

UNIVERSIDAD  
**AUSTRAL**

Facultad de Ciencias Biomédicas

---

**EFECTO TERAPÉUTICO DE LA  
APLICACIÓN DE CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES GENÉTICAMENTE  
MODIFICADAS PARA LA EXPRESIÓN  
DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMIL  
INSULINA-I EN LA FIBROSIS  
HEPÁTICA AVANZADA**

---

Tesis doctoral

Lic. Esteban J. Fiore

Director de tesis: Dr. Jorge Aquino

Co-Director de tesis: Dr. Guillermo Mazzolini

Pilar, Argentina, Marzo de 2016

***No fue magia.***

## Agradecimientos

*Un nuevo objetivo requiere recorrer un nuevo camino. Lo que queda al final de este camino son las personas que acompañaron en ese andar que, muchas veces sin darse cuenta y con gestos mínimos, son de gran ayuda para cumplir este objetivo. Al fin y al cabo, son las personas las que le dan un verdadero sentido a ese objetivo.*

*Antes que nada, quiero agradecer a la Universidad Austral y a la Facultad de Ciencias Biomédicas por concederme el espacio académico para llevar a cabo mi doctorado.*

*Al Dr. Jorge Aquino por su paciencia y predisposición a ayudar siempre en lo que fuese necesario, por las tantas charlas y discusiones experimentales que muchos frutos han dado, por mostrarme su pasión por la ciencia y lo que hace.*

*Al Dr. Guillermo Mazzolini por abrirme las puertas del laboratorio de Terapia Génica, por el constante estímulo para ir hacia adelante, por darle claridad a muchas ideas, por el trato cotidiano y apoyo personal.*

*A todos mis compañeros del laboratorio de Terapia Génica, los que están y los que ya han emigrado. Como muchas veces lo dije; el lindo ambiente de trabajo que hay en el grupo hace que uno cada día vaya a trabajar con ganas.*

*A Mariana (MM, Marian, colito, etc..) por brindarme tu ayuda y amistad desde el primer día en el laboratorio, o mejor dicho, desde el primer viaje en colectivo (que hubiese sido de mi sin esa tormenta de información desde el primer día)! Por los consejos, y hasta predicciones (siempre basadas en la experiencia por supuesto). Sencillamente, una amiga más que me regaló este camino.*

*A Juan (Juancito, cabeza, capocha, etc etc..). Otro amigo más que me regaló este camino. Gracias por ayudarme y enseñarme un montón de cosas desde el primer día (va. un poco más adelante cuando me recataron), por los mates/charlas/charlas experimentales donde también se gestaron buenas ideas. Como usted lo dijo, una dupla de trabajo envidiable de cualquier equipo de fútbol.*

*A Flavia (Flavita, petisa, grandota, etc etc..), completando el equipo de mosqueteros modelo 2010-2013, gracias por tu amistad, por tu predisposición para ayudar siempre, por cuidar los fondos del laboratorio y hasta por hacerme pipetear 198,2999ul del kit de ELISA. Dejaste tu marca!*

*A Estanislao, por tantos cafés y mates de esos primeros tiempos (luego se diluyeron..), por esas esperas de trenes suspendidos que con el tiempo llegamos a comprobar la hipótesis de quién era el responsable y por mostrarme el lado porteño mejor que ningún porteño. Hablando en serio, gracias también por tu ayuda brindada.*

*A Cata, por los consejos y ayuda cada vez que me embarcaba en alguna técnica nueva, y sobre todo, por los viajes a la puerta del Monumental!*

*A Mariana (G), por toda la ayuda y predisposición a resolver problemas “mesenquimologicos”, y por traer el laboratorio un nuevo protocolo de vital importancia para el desarrollo de un doctorado; la fabricación de cerveza.*

*A Laura Alaniz por la buena predisposición para ayudar siempre que fuese necesario, a Miguel Rizzo por su colaboración en este camino, por los mates y charlas futboleras y por tantas salvadas de última hora en el laboratorio.*

*A Marcelo, Sofí y Agos, flamantes nuevas incorporaciones del grupo, por traer nuevas energías, nuevas formas de hacer un mate (difícil que no se vuelque), por hacer el aguante de onda en altas horas de la tarde, por los viajes y charlas de rodillas lesionadas, etc etc. También gracias por sus colaboraciones en este último tiempo.*

*A todos los compañeros y compañeras del área de investigación del 5to piso, por los mates mañaneros, los momentos compartidos y por la predisposición para ayudar. A Guille por estar siempre dispuesto a escuchar y dar una mano, por tantas charlas de la vida misma y viajes compartidos. A Rodri por la buena onda de todos los días, por bioterios “redondos” y tantas frases célebres. A Norma por estar dispuesta a sacar OCexpress en cualquier momento. A Emi “sensei” Lopez, por la buena energía de los ratos compartidos. A Gustavo “cuervo” Ortiz por tantas charlas futboleras y politiqueras. A Romina Sierra, por ayudarme en esta última etapa con el bioterio.*

*También quiero agradecerle a toda mi familia ceresina que siempre me apoyó, que está siempre dispuesta a ayudarme en lo que fuera, por ser mi “cuna” de donde una saca sus más profundos aprendizajes. Especialmente a mi Mama, por su cariño y ejemplo de vida, de madre y amor por sus hijos y nietos. Y a mi Papá, por enseñarme con el ejemplo a ser una buena persona y un buen padre y porque no tengo dudas que desde donde se encuentra no deja de interceder por nosotros.*

*Finalmente quiero agradecer a Jaque por todo el apoyo y compañía en todo este camino recorrido (y más), por regalarnos dos personitas que cambiaron nuestra vida para siempre, Brune y Benja, porque uno ahora ve a través de sus ojos y a través de ello todo objetivo o meta cobra realmente sentido.*

# **EFFECTO TERAPÉUTICO DE LA APLICACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES GENÉTICAMENTE MODIFICADAS PARA LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMIL INSULINA-I EN LA FIBROSIS HEPÁTICA AVANZADA**

## **RESUMEN**

La cirrosis es la causa número uno de trasplante hepático, siendo éste el único tratamiento médico curativo en la actualidad. La cirrosis hepática se origina en diferentes estímulos (alcohol, virus de hepatitis B o C, autoinmunidad, alteraciones metabólicas, etc.), a través de un proceso crónico caracterizado por ciclos repetidos de necrosis de hepatocitos, inflamación y cicatrización. Ello resulta en la excesiva acumulación de componentes de la matriz extracelular, con abundancia de colágeno-I fibrilar. En la mayor parte de los casos y modelos de fibrosis/cirrosis hepática las células estrelladas hepáticas (CEHs) son el principal componente celular involucrado en la generación de fibrosis hepática. Estas células, normalmente en estado quiescente, pueden activarse durante el daño hepático y secretar una serie de citoquinas y factores de crecimiento, entre ellos PDGF y TGF- $\beta$ , con conocido efecto profibrogénico. Asimismo, los macrófagos hepáticos cumplen también un rol preponderante en la fibrogenesis hepática ya que secretan factores, como TNF $\alpha$  e IL1b, entre otros, que estimulan las CEHs, activándolas y favoreciendo al desarrollo de la patología. Sin embargo, nuevas evidencias sugieren que los macrófagos, tanto residentes (células de Kupffer) como infiltrantes, en ciertas condiciones podrían participar en la resolución de la fibrosis hepática. Las células madre mesenquimales (MSCs) son progenitores, altamente expandibles y fácilmente transducibles y/o transfectables *in vitro*, con posibilidad de ser aislados del adulto y de migrar hacia sitios de injuria y remodelación. Además, se las considera inmunoprivilegiadas por carecer de inmunogenicidad, al ser transplantadas de forma alogénica, y por presentar propiedades inmunomoduladoras. En conjunto, estas características particulares harían de las MSCs una herramienta promisoría en estrategias de

