	↑	↓	Mantenimiento de citoesqueleto, organización y movimiento de orgánulos y determinación de forma celular.
COL1α1	↓	ND*	Fuerza y soporte a tejidos (rigidez y elasticidad)
MMP2	↑	ND*	Activa TGF-β Su reclutamiento promueve apoptosis (integrinas) Proliferación y migración celular Angiogénesis
TIMP1	↑	↓	↑ Cáncer y anti apoptosis
SNAI1	↑	ND*	↑Inducción TEM Apoptosis
MFN2	↑	↓	Fusión mitocondrial

*No determinado

Nota: Todos los resultados aquí mencionados fueron estadísticamente significativos en cualquiera de los tiempos evaluados.

COL1: es un marcador utilizado para la evaluación del proceso fibrótico, y el EETD causa una disminución significativa en la expresión de mRNA-*COL1a1*, se observó un 69% menos que en la expresión basal de las CEH en condiciones libres de SFB y esta inhibición fue dependiente de la dosis. El EETD disminuyó la expresión de mRNA-*COL1a1* en presencia de TGF-β1 también de forma dosis-dependiente, incluso alcanzando el nivel de expresión basal de las CEH en condiciones libres de SFB, lo que

indica que el EETD es un potente inhibidor de la expresión de mRNA-*COL1a1* en un manera dependiente de la dosis. En el proceso fibrótico, cuando la MEC se modifica (aumentando su rigidez), en parte por la acumulación de la proteína COL1 α 1 y los enlaces cruzados que forma esta (Lachowski *et al.*, 2019), se crea un entorno pro-fibrótico que puede activar a la proteína MMP2 (Théret *et al.*, 1998) y ésta, a su vez, puede activar a TGF- β latente y/o desvincular a las integrinas MEC que promueven la apoptosis (Levkau *et al.*, 2002).

Durante la activación de las CEH hay una regulación positiva de genes específicos del músculo liso (entre ellos, α -SMA) y aumenta la polimerización de actina. Esto promueve la liberación de moléculas de la MEC, como la proteína de unión a actina (MRTF/A, por sus siglas en inglés myocardin related transcription factor-A) y la activación de TGF- β , lo que aumenta aún más la respuesta fibrótica al estimular la expresión de genes como α -SMA y *COL1a1* (Shi and Rockey, 2017). El EETD aumentó la expresión de mRNA- α -SMA y disminuyó los niveles de proteína α -SMA, en presencia o ausencia de TGF- β 1. Esta disminución de la proteína α -SMA modulada por el EETD podría disminuir la estimulación fibrótica y la transmisión de señales mecánicas a través de la polimerización de actina, reduciendo la activación de TGF- β , la liberación de proteínas de unión a actina y por lo tanto, disminuyendo la respuesta fibrótica por una reducción en la expresión de α -SMA y *COL1a1*.

La fibrosis hepática es en parte el resultado del desequilibrio entre la síntesis y la degradación de las proteínas MEC. TGF- β promueve la remodelación y el depósito de MEC mediante la activación de genes blanco río abajo, como MMPs y TIMPs (Gressner, 2002b). Las CEH activadas expresan una combinación de MMPs y TIMPs en diferentes etapas de la enfermedad a través de la vía TGF- β (Benyon and Arthur, 2001).

Específicamente las CEH activadas expresan altos niveles de TIMP1 y MMP2, entre otros: TIMP1 inhibe la actividad de las MMPs perpetuando la acumulación de MEC, TIMP1 específicamente inhibe la actividad de MMP2 (Iredale *et al.*, 1992; J P Iredale *et al.*, 1996). Según el modelo utilizado (por el tipo de daño causado) para inducir fibrosis, se ha demostrado que existe variación en los niveles de expresión de TIMP1; sin embargo, la sobreexpresión de TIMP1 es un común denominador, y se ha demostrado que TIMP1 promueve la fibrogénesis (Yoshiji *et al.*, 2000; Yoshiji, 2002; Parsons *et al.*, 2004; Roderfeld *et al.*, 2006). La sobreexpresión de TIMP1 se ha relacionado con la fibrosis en pacientes, tanto en muestras de suero como en tejido hepático, y se ha propuesto como marcador de esta enfermedad (Murawaki *et al.*, 1993, 1997; Murawaki, Kawasaki and Burkhardt, 1994). Además, los niveles séricos elevados de TIMP1 también se correlacionan con la presencia de carcinoma hepatocelular (CHC) en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas (MUZZILLO *et al.*, 1993). De las funciones conocidas de TIMP1, su sobreexpresión está fuertemente asociada con la progresión del cáncer, ya que promueve la TEM que regula la proliferación, migración y supervivencia celular (Waterhouse, Khokha and Denhardt, 1990; Jung *et al.*, 2006), es anti-apoptótico (Mannello and Gazzanelli, 2001; Murphy *et al.*, 2002; Nalluri *et al.*, 2015) y angiogénico (Yoshiji *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2001).

En el presente modelo estudiado se observó que las células LX-2 expuestas al tratamiento con EETD solas o combinadas con TGF- β mostraron que los niveles de mRNA-*TIMP1* estaban regulados a la alza en comparación con las células en condiciones libres de SFB, pero el EETD en ambas concentraciones usado solo o en combinación con TGF- β 1 disminuyó los niveles de la expresión de la proteína TIMP1. Numerosos estudios sugieren una asociación positiva de TIMP1 con la fibrogénesis

hepática y con la progresión al cáncer (Jackson *et al.*, 2017). La inhibición de TIMP1 se asocia con una resolución favorable de la fibrosis pero también se ha demostrado que el tipo de célula y el microambiente (una red molecular de factores) juegan un papel muy importante; por ejemplo, la rigidez de la MEC (Lachowski *et al.*, 2019) y la presencia de otras moléculas (Kopitz *et al.*, 2008; Ramezani-Moghadam *et al.*, 2015).

De acuerdo con lo anterior, se considera que una disminución en la expresión de la proteína TIMP1 que podría ser modulada por el EETD, podría intervenir para tener una resolución fibrótica favorable; sin embargo, la disminución o irrupción de un estímulo no sería suficiente para la disminución o regresión de un proceso complejo, como lo es la fibrosis (Thiele *et al.*, 2017).

Las MMP son fundamentales para el proceso de remodelación de la fibrosis y la actividad de las MMP se controla a varios niveles: modulación de la expresión génica, compartimentación, disponibilidad de activadores e inhibición (Théret *et al.*, 1999b; Campana and Iredale, 2015). Entre los inhibidores se encuentran la inhibición extracelular por TIMPs específicos u otros inhibidores como la $\alpha 2$ macroglobulina (John P. Iredale *et al.*, 1996). MMP2, además de participar en la remodelación de la MEC a través de la degradación de algunos de sus componentes (Théret *et al.*, 1999a), juega un papel en la proliferación y migración celular (Guo *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2014; Bates *et al.*, 2015). MMP2 es expresada por CEH, el activador más potente de MMP2 es la metaloproteinasa de matriz de membrana tipo 1 (MT1MMP) y el inhibidor más importante de su actividad es TIMP2, la proporción de estos (MT1MMP/TIMP2) determina los efectos de MMP2. El TGF- β latente puede activarse mediante múltiples mecanismos; uno de ellos es a través de MMP2 (Yu and Stamenkovic, 2000). Además, el reclutamiento de MMP2 se ha relacionado con integrinas, desconectándolas de la

MEC, promoviendo la apoptosis por pérdida de la señalización de supervivencia mediada por MEC y por inducción activa de apoptosis mediada por integrinas, por tanto de una manera simplista los inhibidores de MMP2 evitarían la apoptosis (Levkau *et al.*, 2002).

El EETD solo o combinado con TGF- β 1 aumentó la expresión de mRNA-*MMP2* con respecto a las células en condiciones libres de SFB. MMP2 tiene una activación dependiente de dosis de la proteína COL1 α 1 (Théret *et al.*, 1999b), si el EETD disminuyera el nivel de proteína COL1 α 1, la activación de MMP2 podría verse afectada. Además, MMP2 puede activar TGF- β latente (Yu and Stamenkovic, 2000); por lo tanto, creemos que el EETD disminuiría el depósito de MEC (disminución en la proteína α -SMA y COL1 α 1) y la activación de MMP2 y TGF- β . La inducción de la sobreexpresión de mRNA-*MMP2* por el EETD no es indicativa de sobreexpresión traduccional, debido a múltiples mecanismos de regulación (Clark *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015), por lo que no sabemos si el EETD está causando apoptosis mediada por MMP2 (Levkau *et al.*, 2002). Para la evaluación de apoptosis se podría realizar la evaluación de la activación de caspasa 3/7 por WB, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica; evaluación de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial por pérdida de potencial mitocondrial, salida de citocromo c desde las mitocondrias al citoplasma por microscopía o citometría de flujo; y evaluación de la escisión de PARP-1 (uno de varios sustratos bien establecidos de caspasas) por WB, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia para PARP-1 escindida; entre otras marcadores moleculares o cambios morfológicos que podrían ser evaluados para apoptosis.

SNAI1 es un objetivo río abajo de TGF- β y desempeña un papel clave en la regulación de varias decisiones del destino celular, como en la apoptosis y en la inducción de la TEM (relaciona la fibrogénesis con la carcinogénesis) (Thuault *et al.*, 2008). La expresión de mRNA-*SNAIL* es diferente en distintas líneas celulares (Yang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2018). En este trabajo, solo a las 48 h, se encontró que los niveles de mRNA-*SNAIL* estaban regulados a la alza con la estimulación de TGF- β en relación con las células en condiciones libres de SFB. El EETD solo o combinado con TGF- β aumenta la expresión de mRNA-*SNAIL*. Los datos sugieren que la sobreexpresión de mRNA-*SNAIL* no se refleja a nivel de traducción o que existe alguna regulación de traducción que no permite su actividad, esto debido a que SNAI1 reprime la expresión de mRNA- α -SMA (Bi *et al.*, 2012). Esto último no se observó en el modelo estudiado, ya que, a pesar de la sobreexpresión de mRNA-*SNAIL* causada por el EETD, existe sobreexpresión de mRNA- α -SMA en todos los tiempos evaluados.

El hígado es un órgano vital en los mamíferos y juega un papel central en la homeostasis del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas en el organismo, y las mitocondrias integran estas vías. Las mitocondrias forman una red dinámica e interconectada que está íntimamente integrada con otros compartimentos celulares. Realizan funciones diversas e interconectadas, produciendo ATP y muchos intermedios biosintéticos, participando en casi todos los aspectos de la función celular, por tanto, se ha relacionado con procesos patogénicos (Giacomello *et al.*, 2020). La fusión de las mitocondrias está regulada por MFN1 y MFN2, ambas mitofusinas son esenciales para el desarrollo, realizando funciones parcialmente redundantes y distintas, según la etapa de desarrollo (Chen, H. *et al.*, 2003). MFN1 y MFN2 se expresan de manera ubicua y muestran diferentes niveles de expresión en diferentes tejidos (Filadi, R., *et al.*, 2018).

Específicamente, la expresión de MFN2 se ha relacionado con la enfermedad hepática crónica (Chen *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2019). Se ha reportado que en células de hepatocitos humanos (L02), la expresión de MFN2 disminuyó significativamente con el tratamiento con glicoquenodesoxicólico (GCDCA), principal componente tóxico de los ácidos biliares; cuando sobreexpresaron MFN2 (debido al aumento de la fusión mitocondrial), disminuyó la fragmentación mitocondrial y revirtieron el daño mitocondrial observado en las células L02 tratadas con GCDCA (Chen, Y., et. al., 2013). En células estelares hepáticas de rata (HSC-T6) se demostró que la sobreexpresión de MFN2 inhibió la vía de señalización de TGF- β 1/Smad, desencadenando la regulación negativa de marcadores asociados con la fibrosis hepática; y en un modelo murino (ratones C57BL/6) de fibrosis inducida por CCl₄, la sobreexpresión de MFN2 suprimió la expresión de genes relacionados a fibrosis hepática y disminuyó significativamente la infiltración de células inmunes (Zhu, H., et. al., 2020).

En el presente estudio el EETD solo o combinado con TGF- β 1 causó la sobreexpresión de mRNA-*MFN2* y la expresión de la proteína MFN2 estuvo disminuida. La modulación causada por el EETD y el probable desencadenamiento de la respuesta celular no está claro, por la falta de evaluación de la respuesta causada en el contexto celular ya que MFN2 juega un papel en el equilibrio entre la apoptosis y la autofagia.

En este trabajo, hubo discrepancias en la expresión de mRNA y proteínas en diferentes genes (α -SMA, TIMP1 y MFN2) en presencia del EETD solo o combinado con TGF- β 1, lo que indica que el EETD está causando una regulación diferencial de la expresión entre el mRNA y proteína; por lo tanto, se planteó la hipótesis de que los mecanismos reguladores transcripcionales y traduccionales se activan de manera diferente. Estos mecanismos de regulación transcripcional pueden estar mediados por

factores que actúan en trans, proteínas de unión a RNA, microRNA y RNA largos no codificantes (lncRNA) que interactúan con elementos cis ubicados en el mRNA, con actividad profibrótica o antifibrótica (Clark *et al.*, 2008). Mientras que la regulación de la traducción a través de la degradación de proteínas (ubiquitinación) (Clark *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2014), también podría influir en la discrepancia de la expresión de mRNA y proteínas. Trabajos anteriores (Lu *et al.*, 2015) informaron que miR-130 puede regular genes relacionados con la activación de las CEH en un modelo de rata, mientras que miR-205 modera el efecto de señalización TGF- β /Smad mediante la regulación directa a la baja de Smad (Zeng *et al.*, 2016).

En el presente trabajo se muestra evidencia de que el EETD en presencia de TGF- β 1 disminuye la expresión de mRNA-*COL1 α 1* y de proteína α -SMA. También disminuye la expresión de las proteínas MFN2 y TIMP1, y provocó la sobreexpresión de mRNA-*MMP2*. Sugerimos que un mecanismo probable por el cual el EETD podría realizar su función hepatoprotectora es induciendo la apoptosis de las células CEH activadas. Este efecto debe verificarse en modelos animales y deben explorarse las rutas por las que el EETD está modulando estos marcadores (figura 29). Las consecuencias del aumento de la expresión de mRNA-*SNAIL* causado por el EETD en algún marcador rio abajo de esta vía no se exploró en este trabajo.

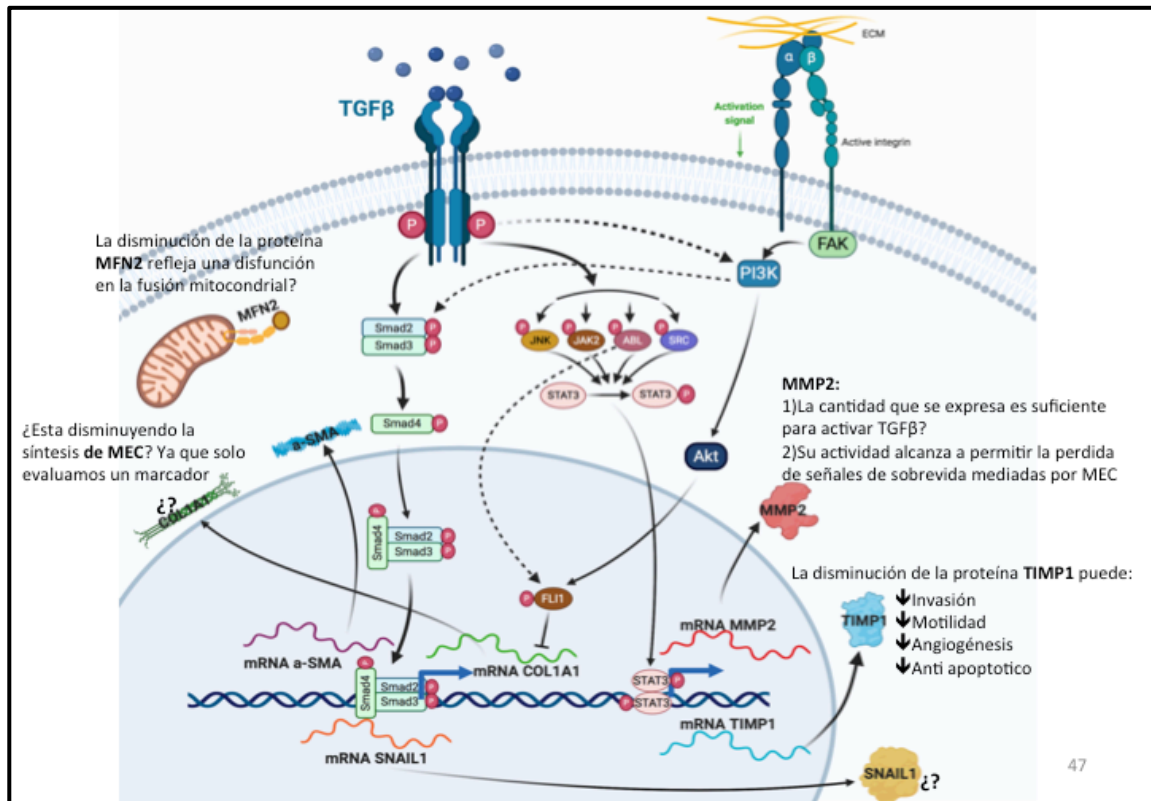


Figura 29. Resumen gráfico de los hallazgos mas importantes encontrados en este trabajo. En la figura se observan algunas de las diferentes vías de señalización y la interacción de las distintas moléculas evaluadas en este trabajo que participan en el proceso fibrótico.