reparación/regeneración tisular y como vehículo de genes terapéuticos. En relación con genes candidatos que podrían ser expresados exógenamente por las MSCs en estrategias que combinen terapia celular y génica, en la cirrosis hepática se detecta una disminución importante en los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I). Este fenómeno explicaría algunas de las alteraciones asociadas con esta patología. El objetivo de esta tesis doctoral fue evaluar el potencial terapéutico de las MSCs modificadas genéticamente mediante un vector adenoviral para sobreexpresar IGF-I en la fibrosis hepática establecida y los mecanismos por los cuales éstas podrían ejercer su efecto. Se lograron establecer y caracterizar cultivos de MSCs modificados genéticamente mediante un adenovirus recombinante para expresar esa proteína o la proteína verde fluorescente (GFP; control). Al ser administradas por vía sistémica, tanto las MSCs modificadas genéticamente para expresar IGF-I (AdIGF-I-MSCs) como aquellas con el transgen para GFP (AdGFP-MSCs; control), fueron reclutadas preferencialmente en el hígado. La aplicación sistémica de una única dosis de AdIGF-I-MSCs redujo el grado de fibrosis hepática en un grado superior al producido por las AdGFP-MSCs. Asimismo, se demostró que este efecto se debería en gran medida a la reducción de la activación de las CEHs, a un cambio en la funcionalidad de los macrófagos hepáticos y a la inducción de regeneración hepática, en posible relación con un efecto hepatoprotector. Varios de estos mecanismos se desencadenarían durante las primeras 24 horas posteriores a la administración de las MSCs e involucran un aumento en el tejido hepático de la expresión de IGF-I y HGF, los que a su vez inhibirían la expresión de TGF- $\beta$ 1 en CEHs y por consiguiente su grado de activación, a partir del tercer día post-tratamiento. Asimismo, también al día siguiente al haber aplicado las MSCs, se vio modulada la actividad biológica de los macrófagos hepáticos. En concreto, se notaron cambios en la expresión de citoquinas pro/anti-fibrogénicas y de mediadores de la generación de óxido nítrico (TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS, Arginasa-1), y un aumento en la expresión de factores regenerativos (IGF-I y HGF) por parte de los mismos macrófagos. Además, factores

secretados por los macrófagos hepáticos, preincubados con el sobrenadante de MSCs, indujeron una reducción en el grado de activación de las CEHs. Conjuntamente, estos mecanismos son mediados, al menos en parte, por factores solubles como IGF-I y HGF liberados por las MSCs y probablemente también por hepatocitos y por macrófagos. Asimismo, el perfil de expresión génica del tejido hepático al día posterior al tratamiento con AdIGF-I-MSCs es consistente con un aumento en la proliferación de hepatocitos, e involucraría mecanismos de reparación del ADN, en comparación con los grupos control. Finalmente, la aplicación de múltiples dosis de las AdIGF-I-MSCs resultó en un efecto terapéutico superior al de una única dosis. Estos resultados indican que una combinación de terapia celular y génica y la aplicación de dosis múltiples de las MSCs genéticamente modificadas para sobreexpresar IGF-I podrían representar una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de la cirrosis hepática.

Los resultados de la presente tesis se encuentran incluidos en los siguientes artículos:

**Mesenchymal stromal cells engineered to produce IGF-I by recombinant adenovirus ameliorate liver fibrosis in mice.** Fiore EJ, Bayo JM, Garcia MG, Malvicini M, Lloyd R, Piccioni F, Rizzo M, Peixoto E, Sola MB, Atorrasagasti C, Alaniz L, Camilletti MA, Enguita M, Prieto J, Aquino JB, Mazzolini G. *Stem Cells Dev.* 2015 Mar 15;24(6):791-801

**Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Liver Fibrosis: Recent Findings, Old/New Caveats and Future Perspectives.** Fiore EJ, Mazzolini G, Aquino JB. *Stem Cell Rev.* 2015 Aug;11(4):586-97.

Aportes realizados en el transcurso del desarrollo de la presente tesis en temas de trabajos relacionados:

**Autocrine motility factor (AMF) increases migration of human mesenchymal stromal cells towards hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo.** Bayo J\*, **Fiore E\***, Aquino JB, Malvicini M, Rizzo M, Peixoto E, Andriani O, Alaniz L, Piccioni F, Bolontrade M, Podhajcer O, Garcia MG, Mazzolini G. *PLoS One.* 2014 Apr 15;9(4):e95171.

**Human umbilical cord perivascular cells exhibited enhanced migration capacity towards hepatocellular carcinoma in comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells: a role for autocrine motility factor receptor.** Bayo J, **Fiore E**, Aquino JB, Malvicini M, Rizzo M, Peixoto E, Alaniz L, Piccioni F, Bolontrade M, Podhajcer O, Garcia MG, Mazzolini G. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:837420.



## Abreviaturas empleadas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ANG:	Angiogenina
ANOVA:	Análisis de varianza
ARN:	Ácido ribonucleico
BSA:	Seroalbumina bovina
CEHs:	Células estrelladas hepáticas
CSF-1:	Factor estimulante de colonias de macrófagos
CTGF:	Factor de crecimiento de tejido conectivo
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DCs:	Células dendríticas
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
EGF:	Factor de crecimiento del endotelio
FGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos
G-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HBSS:	Solución salina equilibrada de Hank
HCC:	Hepatocarcinoma
HGF:	Factor de crecimiento de hepatocitos
HVB:	Virus de la hepatitis B
HVC:	Virus de la hepatitis C
I.P.:	Intraperitoneal
I.V.:	Intravenoso
IDO:	Indoleamino 2,3-dioxigenasa
IFN- $\beta$ :	Interferon $\beta$
IGF-I:	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IGFBP:	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina
IL-12:	Interleuquina 12
IL-1b:	Interleuquina 1b
IL-2:	Interleuquina 2
IL-4:	Interleuquina 4
IL-6:	Interleuquina 6
IL-8:	Interleuquina 8
ISCT:	Sociedad Internacional de Terapia Celular
ITS:	Insulina, transferrina y selenito

M-CFS:	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MCP-1:	Proteína quimioattractante de monocitos
MEC:	Matriz extracelular
MMP-2:	Metaloproteinasa de la matriz 2
MMP-3:	Metaloproteinasa de la matriz 3
MMP-8:	Metaloproteinasa de la matriz 8
MMP-9:	Metaloproteinasa de la matriz 9
MMP-13:	Metaloproteinasa de la matriz 13
MMPs:	Metaloproteinasas de la matriz
MSCs:	Células estromales mesenquimales
MSCs-MO:	MSCs derivadas de médula ósea
NK:	Células asesinas naturales
PBS:	Buffer fosfato salino
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEDF:	Factor derivado del epitelio pigmentario
qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa
ROI:	Región de interés
SDF-1:	Factor derivado de las células del estroma 1
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SFB:	Suero fetal bovino
TAA:	Tioacetamida
TBS:	Solución buffer Tris-salino
TGF $\beta$ -1:	Factor transformador del crecimiento $\beta$ 1
TIMPs:	Enzimas inhibidoras de las MMPs
TNF- $\alpha$ :	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TRAIL:	Ligando inductor de apoptosis relacionada con el TNF
Treg:	Linfocitos T reguladores
uPA:	Activador del plasminógeno de tipo urokinasa
VCAM-1:	Molécula de adhesión de células vasculares
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular

## ***Índice***

---

---

## Índice

1	Introducción .....	1
1.1	El Hígado.....	1
1.1.1	Anatomía .....	1
1.1.2	Microarquitectura .....	2
1.1.3	Resumen de la fisiología hepática.....	5
1.2	Fibrosis y cirrosis hepática .....	7
1.2.1	Fibrosis hepática .....	7
1.2.2	Mecanismos celulares y moleculares de la fibrogénesis hepática .....	9
1.2.3	Célula estrellada hepática, principal responsable de la fibrogénesis hepática	13
1.2.4	Rol de los macrófagos en la progresión y resolución de la fibrosis hepática	19
1.2.5	Cirrosis .....	22
1.2.6	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 y cirrosis .....	23
1.2.7	Tratamiento de la fibrosis y cirrosis hepática .....	26
1.2.8	Modelos animales de fibrosis hepática .....	27
1.3	Células madre mesenquimales.....	28
1.3.1	Reseña histórica.....	29
1.3.2	Caracterización .....	29
1.3.3	Fuentes y origen de las MSCs .....	30
1.3.4	Funciones fisiológicas de las MSCs.....	32
1.3.5	Características inmunomoduladoras de las MSCs .....	34
1.3.6	Capacidad migratoria de las MSCs hacia sitios de injuria e inflamación	36
1.3.7	Uso de las MSCs en el tratamiento de la fibrosis hepática .....	38
1.4	Terapia génica y MSCs .....	38
1.4.1	Vectores .....	39
1.4.2	Terapia génica aplicada a la fibrosis hepática.....	42
1.4.3	MSCs como vehículo de genes terapéuticos .....	43
1.5	Hipótesis .....	46
1.6	Objetivos Generales.....	47
1.7	Objetivos Específicos .....	47