El mecanismo de activación fibrótico y de las CEH hacia la diferenciación a miofibroblastos es un proceso molecular complejo en el que participan múltiples factores; por tanto, el mecanismo de reversión de la fibrogénesis *in vivo* es complejo y multifactorial. El tipo celular, la secuencia de eventos, la interacción célula-célula y la interacción célula-MEC intervienen en el proceso fibrótico, además de la regulación desencadenada directamente por un estímulo; por tanto, la verdadera actividad de las moléculas producidas por un estímulo estará sujeta a regulación transcripcional, traduccional, funcional y espacial (contexto celular) (Clark *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2014; Primikyri *et al.*, 2014; Lachowski *et al.*, 2019). Deberían generarse más estudios

para identificación de los mecanismos relacionados implicados en el papel hepatoprotector de los compuestos naturales.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

1. Se definió la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ o menor del EETD como la dosis segura no tóxica para las células LX-2 durante las 72 h de tratamiento en ausencia de SFB.
2. Se determinó que la concentración inhibitoria 50 (IC50) del EETD es de 1,148 mg/mL en células LX-2.
3. El EETD disminuyó en un 69% la expresión basal de mRNA-*COL1 α 1* y restablece los niveles de expresión basal en presencia de TGF- β 1 de manera dependiente de dosis en las células LX-2.
4. El EETD aumentó la expresión de mRNA-*TGF- β* , *α -SMA*, *TIMP1*, *MMP2*, *SNAIL* y *MFN2*; y la expresión proteica de TGF- β , en presencia o ausencia de TGF- β 1.
5. El EETD modula la vía de TGF- β a través de la sobreexpresión de ésta (sobreexpresión de RNA y proteína), lo que desencadenó la activación de la expresión génica de mRNA- *α -SMA*, *TIMP1*, *MMP2*, *SNAIL* y *MFN2*.

6. El EETD disminuyó la expresión proteica de α -SMA, TIMP1 y MFN2, en presencia o ausencia de TGF- β 1.
7. La sobreexpresión del mRNA-*SNAIL* no revierte o modifica el efecto causado por el EETD sobre el mRNA- α -SMA (sobreexpresión), por lo que tal vez existe algún mecanismo de regulación de traducción que no permite la actividad de SNAIL sobre la expresión de mRNA- α -SMA.
8. El EETD indujo una regulación diferencial de la expresión entre el mRNA y proteína, evidenciado por las discrepancias en la expresión de mRNA y proteínas. Los mecanismos por los cuales existen estas discrepancias, pueden ser por la activación de vías alternas que modulen la transcripción del RNA, pero no fueron objeto de este trabajo.
9. La modulación causada por el EETD y el probable desencadenamiento de la respuesta celular en SNAIL y MFN2 no esta clara, por la falta de evaluación de la respuesta causada en el contexto celular.
10. El EETD es un potente inhibidor de la expresión de mRNA-*COL1 α 1* de manera dependiente de la dosis lo cual debe comprobarse por otras técnicas moleculares.
11. El EETD disminuye el depósito de MEC mediante la disminución de la proteína α -SMA.
12. El EETD tiene un probable efecto anti-fibrótico debido a la inhibición de la expresión de mRNA-*COL1 α 1*, disminución del depósito de MEC mediante la disminución de la proteína α -SMA y disminución de la expresión proteica de TIMP1. Se sugiere que por mecanismo de disminución de activación de MMP2, de transmisión de señales mecánicas, expresión de genes de contenido de MEC,

de activación de TGF- β latente y/o desvinculación de las integrinas MEC que promueven la apoptosis.

13. En conjunto un mecanismo probable por el cual el EETD podría realizar su función anti-fibrótica es induciendo la apoptosis de las células CEH activadas, por lo que es importante continuar con la evaluación de otros marcadores para determinar este efecto y el efecto total del EETD en las células LX-2.
14. El probable efecto anti-fibrótico del EETD debe ser validado en un modelo animal y explorarse las rutas por las que el EETD está modulando estos marcadores.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Abenavoli, L. *et al.* (2010) 'Milk thistle in liver diseases: past, present, future.', *Phytotherapy research : PTR*, 24(10), pp. 1423–32. doi: 10.1002/ptr.3207.
- Adachi, Y. *et al.* (1994) 'Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury.', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 20(2), pp. 453–60. doi: 10.1002/hep.1840200227.
- Akpolat, N. *et al.* (2005) 'The value of alpha-SMA in the evaluation of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis development: a histopathological and immunohistochemical study', *Histopathology*, 47(3), pp. 276–280. doi: 10.1111/j.1365-2559.2005.02226.x.
- Alberts, B. *et al.* (2007) 'Specialized Tissues, Stem Cells, and Tissue Renewal', in *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, pp. 1417–1484. doi: 10.1201/9780203833445-23.
- Armendariz-Borunda, J. *et al.* (1990) 'Effect of carbon tetrachloride on liver fibrosis in the rat', *The FASEB Journal*, 4(2), pp. 215–221. doi: 10.1096/fasebj.4.2.2298342.
- Arthur, M. J. (2000) 'Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis.', *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 279(2), pp. G245–9. doi: 10.1152/ajpgi.2000.279.2.G245.
- Arthur, M. J. P. *et al.* (1992) 'Secretion of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity.', *The Biochemical journal*, 287 (Pt 3, pp. 701–7. doi: 10.1042/bj2870701.
- Atzori, L., Poli, G. and Perra, A. (2009) 'Hepatic stellate cell: a star cell in the liver.', *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(8–9), pp. 1639–42. doi: 10.1016/j.biocel.2009.03.001.
- Bachem, M. G., Melchior, R. and Gressner, A. M. (1989) 'The Role of Thrombocytes in Liver Fibrogenesis: Effects of Platelet Lysate and Thrombocyte-Derived Growth Factors on the Mitogenic Activity and Glycosaminoglycan Synthesis of Cultured Rat Liver Fat Storing Cells', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 27(9), pp. 555–565. doi: 10.1515/cclm.1989.27.9.555.

- Bahri, S. *et al.* (2017) 'Prophylactic and curative effect of rosemary leaves extract in a bleomycin model of pulmonary fibrosis', *Pharmaceutical Biology*, 55(1), pp. 462–471. doi: 10.1080/13880209.2016.1247881.
- Bates, A. L. *et al.* (2015) 'Stromal matrix metalloproteinase 2 regulates collagen expression and promotes the outgrowth of experimental metastases', *The Journal of Pathology*, 235(5), pp. 773–783. doi: 10.1002/path.4493.
- Benyon, R. C. and Arthur, M. J. P. (2001) 'Extracellular Matrix Degradation and the Role of Hepatic Stellate Cells', *Seminars in Liver Disease*, 21(03), pp. 373–384. doi: 10.1055/s-2001-17552.
- Bi, W. R. *et al.* (2012) 'Bone morphogenetic protein-7 regulates Snail signaling in carbon tetrachloride-induced fibrosis in the rat liver', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4(6), pp. 1022–1026. doi: 10.3892/etm.2012.720.
- Bilzer, M., Roggel, F. and Gerbes, A. L. (2006) 'Role of Kupffer cells in host defense and liver disease', *Liver International*, 26(10), pp. 1175–1186. doi: 10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x.
- Bissell, D. M., Roulot, D. and George, J. (2001) 'Transforming growth factor beta and the liver.', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 34(5), pp. 859–67. doi: 10.1053/jhep.2001.28457.
- Bogert, P. T. and LaRusso, N. F. (2007) 'Cholangiocyte biology.', *Current opinion in gastroenterology*, 23(3), pp. 299–305. doi: 10.1097/MOG.0b013e3280b079fb.
- Boigk, G. *et al.* (1997) 'Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats.', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 26(3), pp. 643–9. doi: 10.1002/hep.510260316.
- Bonner, J. C. (2004) 'Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases.', *Cytokine & growth factor reviews*, 15(4), pp. 255–73. doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.006.
- Boyer, T. D., Wright, T. L. and Manns, M. P. (2006) *Zakim and Boyer's Hepatology*, *Zakim and Boyer's Hepatology*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-1-4160-3258-8.X5001-3.
- Brinckerhoff, C. E., Rutter, J. L. and Benbow, U. (2000) 'Interstitial collagenases as markers of tumor progression', *Clinical Cancer Research*, 6(12), pp. 4823–4830.
- Brito, N. J. N. *et al.* (2012) 'Antioxidant activity and protective effect of *Turnera ulmifolia* Linn. var. *elegans* against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats.', *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(12), pp. 4340–7. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.003.
- de Brito, O. M. and Scorrano, L. (2008) 'Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria', *Nature*, 456(7222), pp. 605–610. doi: 10.1038/nature07534.
- de Caestecker, M. (2004) 'The transforming growth factor-beta superfamily of receptors.', *Cytokine & growth factor reviews*, 15(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.cytogfr.2003.10.004.
- Campana, L. and Iredale, J. (2015) 'Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors', in *Stellate Cells in Health and Disease*. Elsevier, pp. 107–124. doi: 10.1016/B978-0-12-800134-9.00007-5.
- Canbay, A. *et al.* (2002) 'Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis.', *Gastroenterology*, 123(4), pp. 1323–30. doi: 10.1053/gast.2002.35953.
- Canbay, A., Taimr, P., *et al.* (2003) 'Apoptotic body engulfment by a human stellate cell

line is profibrogenic.’, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 83(5), pp. 655–63. doi: 10.1097/01.lab.0000069036.63405.5c.

Canbay, A., Feldstein, A. E., *et al.* (2003) ‘Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression.’, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 38(5), pp. 1188–98. doi: 10.1053/jhep.2003.50472.

Canbay, A., Friedman, S. and Gores, G. J. (2004) ‘Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis.’, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 39(2), pp. 273–8. doi: 10.1002/hep.20051.

Cao, Q. *et al.* (2004) ‘Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H₂O₂-dependant MAPK pathways.’, *The Journal of biological chemistry*, 279(6), pp. 4292–304. doi: 10.1074/jbc.M308351200.

Cao, Q., Mak, K. M. and Lieber, C. S. (2006) ‘DLPC and SAME combined prevent leptin-stimulated TIMP-1 production in LX-2 human hepatic stellate cells by inhibiting H₂O₂-mediated signal transduction’, *Liver International*, 26(2), pp. 221–231. doi: 10.1111/j.1478-3231.2005.01204.x.

Cao, Q., Mak, K. M. and Lieber, C. S. (2007) ‘Leptin represses matrix metalloproteinase-1 gene expression in LX2 human hepatic stellate cells.’, *Journal of hepatology*, 46(1), pp. 124–33. doi: 10.1016/j.jhep.2006.07.027.

Chen, H. *et al.* (2003) ‘Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development’, *Journal of Cell Biology*, 160(2), pp. 189–200. doi: 10.1083/jcb.200211046.

Chen, L. *et al.* (2011) ‘Ethanol-stimulated differentiated functions of human or mouse hepatic stellate cells are mediated by connective tissue growth factor.’, *Journal of hepatology*, 55(2), pp. 399–406. doi: 10.1016/j.jhep.2010.11.025.

Chen, Y. *et al.* (2013) ‘Mitofusin 2 Protects Hepatocyte Mitochondrial Function from Damage Induced by GCDCA’, *PLoS ONE*. Edited by M. Makishima, 8(6), p. e65455. doi: 10.1371/journal.pone.0065455.

Chong, L.-W. *et al.* (2011) ‘Antifibrotic Effects of Triptolide on Hepatic Stellate Cells and Dimethylnitrosamine-intoxicated Rats’, *Phytotherapy Research*, 25(7), pp. 990–999. doi: 10.1002/ptr.3381.

Chuang, H.-Y. *et al.* (2011) H.-Y. 90–999. doi: 10.1002/ptr.3381.on Hepatic Stellate Cells and Dimethylnitrosamine-intoxicated Rats’, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(15), pp. 2777–2784. doi: 10.1002/jsfa.4521.

Clark, I. M. *et al.* (2008) ‘The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors.’, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(6–7), pp. 1362–78. doi: 10.1016/j.biocel.2007.12.006.

Crispe, I. N. (2003a) ‘Hepatic T cells and liver tolerance.’, *Nature reviews. Immunology*, 3(1), pp. 51–62. doi: 10.1038/nri981.

Crispe, I. N. (2003b) ‘Hepatic T cells and liver tolerance’, *Nature Reviews Immunology*, 3(1), pp. 51–62. doi: 10.1038/nri981.

Delgado-Montemayor, C. *et al.* (2017) *DESARROLLO DE UN MEDICAMENTO HERBOLARIO CON ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA A PARTIR DE Turnera diffusa*. Universidad Autonoma de Nuevo Leon.

Delgado-Montemayor, C. *et al.* (2020) ‘Hepatodamianol as the hepatoprotective constituent of Turnera diffusa’, *Pak. J. Pharm. Sci.*

Demetris, A. J. *et al.* (2016) ‘Functional Immune Anatomy of the Liver-As an Allograft.’, *American journal of transplantation: official journal of the American*

- Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 16(6), pp. 1653–80. doi: 10.1111/ajt.13749.
- Distler, J. H. W. *et al.* (2019) ‘Shared and distinct mechanisms of fibrosis’, *Nature Reviews Rheumatology*, 15(12), pp. 705–730. doi: 10.1038/s41584-019-0322-7.
- Domitrović, R. and Potočnjak, I. (2016) ‘A comprehensive overview of hepatoprotective natural compounds: mechanism of action and clinical perspectives’, *Archives of Toxicology*, 90(1), pp. 39–79. doi: 10.1007/s00204-015-1580-z.
- Dooley, S. and ten Dijke, P. (2012) 204-015-1580-z.ession of liver disease., *PCell and tissue research*, 347(1), pp. 245–56. doi: 10.1007/s00441-011-1246-y.
- Dranoff, J. A. and Wells, R. G. (2010) ‘Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis.’, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(4), pp. 1438–44. doi: 10.1002/hep.23405.
- Everett, L., Galli, A. and Crabb, D. (2000) ‘The role of hepatic peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease’, *Liver International*, 20(3), pp. 191–199. doi: 10.1034/j.1600-0676.2000.020003191.x.
- Ezhilarasan, D. *et al.* (2016) ‘Silibinin Inhibits Proliferation and Migration of Human Hepatic Stellate LX-2 Cells’, *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 6(3), pp. 167–174. doi: 10.1016/j.jceh.2016.01.002.
- Ezhilarasan, D. *et al.* (2017) ‘Silibinin induces hepatic stellate cell cycle arrest via enhancing p53/p27 and inhibiting Akt downstream signaling protein expression.’, *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*, 16(1), pp. 80–87. doi: 10.1016/s1499-3872(16)60166-2.
- Fallowfield, J. A. (2011) ‘Therapeutic targets in liver fibrosis’, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(5), pp. G709–G715. doi: 10.1152/ajpgi.00451.2010.
- Fehér, P. *et al.* (2015) ‘Hepatoprotective effects of a self-micro emulsifying drug delivery system containing Silybum marianum native seed oil against experimentally induced liver injury’, *Pharmazie*, 70(4), pp. 231–38. doi: doi.org/10.1691/ph.2015.4146.
- Filadi, R., Pendin, Di. and Pizzo, P. (2018) ‘Mitofusin 2: from functions to disease’, *Cell Death & Disease*, 9(3), p. 330. doi: 10.1038/s41419-017-0023-6.
- Fischer, R. *et al.* (2002) ‘Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells.’, *Gastroenterology*, 123(3), pp. 845–61. doi: 10.1053/gast.2002.35384.
- Friedman, S. L. *et al.* (1985) ‘Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(24), pp. 8681–5. doi: 10.1073/pnas.82.24.8681.
- Friedman, S. L. (2004) ‘Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications.’, *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology*, 1(2), pp. 98–105. doi: 10.1038/ncpgasthep0055.
- Friedman, S. L. (2008a) ‘Hepatic fibrosis -- overview.’, *Toxicology*, 254(3), pp. 120–9. doi: 10.1016/j.tox.2008.06.013.
- Friedman, S. L. (2008b) ‘Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver.’, *Physiological reviews*, 88(1), pp. 125–72. doi: 10.1152/physrev.00013.2007.
- García, L. *et al.* (2002) ‘Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis’, *Journal of Hepatology*, 37(6), pp. 797–805. doi: 10.1016/S0168-8278(02)00272-6.
- Geerts, A. *et al.* (1990) ‘Collagen type I and III occur together in hybrid fibrils in the