---

2	Materiales y Métodos .....	49
2.1	Líneas celulares.....	49
2.2	Producción de vectores adenovirales .....	50
2.2.1	Preparación del stock y purificación de los vectores adenovirales .....	50
2.2.2	Titulación de stock adenoviral .....	51
2.3	Cultivo primario de MSCs de médula ósea de ratón .....	52
2.4	Caracterización de MSCs de médula ósea de ratón .....	53
2.5	Transducción de MCS con adenovirus .....	54
2.5.1	Puesta a punto.....	54
2.5.2	Preparación de las MSCs modificadas genéticamente para experimentos in vivo	55
2.5.3	Preparación de medios condicionados de las MSCs para ensayos in vitro	55
2.6	Efecto de la infección con adenovirus sobre las propiedades inmunológicas de las MSCs .....	55
2.6.1	Caracterización fenotípica de MSCs infectadas con adenovirus .....	55
2.6.2	Ensayo de Cultivo Mixto Linfocitario (MLR) .....	56
2.6.3	Determinación de anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus.....	56
2.7	Experimentos <i>in vitro</i> .....	57
2.7.1	Efecto sobre las CEHs .....	57
2.7.2	Efecto sobre hepatocitos.....	58
2.8	Efecto terapéutico de las MSCs transducidas con adenovirus sobre la fibrosis hepática.....	58
2.8.1	Animales .....	58
2.8.2	Modelo de inducción de fibrosis con TAA .....	59
2.8.3	Comparación del efecto terapéutico de las AdIGF-MSCs contra IGF-I recombinante.....	59
2.8.4	Modelo de inducción de fibrosis por ligadura del conducto colédoco....	60
2.9	Efecto de las MSCs transducidas con adenovirus sobre la actividad biológica de los macrófagos hepáticos .....	60
2.9.1	Experimentos <i>in vitro</i> .....	60
2.9.2	Experimentos <i>in vivo</i> .....	63
2.10	Ensayo de migración <i>in vivo</i> .....	65
2.11	Tinciones histológicas.....	66

---

2.12	Ensayos de inmunohistoquímica .....	68
2.13	Análisis de la expresión de ARNm .....	69
2.13.1	Extracción a ARN total .....	69
2.13.2	Síntesis de ADNc a partir de ARN total.....	69
2.13.3	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) .....	70
2.14	Microarreglo de PCR .....	71
2.15	Análisis Estadístico .....	72
3	Resultados.....	75
3.1	Cultivo y caracterización de las MSCs de médula ósea.....	75
3.2	Transducción de las MSCs con AdIGF-I y AdGFP .....	77
3.3	Efecto de la infección sobre la inmunogenicidad de las MSCs.....	78
3.4	Efecto terapéutico de las AdIGF-MSCs sobre la fibrosis hepática.....	81
3.5	Efecto terapéutico de las AdIGF-I-MSCs sobre la fibrosis en el modelo de ligadura del conducto colédoco .....	88
3.6	Efecto de las AdIGF-MSCs sobre las células estrelladas hepáticas .....	90
3.7	Biodistribución de las MSCs en el modelo de fibrosis hepática por aplicación de tioacetamida.....	92
3.8	Eventos tempranos luego del tratamiento con MSCs en el modelo de fibrosis hepática por aplicación de tioacetamida .....	95
3.9	Efecto de las AdIGF-MSCs sobre el cultivo primario de hepatocitos.....	98
3.10	Efecto de la transducción de las MSCs con el AdIGF en el perfil de expresión de genes pro-regenerativos .....	99
3.11	Inducción de la proliferación celular debida a la aplicación de MSCs .....	100
3.12	Incidencia de macrófagos hepáticos luego del tratamiento con AdIGF-I-MSCs	101
3.13	Modulación de la actividad biológica de los macrófagos hepáticos por las MSCs	103
3.14	Factores producidos por las MSCs en la modulación de la actividad biológica de los macrófagos hepáticos .....	106
3.15	Producción de factores de crecimientos de los macrófagos hepáticos modulados por las MSCs .....	108
3.16	Efecto de los macrófagos hepáticos pre-condicionados con sobrenadantes de MSCs transducidas con adenovirus sobre CEHs.....	110
3.17	Efecto de la depleción de macrófagos sobre la acción terapéutica de las AdIGF-I-MSCs .....	111

3.18	Mecanismos involucrados en la regeneración hepática inducida por el tratamiento con las MSCs .....	113
3.19	Efecto terapéutico de la aplicación de múltiples dosis MSCs .....	116
4	Discusión .....	119
5	Conclusiones .....	141
6	Bibliografía.....	145

## ***Introducción***

---



# 1 Introducción

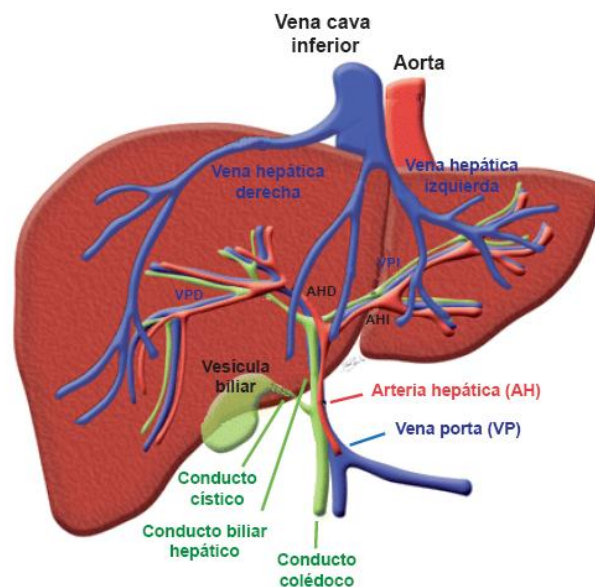
## 1.1 El Hígado

### 1.1.1 Anatomía

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo humano y cumple funciones metabólicas críticas, por lo que ha sido considerada como el “cerebro fisiológico” del organismo. Está ubicado en la parte superior del abdomen debajo del diafragma y por encima del estómago, riñón derecho e intestino delgado. Anatómicamente se encuentra dividido por el ligamento falciforme en dos lóbulos principales y dos lóbulos más pequeños, el cuadrado y el caudado, ubicados hacia la parte dorsal. Además, el hígado se encuentra rodeado por una fina capa de tejido conectivo fibroso, llamada cápsula de Glisson. Asimismo, la vesícula biliar, de aspecto piriforme, está situada en la cara inferior del lóbulo hepático derecho (Tortora and Derrickson, 2013).

El sistema de circulación sanguínea del hígado es de naturaleza centripeta (**Figura 1**). Entre el 65-85% de la irrigación parenquimática hepática proviene de la vena porta que drena la sangre desde el tracto intestinal, más pobre en oxígeno y rica en compuestos absorbidos después de la digestión. La sangre oxigenada proviene de la circulación general a través de la arteria hepática, rama del tronco celíaco. En los llamados espacios porta, zonas del hígado situadas por fuera de los lobulillos clásicos hepáticos, se encuentran una rama de la vena porta-hepática y otra de la arteria hepática. Estos lobulillos son las unidades anatómicas y funcionales del hígado y están formados por cordones de hepatocitos separados por sinusoides hepáticos, los que vierten su contenido en una vena centrolobulillar. De este modo, luego de haber estado en contacto con hepatocitos, la sangre llega a las venas centrolobulillares, que drenan en las venas hepáticas y éstas lo hacen a su vez en la vena cava inferior (Porth, 2009). Entre otras funciones, los hepatocitos producen sales biliares. Estas

sales, junto con colesterol, lecitina, iones bicarbonato, los pigmentos biliares y agua, forman la bilis. La bilis es conducida dentro de canalículos biliares formados y limitados por las paredes de hepatocitos adyacentes. Dichos canalículos se continúan en conductillos recubiertos de células epiteliales llamadas colangiocitos. Éstos confluyen en los conductos biliares situados en los espacios porta, los que se unen formando un único conducto. A la vía biliar extrahepática se une el conducto cístico, que proviene de la vesícula biliar, y ambos forman el conducto colédoco que desemboca en el duodeno (Theise et al., 1999) (**Figura 1**).