- space of Disse of normal rat liver.’, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 12(2), pp. 233–41. doi: 10.1002/hep.1840120209.
- Geerts, A. (2001) ‘History, Heterogeneity, Developmental Biology, and Functions of Quiescent Hepatic Stellate Cells’, *Seminars in Liver Disease*, 21(03), pp. 311–336. doi: 10.1055/s-2001-17550.
- Geske, F. J. *et al.* (2002) ‘The role of the macrophage in apoptosis: hunter, gatherer, and regulator.’, *International journal of hematology*, 76(1), pp. 16–26. doi: 10.1007/BF02982714.
- Giacomello, M. *et al.* (2020) ‘The cell biology of mitochondrial membrane dynamics’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), pp. 204–224. doi: 10.1038/s41580-020-0210-7.
- Godichaud, S. *et al.* (2000) ‘Deactivation of cultured human liver myofibroblasts by Trans-resveratrol, a grapevine-derived polyphenol’, *Hepatology*, 31(4), pp. 922–931. doi: 10.1053/he.2000.5848.
- Godoy, P. *et al.* (2013) *Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME*, *Archives of Toxicology*. doi: 10.1007/s00204-013-1078-5.
- Gomes, L. R. *et al.* (2012) . R. 7/s00204-013-1078-5.eostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells.’, *BMC cancer*, 12(1), p. 26. doi: 10.1186/1471-2407-12-26.
- Gressner, A. M. (2002a) ‘Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis’, *Frontiers in Bioscience*, 7(1–3), p. d793. doi: 10.2741/gressner.
- Gressner, A. M. (2002b) ‘Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis’, *Frontiers in Bioscience*, 7(4), p. A812. doi: 10.2741/A812.
- Guo, L. *et al.* (2014) ‘Mechanism of matrix metalloproteinase axis-induced neointimal growth’, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 66, pp. 116–125. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.11.014.
- Hadi, R. *et al.* (2020) ‘Utility of glutamine synthetase immunohistochemistry in identifying features of regressed cirrhosis.’, *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* Springer US, 33(3), pp. 448–455. doi: 10.1038/s41379-019-0346-1.
- Han, Y.-P. *et al.* (2007) ‘A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix.’, *The Journal of biological chemistry*, 282(17), pp. 12928–39. doi: 10.1074/jbc.M700554200.
- Hellerbrand, C. *et al.* (1999) and, C. 2928–39. doi: 10.1074/jbc.M700554200.late cell activation in vivo: 1*Journal of Hepatology*, 30(1), pp. 77–87. doi: 10.1016/S0168-8278(99)80010-5.
- Henderson, N. C. and Forbes, S. J. (2008) ‘Hepatic fibrogenesis: from within and outwith.’, *Toxicology*, 254(3), pp. 130–5. doi: 10.1016/j.tox.2008.08.017.
- Hernandez-Cañaveral, I. *et al.* (2004) ‘Amplified expression of dominant-negative transforming growth factor-beta type II receptor inhibits collagen type I production via reduced Smad-3 activity.’, *Journal of gastroenterology and hepatology*, 19(4), pp. 380–7. doi: 10.1111/j.1440-1746.2003.03292.x.
- Herrmann, J., Gressner, A. M. and Weiskirchen, R. (2007) ‘Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function?’, *Journal of cellular and molecular medicine*, 11(4), pp. 704–22. doi: 10.1111/j.1582-

4934.2007.00060.x.

Hinz, B. *et al.* (2001) 'Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by P. T. Matsudaira, 12(9), pp. 2730–2741. doi: 10.1091/mbc.12.9.2730.

Horowitz, J. C. *et al.* (2007) , J. C. . Matsudaira, 12(9), pp. 2730–2741. doi: 10.1091/mbc.12.9.2730. growth factor- β 1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts', *Cellular Signalling*, 19(4), pp. 761–771. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.10.001.

Huang, D. *et al.* (2014) 'Rock2 promotes the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by modifying MMP2 ubiquitination and degradation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 453(1), pp. 49–56. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.061.

Huang, Y. T. *et al.* (1999) 'Acute hemodynamic effects of tetramethylpyrazine and tetrandrine on cirrhotic rats.', *Planta medica*, 65(2), pp. 130–4. doi: 10.1055/s-1999-13973.

Ikeda, R. *et al.* (2011) . p. 130–4. doi: 10.1055/s-1999-13973. dase 4 induced by transforming growth factor β 1 are the therapeutic targets of polyenylphosphatidylcholine in the suppression of human hepatic stellate cell activation.' as *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 60(6), pp. 597–604. doi: 10.1007/s00011-011-0309-6.

Iredale, J. P. *et al.* (1992) 'Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases- 1. Implications for regulation of matrix degradation in liver', *Journal of Clinical Investigation*, 90(1), pp. 282–287. doi: 10.1172/JCI115850.

Iredale, J P *et al.* (1996) 'Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis.', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 24(1), pp. 176–84. doi: 10.1002/hep.510240129.

Iredale, John P. *et al.* (1996) 'Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis', *Hepatology*, 24(1), pp. 176–184. doi: 10.1053/jhep.1996.v24.pm0008707259.

Iredale, J. P. (2001) 'Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury.', *Seminars in liver disease*, 21(3), pp. 427–36. doi: 10.1055/s-2001-17557.

Iredale, J. P. (2003) 'Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments', *BMJ*, 327(7407), pp. 143–147. doi: 10.1136/bmj.327.7407.143.

Jackson, H. W. *et al.* (2017) 'TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 17(1), pp. 38–53. doi: 10.1038/nrc.2016.115.

Jarnagin, W. R. *et al.* (1994) 'Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis.', *The Journal of cell biology*, 127(6 Pt 2), pp. 2037–48. doi: 10.1083/jcb.127.6.2037.

Jeong, E. J. *et al.* (2015) . J. , pp. 2037–48. doi: 10.1083/jcb.127.6.2037. ling: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis', *Biological & pharmaceutical bulletin*, 38(2), pp. 228–34. doi: 10.1248/bpb.b14-00583.

Jia, J. D. *et al.* (2001) 'Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1.', *Journal of hepatology*, 35(3), pp. 392–8. doi: 10.1016/s0168-8278(01)00148-9.

Jiang, J. X. *et al.* (2009) 'Apoptotic body engulfment by hepatic stellate cells promotes their survival by the JAK/STAT and Akt/NF-kappaB-dependent pathways.', *Journal of*

- hepatology*, 51(1), pp. 139–48. doi: 10.1016/j.jhep.2009.03.024.
- Johnson, S. J., Hines, J. E. and Burt, A. D. (1992) ‘Immunolocalization of proliferating perisinusoidal cells in rat liver.’, *The Histochemical journal*, 24(2), pp. 67–72. doi: 10.1007/BF01082441.
- Jung, K.-K. *et al.* (2006) ‘Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein’, *The EMBO Journal*, 25(17), pp. 3934–3942. doi: 10.1038/sj.emboj.7601281.
- Juza, R. M. and Pauli, E. M. (2014) ‘Clinical and surgical anatomy of the liver: A review for clinicians’, *Clinical Anatomy*, 27(5), pp. 764–769. doi: 10.1002/ca.22350.
- Kadir, F. A. *et al.* (2014) ‘PASS-predicted hepatoprotective activity of Caesalpinia sappan in thioacetamide-induced liver fibrosis in rats.’, *TheScientificWorldJournal*, 2014, p. 301879. doi: 10.1155/2014/301879.
- Kasahara, A. *et al.* (2013) ‘Mitochondrial Fusion Directs Cardiomyocyte Differentiation via Calcineurin and Notch Signaling’, *Science*, 342(6159), pp. 734–737. doi: 10.1126/science.1241359.
- Khacho, M. *et al.* (2016) ‘Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by Regulating a Nuclear Transcriptional Program.’, *Cell stem cell*, 19(2), pp. 232–247. doi: 10.1016/j.stem.2016.04.015.
- Kharbanda, K. K. *et al.* (2004) a, K. K. 247. doi: 10.1016/j.stem.2016.04.015.ion of activated hepatic stellate cells’, *Journal of Hepatology*, 41(1), pp. 60–66. doi: 10.1016/j.jhep.2004.03.019.
- Kiener, P. A. *et al.* (1997) ‘Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages.’, *The Journal of experimental medicine*, 185(8), pp. 1511–6. doi: 10.1084/jem.185.8.1511.
- Kim, J. Y. *et al.* (2003) ‘Induction of apoptosis by tanshinone I via cytochrome c release in activated hepatic stellate cells.’, *Pharmacology & toxicology*, 92(4), pp. 195–200. doi: 10.1034/j.1600-0773.2003.920410.x.
- Kmieć, Z. (2001) ‘Cooperation of liver cells in health and disease.’, *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 161, pp. III–XIII, 1–151. doi: 10.1007/978-3-642-56553-3.
- Kojima, Y. *et al.* (2003) ‘Regulation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine responses by Kupffer cells in endotoxin-enhanced reperfusion injury after total hepatic ischemia.’, *Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 16(4), pp. 231–40. doi: 10.1007/s00147-002-0536-4.
- Kondou, H. *et al.* (2003) ‘A blocking peptide for transforming growth factor-beta1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo.’, *Journal of hepatology*, 39(5), pp. 742–8. doi: 10.1016/s0168-8278(03)00377-5.
- Kopitz, C. *et al.* (2008) ‘Plasminogen activator inhibitor-2, but not cystatin C, inhibits the prometastatic activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the liver’, *Human Gene Therapy*, 19(10), pp. 1039–1049. doi: 10.1089/hum.2008.078.
- Krithika, R. *et al.* (2009) ‘Isolation, characterization and antioxidative effect of phyllanthin against CCl4-induced toxicity in HepG2 cell line.’, *Chemico-biological interactions*, 181(3), pp. 351–8. doi: 10.1016/j.cbi.2009.06.014.
- Kweon, Y.-O. *et al.* (2003) ‘Gliotoxin-mediated apoptosis of activated human hepatic stellate cells.’, *Journal of hepatology*, 39(1), pp. 38–46. doi: 10.1016/s0168-8278(03)00178-8.
- Lachowski, D. *et al.* (2019) ‘Matrix stiffness modulates the activity of MMP-9 and

TIMP-1 in hepatic stellate cells to perpetuate fibrosis', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-019-43759-6.

Laskin, D. L. (1990) 'Nonparenchymal cells and hepatotoxicity.', *Seminars in liver disease*, 10(4), pp. 293–304. doi: 10.1055/s-2008-1040485.

Lee, M. *et al.* (2011) 'Antifibrotic constituents of *Alnus firma* on hepatic stellate cells', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(10), pp. 2906–2910. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.03.074.

Lee, M. *et al.* (2012) 'Antifibrotic activity of diarylheptanoids from *Betula platyphylla* toward HSC-T6 cells.', *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(9), pp. 1616–20. doi: 10.1271/bbb.110887.

Levkau, B. *et al.* (2002) 'Activation of metalloproteinases and their association with integrins: an auxiliary apoptotic pathway in human endothelial cells', *Cell Death & Differentiation*, 9(12), pp. 1360–1367. doi: 10.1038/sj.cdd.4401106.

Li, J. *et al.* (2014) 'Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: literature review.', *BioMed research international*, 2014, p. 872139. doi: 10.1155/2014/872139.

Lin, Y. *et al.* (2014) 'Resveratrol inhibits glucose-induced migration of vascular smooth muscle cells mediated by focal adhesion kinase', *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(7), pp. 1389–1401. doi: 10.1002/mnfr.201300698.

Liu, C. *et al.* (2002) 'Effects of salvianolic acid-B on TGF-beta 1 stimulated hepatic stellate cell activation and its intracellular signaling.', *Zhonghua yi xue za zhi*, 82(18), pp. 1267–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12425809>.

Liu, C. *et al.* (2003) 'Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent.', *The Journal of biological chemistry*, 278(13), pp. 11721–8. doi: 10.1074/jbc.M207728200.

Lu, L. *et al.* (2015)), pp. 11721–8. doi: 10.1074/jbc.M207728200. by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 465(3), pp. 387–93. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.012.

Ma, X., Jingbo, Z. and Charles S, L. (1996) 'Polyenylphosphatidylcholine attenuates non-alcoholic hepatic fibrosis and accelerates its regression', *Journal of Hepatology*, 24(5), pp. 604–613. doi: 10.1016/S0168-8278(96)80147-4.

Malarkey, D. E. *et al.* (2005) 'New insights into functional aspects of liver morphology.', *Toxicologic pathology*, 33(1), pp. 27–34. doi: 10.1080/01926230590881826.

Mannello, F. and Gazzanelli, G. (2001) 'Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications.', *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 6(6), pp. 479–82. doi: 10.1023/a:1012493808790.

McCrudden, R. and Iredale, J. P. (2000) 'Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases.', *Histology and histopathology*, 15(4), pp. 1159–68. doi: 10.14670/HH-15.1159.

Melton, A. C., Datta, A. and Yee, H. F. (2006) '[Ca²⁺]_i-independent contractile force generation by rat hepatic stellate cells in response to endothelin-1.', *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 290(1), pp. G7-13. doi: 10.1152/ajpgi.00337.2005.

- Milani, S. *et al.* (1995) 'Cellular sources of extracellular matrix proteins in normal and fibrotic liver. Studies of gene expression by in situ hybridization.', *Journal of hepatology*, 22(2 Suppl), pp. 71–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7665853>.
- Mizobuchi, Y. *et al.* (1998) 'Retinyl palmitate reduces hepatic fibrosis in rats induced by dimethylnitrosamine or pig serum', *Journal of Hepatology*, 29(6), pp. 933–943. doi: 10.1016/S0168-8278(98)80121-9.
- Muhanna, N. *et al.* (2008) 'Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocytes: A novel pathway of fibrogenesis.', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48(3), pp. 963–77. doi: 10.1002/hep.22413.
- Murawaki, Y. *et al.* (1993) 'Serum tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic liver disease and with hepatocellular carcinoma', *Clinica Chimica Acta*, 218(1), pp. 47–58. doi: 10.1016/0009-8981(93)90221-O.
- Murawaki, Y. *et al.* (1997) 'Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the liver of patients with chronic liver disease', *Journal of Hepatology*, 26(6), pp. 1213–1219. doi: 10.1016/S0168-8278(97)80454-0.
- Murawaki, Y., Kawasaki, H. and Burkhardt, H. (1994) 'Serum Collagenase Activity in Chronic Liver Diseases', *Pathology - Research and Practice*, 190(9–10), pp. 929–933. doi: 10.1016/S0344-0338(11)80998-2.
- Murphy, F. R. *et al.* (2002) 'Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis.', *The Journal of biological chemistry*, 277(13), pp. 11069–76. doi: 10.1074/jbc.M111490200.
- Murphy, M. P. and Hartley, R. C. (2018) 'Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies.', *Nature reviews. Drug discovery*, 17(12), pp. 865–886. doi: 10.1038/nrd.2018.174.
- MUZZILLO, D. A. *et al.* (1993) 'Clinical evaluation of serum tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in patients with liver diseases', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 8(5), pp. 437–441. doi: 10.1111/j.1440-1746.1993.tb01544.x.
- Naito, M., Hasegawa, G. and Takahashi, K. (1997) 'Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells.', *Microscopy research and technique*, 39(4), pp. 350–64. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19971115)39:4<350::AID-JEMT5>3.0.CO;2-L.
- Nalluri, S. *et al.* (2015) 'TIMP-1 Inhibits Apoptosis in Lung Adenocarcinoma Cells via Interaction with Bcl-2', *PLOS ONE*. Edited by A. Ahmad, 10(9), p. e0137673. doi: 10.1371/journal.pone.0137673.
- Nan, J. X. *et al.* (2001) 'Anti-fibrotic effects of a hot-water extract from *Salvia miltiorrhiza* roots on liver fibrosis induced by biliary obstruction in rats.', *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(2), pp. 197–204. doi: 10.1211/0022357011775406.
- Novo, E. *et al.* (2006) 'Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells.', *Gut*, 55(1), pp. 90–7. doi: 10.1136/gut.2005.069633.
- Nunnari, J. and Suomalainen, A. (2012) 'Mitochondria: in sickness and in health.', *Cell*, 148(6), pp. 1145–59. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035.
- Oakley, F. *et al.* (2009) 'Angiotensin II activates I kappaB kinase phosphorylation of RelA at Ser 536 to promote myofibroblast survival and liver fibrosis.', *Gastroenterology*, 136(7), pp. 2334–2344.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2009.02.081.
- Olsen, A. L. *et al.* (2011) 'Hepatic stellate cells require a stiff environment for

myofibroblastic differentiation.’, *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 301(1), pp. G110-8. doi: 10.1152/ajpgi.00412.2010.