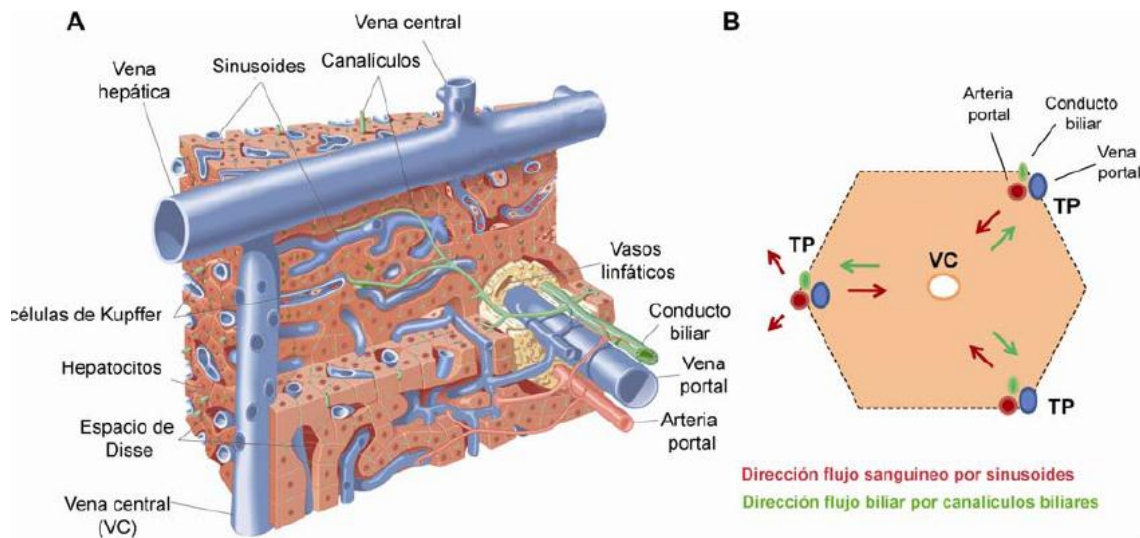


**Figura 1.** Adaptado de *Vascular and Biliary Variants in the Liver: Implications for Liver Surgery* (Catalano et al., 2008). VPD, vena porta derecha; VPI, vena porta izquierda; AHD, arteria hepática derecha; AHI, arteria hepática izquierda.

### 1.1.2 Microarquitectura

Como se mencionó anteriormente, puede considerarse al hígado como constituido por unidades o lobulillos clásicos, de 1 a 2 mm de diámetro, organizados alrededor de una vena central (vena centrolobulillar). Estos lobulillos, de forma hexagonal, poseen espacios porta en sus vértices, los que incluyen una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conducto biliar, rodeados de tejido

conjuntivo (**Figura 2**) y donde también se encuentran componentes celulares como los fibroblastos hepáticos, entre otros.



**Figura 2.** Anatomía y microarquitectura hepática. A) Representación estructural del tejido hepático. B) Modelo de la unidad estructural hepática, el lobulillo hepático. Las flechas rojas indican el flujo sanguíneo que circula por los sinusoides desde la zona portal hasta la vena central. Las flechas verdes muestran la circulación de la bilis desde los hepatocitos que la producen hasta los conductos biliares. TP: tracto portal, VC: vena central, DB: ducto biliar. Adaptado de Wallace et al, 2008(Wallace et al., 2008).

El parénquima hepático comprendido entre las triadas portales y la vena central está conformado principalmente por células hepáticas o hepatocitos organizados en forma de cordones o fascículos orientados radialmente hacia una vena centrolobulillar. En los sinusoides hepáticos se mezcla sangre oxigenada, provista por la arteria hepática, con sangre venosa, procedente de la vena porta, la que luego fluye hacia la vena centrolobulillar. De esta manera, los hepatocitos que llevan a cabo la mayoría de las funciones biosintéticas y metabólicas del hígado, quedan expuestos a la sangre que circula por los sinusoides a fin de incorporar y eliminar sustancias de la circulación. Los sinusoides hepáticos se encuentran revestidos por células endoteliales sinusoidales fenestradas, que presentan una membrana basal discontinua, y limitan un espacio denominado espacio de Disse (Poli, 2000). Dentro de este espacio extrasinusoidal hacia el que se proyectan abundantes microvellosidades hepatocitarias

y que contiene fibras reticulares, de colágeno III, se encuentran las células estrelladas hepáticas (CEHs) o células de Ito, de origen mesodérmico. Las CEHs constituyen un 5–8 % de la población celular del hígado, poseen depósitos de lípidos e intervienen en el almacenamiento y metabolismo de la vitamina A. En caso de inflamación hepática persistente, las CEHs se diferencian en miofibroblastos hepáticos cumpliendo una función clave en el proceso fibrogénico hepático (Bataller and Brenner, 2005; Friedman, 2008). Formando parte de la capa endotelial de los sinusoides hepáticos se encuentran las células de Kupffer o macrófagos residentes, de origen monocítico. Estas células cumplen una función importante en la remoción de células envejecidas y de metales pesados circulantes y en caso de injuria hepática participan en los mecanismos inflamatorios relacionados con el proceso fibrogénico (Lee et al., 2015b).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, dentro de los lobulillos hepáticos se encuentran los canalículos biliares por los cuales drena la bilis producida por los hepatocitos. Los canalículos biliares son estrechos conductos, de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, ubicados entre hepatocitos contiguos que conforman la pared del canalículo, limitados por uniones oclusivas entre las células hepáticas que impiden el pasaje de la bilis hacia el espacio intercelular vecino. A través de estos canales fluye la bilis hacia la periferia del lobulillo donde la luz del conducto es recubierta por colangiocitos, los que representan alrededor del 1% de las células del parénquima hepático (Porth, 2009).

Finalmente, se estima que el hígado contiene alrededor de  $10 \times 10^{10}$  linfocitos de diferentes fenotipos localizados a lo largo de los sinusoides y tractos portales. Estos incluyen células T, NK (“natural killer” o asesinas naturales) y células dendríticas (CD) (Mazzolini et al., 2012).

### 1.1.3 Resumen de la fisiología hepática

En el hígado ocurren una serie de importantes procesos metabólicos, digestivos, hemostáticos, inmunológicos y de reservorio, que son vitales para el organismo (Tortora and Derrickson, 2013).

**Funciones vasculares.** El gran tamaño e irrigación del hígado le permiten actuar como reservorio de sangre del organismo, capaz de almacenar el 10% del volumen total de la sangre. De este modo, cuando la volemia es excesiva el hígado tiene la capacidad de captar sangre; por el contrario, ante una disminución de la volemia puede suplir de sangre al resto del organismo. Por otra parte, las células de Kupffer fagocitan parásitos, virus, bacterias y macromoléculas (como inmunocomplejos y endotoxinas bacterianas), por endocitosis mediada por receptores. Por lo tanto, estas células constituyen una poderosa e importante barrera fagocítica para toxinas y microorganismos provenientes del intestino.

**Secreción Biliar.** Una de las funciones hepáticas es la síntesis y secreción de la bilis, principal vía de secreción de la bilirrubina, colesterol y ciertos productos del metabolismo orgánico. Por otra parte, la presencia de sales biliares permite la digestión de las grasas así como su absorción a nivel del duodeno.

**Funciones metabólicas.** El hígado cumple un rol importante en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, el que es llevado a cabo principalmente por hepatocitos.

Metabolismo de carbohidratos. El hígado es el principal responsable de la homeostasia de los hidratos de carbono. Cuando la concentración de glucosa en sangre se incrementa, el hígado normaliza la glucemia por la vía de la síntesis de glucógeno, glicólisis y lipogénesis. Cuando se produce un déficit de glucosa en sangre, el hígado la libera/aumenta por la vía de la glucogenólisis y gluconeogénesis.

Metabolismo proteico. Tras la alimentación, el hígado capta aminoácidos de la circulación portal, que mediante la transaminación son recompuestos en proteínas estructurales y plasmáticas. Asimismo, es capaz de llevar a cabo la deaminación de los aminoácidos a fin de utilizar las proteínas como fuentes de energía. Por otra parte también es encargado de sintetizar la urea a fin de eliminar el amoniaco generado tanto en los riñones como el secretado por las bacterias intestinales.

Metabolismo de los lípidos. Aunque el metabolismo de las grasas tiene lugar en casi todas las células, algunas de sus etapas se producen con mayor rapidez en las células hepáticas. Las funciones específicas del hígado en el metabolismo de los lípidos son las siguientes (Tortora and Derrickson, 2013).

1. Un porcentaje elevado de beta-oxidación de ácidos grasos y formación de ácido acetoacético.
2. Formación de lipoproteínas.
3. Metabolismo del colesterol y fosfolípidos.
4. Almacenamiento de vitaminas, en particular de vitamina A.

**Funciones fagocitarias del hígado.** Como se mencionó anteriormente, las células de Kupffer constituyen una poderosa e importante barrera fagocítica para toxinas y microorganismos provenientes del intestino, de modo que cuando se pierde esta función, como ocurre en pacientes con cirrosis, se generan episodios de endotoxemia. La activación de las células de Kupffer resulta en un incremento de la producción de citoquinas cuyas señales actúan sobre otros tipos de células hepáticas. Las células de Kupffer tienen un importante papel en el procesamiento de antígenos durante la infección y la inflamación, iniciando la inmunidad mediada por células B y T.