Orr, J. G. *et al.* (2004) ‘Mechanism of action of the antifibrogenic compound gliotoxin in rat liver cells’, *Hepatology*, 40(1), pp. 232–242. doi: 10.1002/hep.20254.

Park, P. H. *et al.* (2000) ‘Effect of tetrandrine on experimental hepatic fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats.’, *Pharmacology & toxicology*, 87(6), pp. 261–8. doi: 10.1034/j.1600-0773.2000.pto870604.x.

Parola, M. *et al.* (1992) ‘Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride—induced chronic liver damage and cirrhosis’, *Hepatology*. doi: 10.1002/hep.1840160426.

Parsons, C. J. *et al.* (2004) ‘Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats’, *Hepatology*, 40(5), pp. 1106–1115. doi: 10.1002/hep.20425.

Pellicoro, A. *et al.* (2014) ‘Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ.’, *Nature reviews. Immunology*, 14(3), pp. 181–94. doi: 10.1038/nri3623.

Peralta-Zaragoza, O., Lagunas-Martínez, A. and Madrid-Marina, V. (2001) ‘Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer’, *Salud Pública de México*, 43(4), pp. 340–351. doi: 10.1590/S0036-36342001000400011.

Pernas, L. and Scorrano, L. (2016) ‘Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function’, *Annual Review of Physiology*. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105011.

Pinzani, M. *et al.* (1992) ‘Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients.’, *Journal of Clinical Investigation*, 90(2), pp. 642–646. doi: 10.1172/JCI115905.

Pinzani, M. and Gentilini, P. (1999) ‘Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis.’, *Seminars in liver disease*, 19(4), pp. 397–410. doi: 10.1055/s-2007-1007128.

Primikyri, A. *et al.* (2014) ‘Direct Binding of Bcl-2 Family Proteins by Quercetin Triggers Its Pro-Apoptotic Activity’, *ACS Chemical Biology*, 9(12), pp. 2737–2741. doi: 10.1021/cb500259e.

Prud’homme, C. A. (2000) ‘The Inhibitory Effects of Transforming Growth Factor-Beta-1 (TGF-β1) in Autoimmune Diseases’, *Journal of Autoimmunity*, 14(1), pp. 23–42. doi: 10.1006/jaut.1999.0339.

Ramadori, G. *et al.* (1990) ‘Muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells’, *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 59(1), pp. 349–357. doi: 10.1007/BF02899424.

Ramezani-Moghadam, M. *et al.* (2015) ‘Adiponectin reduces hepatic stellate cell migration by promoting tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) secretion’, *Journal of Biological Chemistry*, 290(9), pp. 5533–5542. doi: 10.1074/jbc.M114.598011.

Rašković, A. *et al.* (2014) ‘Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential’, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), p. 225. doi: 10.1186/1472-6882-14-225.

Reynaert, H. *et al.* (2002) ‘Hepatic stellate cells: Role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension’, *Gut*. doi: 10.1136/gut.50.4.571.

- Roberts, A. B. (1999) 4.571. signaling from receptors to the nucleus mi*Microbes and Infection*, 1(15), pp. 1265–1273. doi: 10.1016/S1286-4579(99)00258-0.
- Rockey, D. (2003) ‘Vascular mediators in the injured liver’, *Hepatology*, 37(1), pp. 4–12. doi: 10.1053/jhep.2003.50044.
- Rockey, D. C. *et al.* (1992) ‘Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture.’, *Journal of submicroscopic cytology and pathology*.
- Rockey, D. C. (2001a) ‘Cellular pathophysiology of portal hypertension and prospects for management with gene therapy’, *Clinics in Liver Disease*. doi: 10.1016/S1089-3261(05)70195-1.
- Rockey, D. C. (2001b) ‘Hepatic Blood Flow Regulation by Stellate Cells in Normal and Injured Liver’, *Seminars in Liver Disease*, 21(03), pp. 337–350. doi: 10.1055/s-2001-17551.
- Rockey, D. C. (2013) ‘Translating an Understanding of the Pathogenesis of Hepatic Fibrosis to Novel Therapies’, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11(3), pp. 224-231.e5. doi: 10.1016/j.cgh.2013.01.005.
- Rockey, D. C., Du, Q. and Shi, Z. (2019) ‘Smooth Muscle α -Actin Deficiency Leads to Decreased Liver Fibrosis via Impaired Cytoskeletal Signaling in Hepatic Stellate Cells’, *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 189(11), pp. 2209–2220. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.07.019.
- Roderfeld, M. *et al.* (2006) ‘Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice’, *The FASEB Journal*, 20(3), pp. 444–454. doi: 10.1096/fj.05-4828com.
- Rupeshkumar, M., Kavitha, K. and Basu, S. . (2012) ‘Antioxidant and Hepatoprotective Effect of flavanone from *Cardiospermum halicacabum* N. against Acetaminophen induced Hepatotoxicity in Rats’, *Journal of Pharmacy Research*.
- Salazar-Aranda, R. *et al.* (2011) ‘Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico.’, *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2011, p. 536139. doi: 10.1093/ecam/nep127.
- Salem, M. Ben *et al.* (2015) ‘Pharmacological Studies of Artichoke Leaf Extract and Their Health Benefits’, *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), pp. 441–453. doi: 10.1007/s11130-015-0503-8.
- Schuppan, D. *et al.* (2001) ‘Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis.’, *Seminars in liver disease*, 21(3), pp. 351–72. doi: 10.1055/s-2001-17556.
- Scott L. Friedman and Michael J.P. Arthur (2002) ‘Reversing Hepatic Fibrosis’, *Science & Medicine*, 8(4), pp. 194–205. Available at: <https://www.sciandmed.com/sm/journalviewer.aspx?issue=1034&article=500&action=1>
- Seki, E. *et al.* (2007) ‘TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis.’, *Nature medicine*, 13(11), pp. 1324–32. doi: 10.1038/nm1663.
- Shi, Y.-F. *et al.* (2006) ‘Effects of rhDecorin on TGF-beta1 induced human hepatic stellate cells LX-2 activation.’, *Biochimica et biophysica acta*, 1760(11), pp. 1587–95. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.09.012.
- Shi, Z. and Rockey, D. C. (2017) ‘Upregulation of the actin cytoskeleton via myocardin leads to increased expression of type 1 collagen’, *Laboratory Investigation*. Nature Publishing Group, 97(12), pp. 1412–1426. doi: 10.1038/labinvest.2017.96.
- Shin, E. *et al.* (2011) ‘Antifibrotic activity of coumarins from *Cnidium monnieri* fruits in

HSC-T6 hepatic stellate cells.’, *Journal of natural medicines*, 65(2), pp. 370–4. doi: 10.1007/s11418-010-0485-7.

Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P. and Duncan, S. A. (2010) ‘Organogenesis and Development of the Liver’, *Developmental Cell*, 18(2), pp. 175–189. doi: 10.1016/j.devcel.2010.01.011.

Sorrentino, V., Menzies, K. J. and Auwerx, J. (2018) ‘Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease’, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58(1), pp. 353–389. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104908.

Speroni, E. *et al.* (2003) ‘Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints’, *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2–3), pp. 203–211. doi: 10.1016/S0378-8741(03)00076-X.

Stalnikowitz, D. K. and Weissbrod, A. B. (2003) ‘Liver fibrosis and inflammation. A review’, *Annals of Hepatology*, 2(4), pp. 159–163. doi: 10.1016/S1665-2681(19)32127-1.

Sun, Z. *et al.* (2003) ‘Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats.’, *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 9(5), pp. 489–97. doi: 10.1053/jlts.2003.50091.

Suomalainen, A. and Battersby, B. J. (2018) ‘Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(2), pp. 77–92. doi: 10.1038/nrm.2017.66.

Sutton, P. *et al.* (1994) ‘In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi.’, *Infection and immunity*, 62(4), pp. 1192–8. doi: 10.1128/iai.62.4.1192-1198.1994.