## **1.2 Fibrosis y cirrosis hepática**

La cirrosis es el estadio final de la fibrosis hepática y es la causa número uno de trasplante hepático (Bataller and Brenner, 2005). En Argentina, éste es un problema importante de salud pública y se encuentra, junto a otras enfermedades crónicas del hígado, entre las 10 primeras causas de muerte (fuente Ministerio de Salud, año 2010; <http://www.deis.gov.ar>). No existe actualmente un tratamiento médico eficaz para esta enfermedad a excepción del trasplante hepático (Bataller and Brenner, 2005; Friedman, 2008; Schuppan and Kim, 2013), para el que escasean los donantes y cuyo costo es muy elevado. Sin embargo, a partir del mayor conocimiento generado en los últimos años en relación con los mecanismos celulares y moleculares de la fibrogénesis hepática se demostró que la fibrosis, e incluso la cirrosis en determinados casos, pueden revertirse (Lee et al., 2015b). Estos conocimientos llevaron a numerosos estudios con el fin de encontrar nuevas opciones terapéuticas pero, debido a la complejidad de las múltiples vías fisiopatológicas involucradas, los mismos han tenido una eficacia limitada (Mallat and Lotersztajn, 2013). Una de las más graves y frecuentes complicaciones de la cirrosis hepática es el carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma (HCC). El HCC es el quinto tumor más frecuente y la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo, y su incidencia y mortalidad se encuentran en aumento. El HCC asienta en cerca del 90% de los casos sobre hígados cirróticos (El-Serag and Rudolph, 2007).

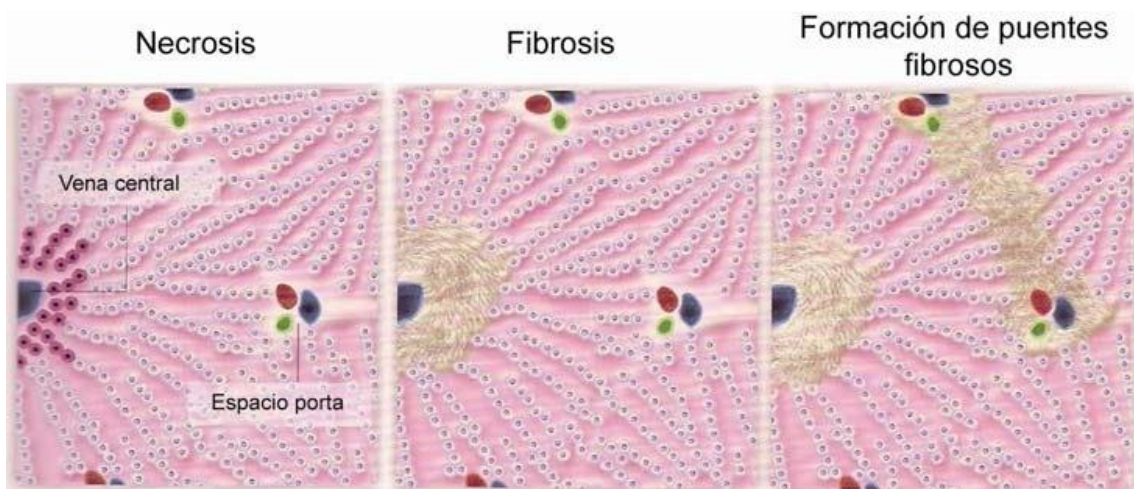
### **1.2.1 Fibrosis hepática**

La fibrosis hepática es un proceso dinámico que resulta de un desbalance entre la producción y degradación de matriz extracelular en respuesta a una agresión crónica sobre el hígado (Elpek, 2014; Lee et al., 2015b). Entre los agentes etiológicos más comunes se encuentran la infección crónica por los virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o la ingesta crónica de alcohol (Pinzani et al., 2011). Otras etiologías menos

frecuentes corresponden a enfermedades autoinmunes, enfermedades metabólicas, toxicidad por drogas, enfermedades colestásicas, hígado graso no alcohólico (HGNA) y esteatohepatitis no alcohólica (Friedman, 2003), entre otras. La fibrosis hepática se caracteriza por una excesiva acumulación de matriz extracelular (MEC) en el parénquima hepático, que en casos normales y no-crónicos es compensada por los mecanismos de fibrinólisis, que degradan esta matriz (Teixeira-Clerc et al., 2006). La fibrogénesis es un mecanismo fisiológico del tipo de la cicatrización, que busca reparar un daño tisular; sin embargo, si el agente causante del estímulo de la inflamación persiste, el desbalance entre la producción de MEC y la capacidad tisular de degradarlo conlleva a su acumulación excesiva (Pinzani and Rombouts, 2004). Este proceso de regeneración continuo conduce a una lenta alteración de la arquitectura hepática, por lo que la fibrosis hepática es un proceso previo y necesario para el desarrollo de la cirrosis (**Figura 3**). Desde un punto de vista histológico, la fibrosis se caracteriza por un aumento de los depósitos de MEC, y modificación de la composición natural de la misma. En el tejido conjuntivo, la MEC está formada principalmente por colágenos de tipo I, III, IV, V, VII, y por componentes de tipo no colágeno como glicoproteínas (fibronectina, laminina, entre otras), proteoglicanos sulfatados y carbohidratos. Al desarrollarse la fibrosis, existe un cambio de una matriz de baja densidad formada principalmente por colágeno tipo III, IV, V y VII, a una de alta densidad formada principalmente por colágenos de tipo I y III (Gressner and Weiskirchen, 2006; Weiskirchen and Tacke, 2014). El patrón de acumulación de MEC depende de la etiología del daño. Así, en la enfermedad hepática alcohólica la fibrosis se desarrolla principalmente en la zona del sinusoides hepático y perivenular central; en la esteatohepatitis no alcohólica o por infección con virus de la hepatitis C (HVC), en la zona de la vena central, y en la cirrosis de origen en vías biliares en la zona periportal (Wu et al., 2005). Finalmente, este aumento de MEC modifica el endotelio fenestrado de los sinusoides deteriorando el paso de nutrientes a través del mismo hacia el



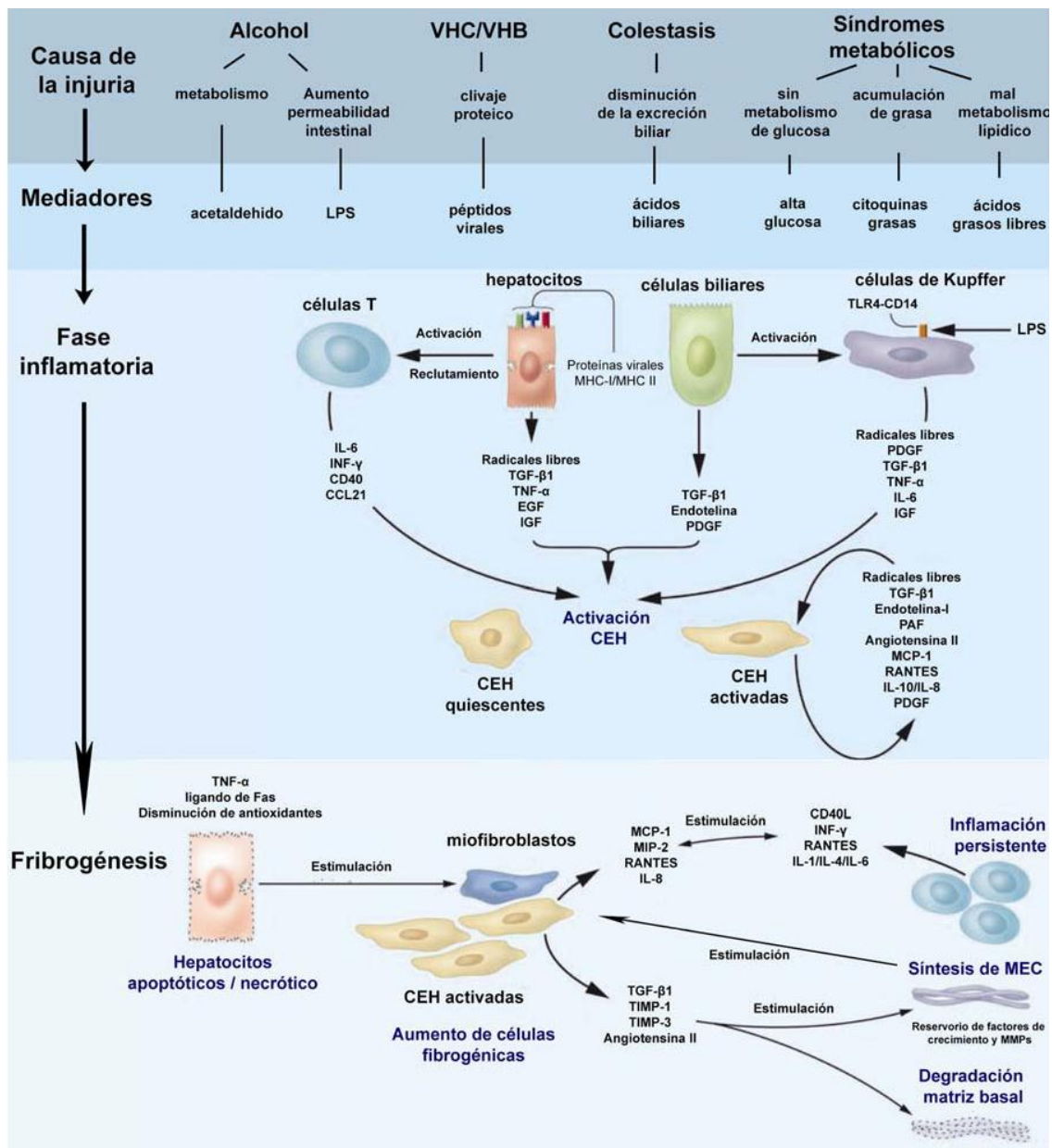
parénquima hepático lo que contribuye, junto con señales que promueven la apoptosis, a la muerte de los hepatocitos, lo cual genera un estímulo continuo para la fibrogénesis y la regeneración hepática (Friedman, 2003; Mallat and Lotersztajn, 2013). Más aún, la necrosis y apoptosis de los hepatocitos inducen también el reclutamiento de células inflamatorias, otro evento crucial para el desarrollo de la fibrosis (Lee et al., 2015b).



**Figura 3. Desarrollo de la fibrosis hepática.** Esquema secuencial del daño en la región pericentral. Necrosis de los hepatocitos (violeta), depósitos de matriz extracelular que conducen a una distorsión de la arquitectura hepática y a la formación de cicatriz (amarillo), formación de septos o puentes fibrosos. Adaptado de Atlas de cirrosis y cáncer hepático, fascículo 3, Bristol&MyersSquib.

### 1.2.2 Mecanismos celulares y moleculares de la fibrogénesis hepática

Ante el daño generado por diferentes agentes nocivos del hígado y la consecuente muerte de hepatocitos, a nivel celular se inicia una cascada inflamatoria que concluye con la activación de las CEHs (**Figura 4**). En condiciones fisiológicas, estas células representan entre el 5 y el 8% del total de las células del parénquima hepático (Geerts, 2001) y residen en los espacios de Disse. Mientras se encuentran en estado quiescente funcionan como reservorios de vitamina A y retinoides. Además, son encargadas de regular el recambio de la MEC así como de secretar citoquinas que mantienen la homeostasis de la misma (Iwaisako et al., 2014). Se caracterizan por presentar largas extensiones citoplasmáticas que rodean los sinusoides, por lo que



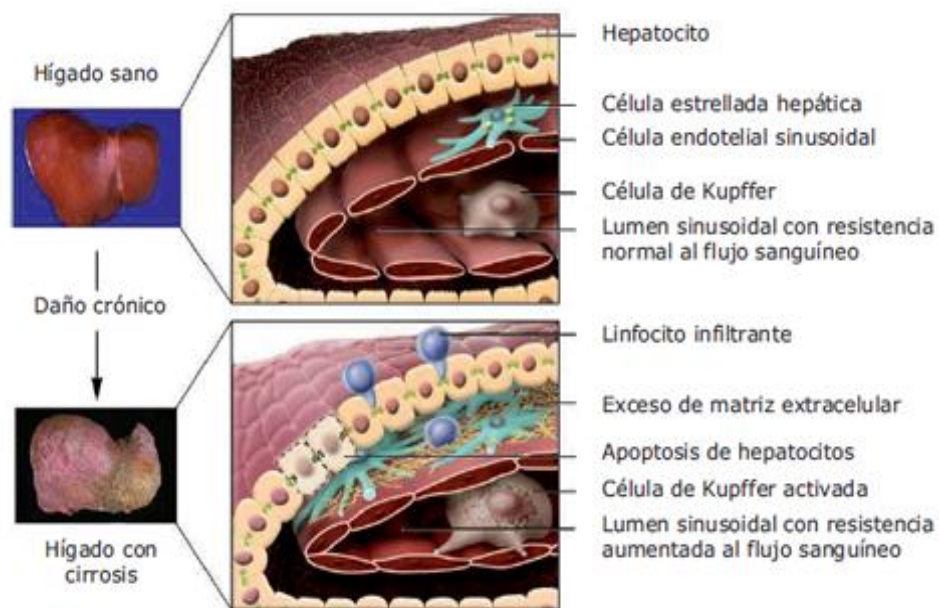
**Figura 4.** Esquema de activación de las células estrelladas hepáticas (CEHs) debido a la acción de diferentes agentes hepatotóxicos. La liberación de factores y citoquinas por el epitelio biliar y los hepatocitos dañados activan a las células de Kupffer y reclutan linfocitos generando un microambiente inflamatorio que conlleva a la activación de las CEHs. Asimismo, las CEHs de manera autocrina y paracrina mantienen su activación aumentando la cantidad de células profibrogénicas (Extraído y modificado de (Bataller and Brenner, 2005)).

participan de la regulación del flujo sanguíneo hepático, especialmente cuando se encuentran activadas y contraídas contribuyendo a la generación de hipertensión portal, una complicación muy frecuente de la cirrosis (**Figura 5**). Ante la presencia de daño o necrosis hepatocelular se liberan especies reactivas de oxígeno así como

mediadores proinflamatorios y profibrogénicos (Lee et al., 2015b). De este modo, células inflamatorias procedentes del torrente sanguíneo son reclutadas en el sitio de injuria que amplifican el estímulo profibrogénico y se activan, además, las células de Kupffer presentes en los sinusoides hepáticos. En conjunto, la respuesta inflamatoria desencadenada conlleva a la activación de las CEHs con una alta capacidad de producción de MEC en respuesta a citoquinas como por ejemplo el factor transformador del crecimiento beta 1 (TGF- $\beta$ 1), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Casini et al., 1997; Vinas et al., 2003). Este proceso de activación se caracteriza por la diferenciación de las CEHs hacia un fenotipo similar miofibroblasto, con la pérdida de las inclusiones de vitamina A y el aumento de la expresión de proteínas contráctiles como la alfa-actina de musculo liso ( $\alpha$ -SMA) adquiriendo propiedades contráctiles, proinflamatorias, proliferativas, migratorias y profibrogénicas (Friedman, 2000; Kent et al., 1976; Lieber, 2005). Una vez que se activan, las CEHs migran hacia el sitio de injuria y aumentan considerablemente la síntesis de colágeno, principalmente de tipo I y III, así como de otros componentes de la MEC (Alcolado et al., 1997; Friedman, 1993). Este proceso dinámico activa a su vez enzimas capaces de degradar colágeno como las metaloproteasas (MMPs). No obstante, si el proceso fibrogénico es sostenido da lugar no sólo a la acumulación de colágeno, sino también a una inhibición de su degradación como consecuencia de la activación de enzimas inhibidoras de las MMPs (TIMPs) (Bataller and Brenner, 2005). Como se comentó anteriormente, las células de Kupffer cumplen también un rol muy importante en el proceso fibrogénico al activarse y liberar factores proinflamatorios que exacerban la respuesta inmunitaria en el hígado reclutando leucocitos circulantes (monocitos/macrófagos, neutrófilos, células NK, etc.), así como también citoquinas y radicales libres, entre otros factores, que activan las CEHs (Weiskirchen and Tacke,

2014). Sin embargo, hay crecientes evidencias que indican que en ciertas condiciones los macrófagos hepáticos pueden adoptar un fenotipo inmunosupresor y de reparación tisular que podrían contribuir a la reversión de la fibrosis hepática (Barnes et al., 2015).

La acumulación progresiva de la MEC provoca la pérdida de la funcionalidad vascular del hígado. Particularmente, el aumento de la producción de colágeno tipo IV, elastina y laminina terminan formando una membrana basal continua en el endotelio vascular que limita el espacio de Disse, cambiando finalmente la arquitectura del mismo (**Figura 5**). Como conclusión de este proceso se producirá un aumento de la presión portal, lo cual tendrá como consecuencia a mediano plazo la aparición de las complicaciones características de un paciente cirrótico descompensado (ascitis, varices esofágicas, esplenomegalia, encefalopatía hepática, etc.).