Tahashi, Y. (2002) . doi: 10.1128/iai.62.4.1192-1198.1994.1 in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury *prHepatology*, 35(1), pp. 49–61. doi: 10.1053/jhep.2002.30083.

Théret, N. *et al.* (1998) ‘Differential expression and origin of membrane-type 1 and 2 matrix metalloproteinases (MT-MMPS) in association with MMP2 activation in injured human livers’, *American Journal of Pathology*, 153(3), pp. 945–954. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65636-2.

Théret, N. *et al.* (1999a) ‘MMP2 activation by collagen I and concanavalin a in cultured human hepatic stellate cells’, *Hepatology*, 30(2), pp. 462–468. doi: 10.1002/hep.510300236.

Théret, N. *et al.* (1999b) ‘MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells’, *Hepatology*, 30(2), pp. 462–468. doi: 10.1002/hep.510300236.

Thiele, N. D. *et al.* (2017) ‘TIMP-1 is upregulated, but not essential in hepatic fibrogenesis and carcinogenesis in mice’, *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-017-00671-1.

Thuault, S. *et al.* (2008) ‘HMGA2 and Smads Co-regulate SNAIL1 Expression during Induction of Epithelial-to-Mesenchymal Transition’, *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), pp. 33437–33446. doi: 10.1074/jbc.M802016200.

Torres-González, L. *et al.* (2011) ‘Protective effect of four Mexican plants against CCl₄-induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line.’, *Annals of hepatology*, 10(1), pp. 73–9. doi: 10.1016/s1665-2681(19)31590-x.

- Tsai, C.-F. *et al.* (2013) 'The in vivo antioxidant and antifibrotic properties of green tea (*Camellia sinensis*, Theaceae).', *Food chemistry*, 136(3–4), pp. 1337–44. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.063.
- Tsuchida, K.-I. *et al.* (2003a) 'Role of Smad4 on TGF- β -induced extracellular matrix stimulation in mesangial cells.', *Kidney international*, 63(6), pp. 2000–9. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00009.x.
- Tsuchida, K.-I. *et al.* (2003b) 'Role of Smad4 on TGF- β -induced extracellular matrix stimulation in mesangial cells', *Kidney International*, 63(6), pp. 2000–2009. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00009.x.
- Tsuchida, T. and Friedman, S. L. (2017) 'Mechanisms of hepatic stellate cell activation.', *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 14(7), pp. 397–411. doi: 10.1038/nrgastro.2017.38.
- Vyas, S. K. *et al.* (1995) 'Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (Stromelysin) in early primary culture', *Gastroenterology*, 109(3), pp. 889–898. doi: 10.1016/0016-5085(95)90399-2.
- Wah Kheong, C., Nik Mustapha, N. R. and Mahadeva, S. (2017) 'A Randomized Trial of Silymarin for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 15(12), pp. 1940-1949.e8. doi: 10.1016/j.cgh.2017.04.016.
- Wang, H. *et al.* (2011) 'Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) deficiency exacerbates carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in mice: involvement of hepatocyte STAT3 in TIMP-1 production', *Cell & Bioscience*, 1(1), p. 14. doi: 10.1186/2045-3701-1-14.
- Wang, H. Y. *et al.* (2015) 'SRF-miR-29b-MMP2 axis inhibits NSCLC invasion and metastasis', *International Journal of Oncology*, 47(2), pp. 641–649. doi: 10.3892/ijco.2015.3034.
- Wang, Hui *et al.* (2017) 'Digital quantitative analysis of microRNA in single cell based on ligation-dependent polymerase colony (Polony)', *Biosensors and Bioelectronics*, 95, pp. 146–151. doi: 10.1016/j.bios.2017.04.001.
- Waring, P. and Beaver, J. (1996) 'Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines', *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(8), pp. 1311–1316. doi: 10.1016/S0306-3623(96)00083-3.
- Waterhouse, P., Khokha, R. and Denhardt, D. T. (1990) 'Modulation of translation by the 5' leader sequence of the mRNA encoding murine tissue inhibitor of metalloproteinases.', *The Journal of biological chemistry*, 265(10), pp. 5585–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2180930>.
- Weiskirchen, R. *et al.* (2013) 'Genetic characteristics of the human hepatic stellate cell line LX-2.', *PloS one*, 8(10), p. e75692. doi: 10.1371/journal.pone.0075692.
- Wipff, P. J. *et al.* (2007) . J. 75692. doi: 10.1371/journal.pone.00756 TGF- β 1 from the extracellular matrix', *Journal of Cell Biology*, 179(6), pp. 1311–1323. doi: 10.1083/jcb.200704042.
- Wright, M. C. *et al.* (2001) 'Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats', *Gastroenterology*, 121(3), pp. 685–698. doi: 10.1053/gast.2001.27188.
- Wynn, T. A. (2008) 'Cellular and molecular mechanisms of fibrosis.', *The Journal of pathology*, 214(2), pp. 199–210. doi: 10.1002/path.2277.
- Xu, L. *et al.* (2005) 'Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for

analysis of hepatic fibrosis.’, *Gut*, 54(1), pp. 142–51. doi: 10.1136/gut.2004.042127.

Xu, X. *et al.* (2018) pp. 142–51. doi: 10.1136/gut.2004.042127.s and tissue homeostasis: *1Bone Research*, 6(1), p. 2. doi: 10.1038/s41413-017-0005-4.

Xue, R. *et al.* (2019) ‘Mitofusin2, as a protective target in the liver, controls the balance of apoptosis and autophagy in acute-on-chronic liver failure’, *Frontiers in Pharmacology*, 10(MAY), pp. 1–10. doi: 10.3389/fphar.2019.00601.

Yamada, E. *et al.* (2001) ‘TIMP-1 promotes VEGF-induced neovascularization in the retina.’, *Histology and histopathology*, 16(1), pp. 87–97. doi: 10.14670/HH-16.87.

Yang, M.-H. *et al.* (2009) ‘Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma.’, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(5), pp. 1464–74. doi: 10.1002/hep.23221.

Yasukawa, K. *et al.* (2009) ‘Mitofusin 2 Inhibits Mitochondrial Antiviral Signaling’, *Science Signaling*, 2(84), pp. ra47–ra47. doi: 10.1126/scisignal.2000287.

Yoshiji, H. *et al.* (1998) ‘Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression.’, *International journal of cancer*, 75(1), pp. 81–7. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19980105)75:1<81::aid-ijc13>3.0.co;2-g.

Yoshiji, H. *et al.* (2000) ‘Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model.’, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 32(6), pp. 1248–54. doi: 10.1053/jhep.2000.20521.

Yoshiji, H. *et al.* (2002) ‘Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse.’, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(4 Pt 1), pp. 850–60. doi: 10.1053/jhep.2002.35625.

Yoshiji, H. (2002) ‘Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse’, *Hepatology*, 36(4), pp. 850–860. doi: 10.1016/S0270-9139(02)00091-5.

Yu, Q. and Stamenkovic, I. (2000) ‘Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis.’, *Genes & development*, 14(2), pp. 163–76. doi: 10.1101/gad.14.2.163.

Zeng, Y. *et al.* (2016) ‘Repression of Smad4 by miR205 moderates TGF-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cell lines’, *International Journal of Oncology*, 49(2), pp. 700–708. doi: 10.3892/ijo.2016.3547.

Zhang, C.-Y. *et al.* (2016) ‘Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets’, *World Journal of Gastroenterology*, 22(48), p. 10512. doi: 10.3748/wjg.v22.i48.10512.

Zhang, J. *et al.* (2018) . p. 10512. doi: 10.3748/wjg.v22.i48.10512.et TGF- . p. 10512. *npj Systems Biology and Applications*. Springer US, 4(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41540-018-0060-5.

Zhao, C. *et al.* (2006) ‘PPARgamma agonists prevent TGFbeta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells.’, *Biochemical and biophysical research communications*, 350(2), pp. 385–91. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.069.

Zhou, L. *et al.* (2017) pp. 385–91. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.069.naling in human hepatic stellate cells.’, utic targets’, es’, eta and p*Oncotarget*, 8(34), pp. 56267–56280. doi: 10.18632/oncotarget.17453.

Zhu, H. *et al.* (2020) ‘Specific Overexpression of Mitofusin-2 in Hepatic Stellate Cells Ameliorates Liver Fibrosis in Mice Model.’, *Human gene therapy*, 31(1–2), pp. 103–109. doi: 10.1089/hum.2019.153.