**Figura 5.** Cambios fenotípicos que ocurren en el sinusoides hepático durante la fibrosis. Se observa la muerte de los hepatocitos, infiltrado leucocitario, activación de CEHs y células de Kupffer. Además se observa la disminución de las fenestras del endotelio y del volumen sinusoidal así como el incremento de MEC en el espacio de Disse (Extraído y modificado de (Friedman, 2003)).

### **1.2.3 Célula estrellada hepática, principal responsable de la fibrogénesis hepática**

Como se describió anteriormente, las CEHs cumplen un rol fundamental tanto en el inicio como en la perpetuación del proceso fibrogénico,

En los últimos años se han realizado numerosos estudios que llevaron al conocimiento de que los miofibroblastos presentes en un hígado fibrótico/cirrótico son una población heterogénea (Mallat and Lotersztajn, 2013). Las CEHs son consideradas la mayor fuente de las células fibrogénicas, que al activarse adquieren un fenotipo tipo miofibroblasto con alta capacidad contráctil (migración) y profibrogénica. Otros miofibroblastos se originan a partir de fibroblastos portales, que son células de origen mesenquimal y fenotipo ahusado, las que se encuentran normalmente rodeando la vena porta para mantener la integridad del tracto portal (Dranoff and Wells, 2010). Se ha observado que de acuerdo al tipo de daño, la contribución de estos dos tipos celulares puede variar. Mientras que en injurias biliares y colestásicas predominan los fibroblastos portales, cuando el daño es en células parenquimáticas (infección por HVB, HVC o alcohol) el mayor aporte es de las CEHs quiescentes presentes en el hígado (Iwaisako et al., 2014; Lemoine et al., 2013). Si bien poseen amplias similitudes, entre ambos tipos celulares existen algunas diferencias en la respuesta a los estímulos de activación, marcadores fenotípicos y otras características biológicas. Se ha demostrado que los miofibroblastos portales son más resistentes a la apoptosis y tienen una mayor tasa proliferativa (Bosselut et al., 2010; Dranoff and Wells, 2010; Iwaisako et al., 2014). En menor medida, otras fuentes celulares con capacidad de contribuir con miofibroblastos tendrían origen en la médula ósea y en otros fibrocitos circulantes que se reclutan en el hígado luego de una injuria (Kisseleva et al., 2006; Scholten et al., 2011). Incluso se ha descrito que algunas células epiteliales hepáticas podrían sufrir una transición epitelio-mesenquimal y originar células productoras de MEC y adquirir otras propiedades de células

mesenquimales (Kalluri, 2009). Sin embargo, este proceso fue demostrado solo en condiciones *in vitro* al exponer colangiocitos o hepatocitos a TGF- $\beta$ 1 (Chu et al., 2011; Taura et al., 2010), mientras que no pudo ser demostrado en modelos *in vivo*.

El proceso de activación de las CEHs consiste en dos fases denominadas **iniciación** y **perpetuación** (Friedman, 2008). La fase de iniciación comienza a partir de diversos estímulos de su entorno que dan lugar a cambios rápidos en la expresión de genes que facilitan la respuesta celular a citoquinas, factores de crecimiento y estímulos locales de origen paracrino o autocrino. Uno de los estímulos iniciales más importantes ocurre por la apoptosis de células epiteliales (hepatocitos o colangiocitos) generada por la injuria hepática (Canbay et al., 2004; Mehal and Imaeda, 2010). En estudios *in vitro* se ha reportado que la fagocitosis de cuerpos apoptóticos derivados de hepatocitos o células biliares resulta en la activación de CEHs y células de Kupffer, la cual está parcialmente mediada por el receptor tipo Toll 9 (TLR9) (Canbay et al., 2003a; Canbay et al., 2003b; Schuppan and Kim, 2013). Los hepatocitos pueden también estimular la activación de las CEHs a través de la producción de peróxidos lipídicos, especies reactivas del oxígeno (ROS) y citoquinas profibrogénicas como TGF- $\beta$ 1 (Schuppan and Kim, 2013). Por otro lado, las células endoteliales sinusoidales pueden contribuir a la activación de las CEHs mediante la producción de proteínas de matriz como fibronectina y colágeno tipo IV y de citoquinas como TGF- $\beta$ 1 y PDGF. Además, estas células pueden activarse y proliferar dando lugar a neovascularización y capilarización del endotelio fenestrado de los sinusoides hepáticos lo que conduce a un mayor daño y aumento de la presión portal (Elpek, 2014; Schuppan and Kim, 2013). Otro estímulo de activación importante es mediado por el infiltrado de células inflamatorias que se reclutan al hígado en respuesta al daño. Se ha demostrado que linfocitos T colaboradores vía producción de citoquinas pueden activar las CEHs, siendo más fibrogénicos los subtipos Th2 y Th17 en comparación con el Th1 (Elpek,

2014; Marra et al., 2009). Se ha demostrado también que la ausencia de linfocitos B disminuye la progresión de la fibrosis (Lee et al., 2015b). Asimismo, el reclutamiento de neutrófilos en los sitios de lesión induce la liberación de especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico (NO) los que aumentan la estimulación de las CEHs (Elpek, 2014). Por otro lado, las células NK (Natural Killer) pueden inducir la activación de las CEHs y estimular la inflamación tras la injuria hepática. Sin embargo, se ha demostrado que un subtipo alternativo de células NK sería capaz de reducir la activación e inducir la apoptosis de las CEHs, por liberación de INF-gama (Kumar, 2013; Melhem et al., 2006; Radaeva et al., 2006).

Un caso particular es el de las células de Kupffer y monocitos infiltrantes, estos últimos pueden diferenciarse a macrófagos y/o a células dendríticas, que expresan un amplio repertorio de receptores de quemoquinas y median tanto la inducción como la resolución de la fibrosis (Ramachandran and Iredale, 2012; Tacke and Zimmermann, 2014) (ver siguiente sección). Entre los estímulos moleculares, las ROS producidas por diversas células del microambiente de las CEHs y por ellas mismas en respuesta a PDGF, TGF- $\beta$ 1, leptina y angiotensina II son potentes estimulantes de su activación y producción de MEC (Ghatak et al., 2011; Novo et al., 2006). Se ha demostrado que al activarse, las CEHs aumentan la expresión de enzimas involucradas en la generación y detoxificación de ROS, como NADPH oxidasa o citocromo P450 2E1, lo que además les confiere una mayor resistencia a la apoptosis y necrosis (Dunning et al., 2013; Elpek, 2014). Por otro lado, tanto las CEHs como las células de Kupffer expresan receptores tipo Toll (TLR2, TLR4, TLR9) que señalizan la activación del proceso fibrogénico mediado por productos microbianos derivados del reflujo intestinal que se produce en la fibrosis hepática (Huebener and Schwabe, 2013; Mallat and Lotersztajn, 2013).

De esta forma, tras los estímulos de iniciación, las CEHs aumentan la expresión del receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y desarrollan

un fenotipo contráctil y profibrogénico. Estos primeros pasos en la activación de las CEHs ocurren dentro de un entorno con cambios progresivos de la conformación MEC dentro del espacio de Disse. Estos cambios en la MEC son censados por receptores de membrana (integrinas) que amplifican aún más la activación e inducen cambios en el citoesqueleto (aumento de  $\alpha$ -SMA) y migración de las CEHs hacia los sitios de injuria (Friedman, 2004). Asimismo el cambio en la conformación de la MEC modifica la expresión de MMPs. Durante el proceso de fibrogenesis se ha observado una disminución de MMP-1 (colagenasa tipo I), y un aumento en la producción de MMP-2, MMP-3 y MMP-9 (responsables de la degradación de la matriz de baja densidad). Las CEHs son la fuente principal de MMP-2 y MMP-3 (Arthur et al., 1992; Vyas et al., 1995) y las células de Kupffer, de MMP-9 (Winwood et al., 1995). El depósito de MEC de alta densidad actúa como estímulo sobre las CEHs para que produzcan más MMP-2, estableciendo un mecanismo de retroalimentación positiva (Benyon et al., 1999; Theret et al., 1999). Las CEHs, a su vez, aumentan la expresión de inhibidores de metaloproteinasas, TIMP-1 y TIMP-2, que inhiben la actividad de las metaloproteinasas intersticiales (MMP-1), favoreciendo así este cambio cualitativo (Benyon and Arthur, 2001).

Una vez que las CEHs se activan, la etapa de perpetuación consiste en eventos celulares que mantienen y amplifican el fenotipo activado, potenciando la expresión de citoquinas, la reactividad celular y la remodelación de la MEC. Esta etapa involucra cambios en procesos bien marcados del comportamiento celular. Aumenta la proliferación de las CEHs en respuesta a PDGF y TGF- $\beta$ 1 (Friedman, 2004; Lee et al., 2015b). Las CEHs se caracterizan por tener una alta expresión de proteínas contráctiles filamentosas como  $\alpha$ -SMA y miosina. Al activarse, aumenta la contractilidad de las CEHs, mediada por endotelina 1 (ET-1); angiotensina II y somatostatina, lo que afecta a la hipertensión portal característica de la fibrosis hepática (Reynaert et al., 2002). Asimismo, la activación de las CEHs induce un



aumento en la expresión de receptores de factores quimiotácticos, lo que se traduce en una mayor capacidad migratoria o quimiotaxis. Se ha demostrado que las CEHs migran hacia los sitios de injuria en respuesta a PDGF (Kinnman et al., 2000), la proteína quimiotáctica monocitaria 1 (MCP-1) (Marra et al., 1998), ligandos de CXCR3 (Bonacchi et al., 2001), TGF- $\beta$ 1 o EGF (epithelial growth factor) (Yang et al., 2003). También se observó que el colágeno tipo I, pero no el colágeno tipo IV, incrementa la migración de las CEHs (Yang et al., 2003). Igualmente, la perpetuación de la activación incluye un aumento en la fibrogénesis de las CEHs. Este incremento en la síntesis de colágeno tipo I está regulado a nivel transcripcional y traduccional principalmente por TGF- $\beta$ 1, que actúa de forma autocrina y paracrina (Nieto et al., 2001). TGF- $\beta$ 1 tiene un papel fundamental en la iniciación, promoción y progresión de la transdiferenciación de las CEHs. Durante la activación de las CEHs, TGF- $\beta$ 1 activa las proteínas Smad 2 y 3 que incrementan aún más la fibrosis (Phanish et al., 2006). El factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF/CCN2) también es una potente señal fibrogénica para las CEHs (Gao and Brigstock, 2004). Su regulación puede ser dependiente o independiente de TGF- $\beta$ 1 (Brigstock, 2003; Grotendorst, 1997). Existen también señales neurohumorales, en particular de tipo cannabinoides, que contribuyen a la activación de las CEHs y a la fibrosis (Mallat and Lotersztajn, 2008). Como se mencionó anteriormente, las CEHs pueden censar los cambios en la conformación de la MEC y modificar el patrón de MMPs que liberan al medio extracelular por lo que afecta a la degradación de la MEC. Las MMPs contribuyen a la degradación, tanto patológica como restauradora/fisiológica, de la MEC (**Figura 4**) y pueden activarse mediante escisión proteolítica o inhibirse por la unión a inhibidores específicos conocidos como inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) (Iredale, 1997). Las MMP-2, MMP-3, MMP-9 y MMP1 intervienen en la degradación de la MEC subendotelial normal, que es sustituida por colágenos formadores de fibras capaces de estimular la proliferación de las CEHs (Senties-Gomez et al., 2005; Xu et al., 2004).

Además, la expresión de TIMP-1 en las CEHs activadas inhibe la MMP-1, la principal metaloproteínasa responsable de la degradación del colágeno de tipo I (Benyon and Arthur, 2001). La expresión persistente de TIMP-1 hace que la respuesta fibrogénica se incremente (Yoshiji et al., 2002). Las MMPs y las TIMPs son sensibles a las especies reactivas del oxígeno, las especies reactivas de nitrógeno, las citoquinas y los factores de crecimiento como TGF- $\beta$ 1 (Ghatak et al., 2011). Finalmente, las CEHs activadas tienen un papel importante como moduladoras de la respuesta inflamatoria e inmunitaria hepática mediante la liberación de citoquinas y señales inflamatorias. Por ejemplo, las CEHs pueden liberar el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), MCP-1, la interleuquina 6 y el quemoatrayente neutrofílico inducido por citoquinas/IL-8 (CINC) que reclutan células inmunitarias y amplifican el estímulo fibrogénico (Mallat and Lotersztajn, 2013; Schwabe et al., 2003).

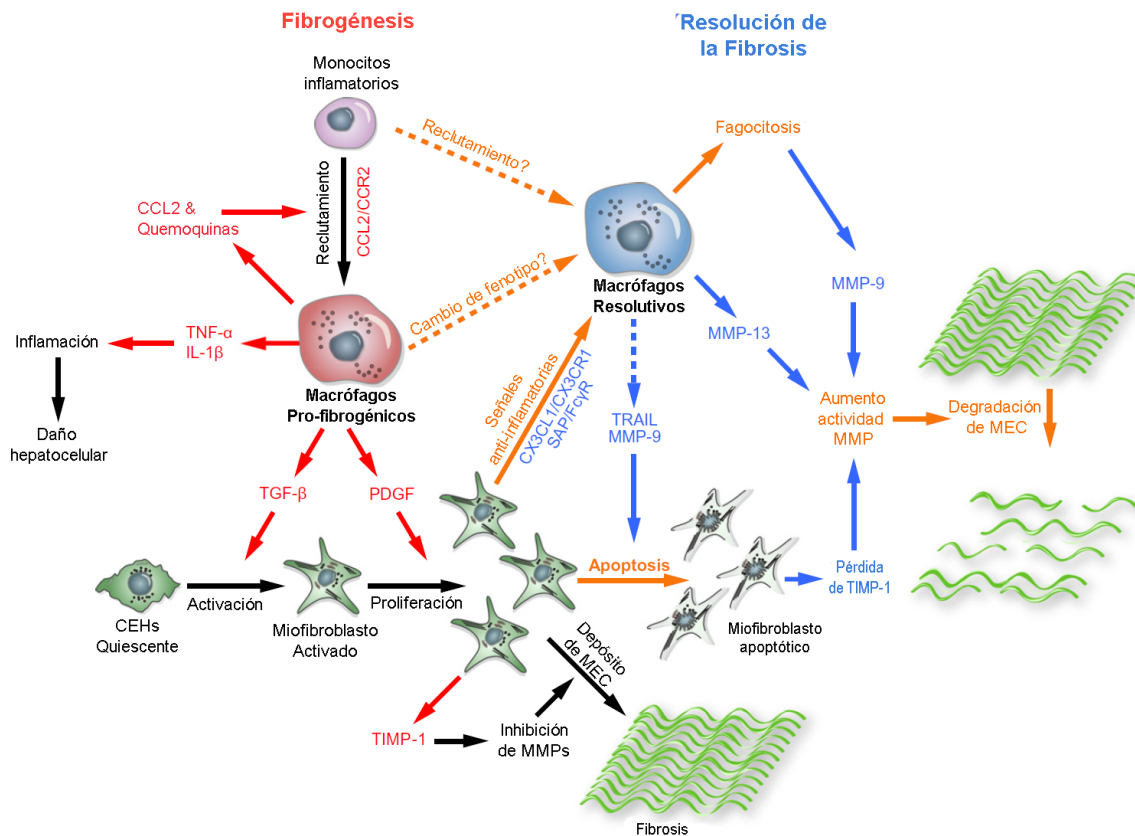
Las evidencias de los últimos años demostraron que la fibrosis, e inclusive la cirrosis, pueden ser reversibles. Con el fin de encontrar nuevos blancos terapéuticos, se ha intensificado el interés por estudiar los mecanismos que participan de la resolución de la fibrosis. En este contexto, gran parte de los estudios se basan en la erradicación o eliminación de las CEHs activadas, lo cual puede suceder mediante la inducción de la apoptosis o senescencia de las CEHs activadas (Iredale et al., 2013; Krizhanovsky et al., 2008) y, menos probablemente, transformando las CEHs activadas en células con un fenotipo más quiescente (Kisseleva et al., 2012). Asimismo, se ha identificado que estos efectos pueden ser mediados por una población específica de macrófagos o células dendríticas, células NK o también por las células endoteliales sinusoidales que pueden contribuir a mantener las CEHs en un fenotipo más quiescente (Mallat and Lotersztajn, 2013).

#### **1.2.4 Rol de los macrófagos en la progresión y resolución de la fibrosis hepática**

Como se mencionó previamente, las células de Kupffer y los macrófagos reclutados de la sangre periférica y médula ósea cumplen una importante función tanto en la progresión como en la resolución de la fibrosis hepática (Lee et al., 2015b). La persistencia de la injuria de células parenquimáticas y su consecuente muerte por necrosis o apoptosis, sumado a las alteraciones cuantitativas y cualitativas de los componentes de la matriz extracelular, inducen la activación de células inflamatorias y en particular de las células de Kupffer y los macrófagos infiltrantes que, a su vez, amplifican la activación de las CEHs (Ramachandran and Iredale, 2012) (**Figura 6**). Al activarse estos macrófagos sintetizan y liberan numerosos mediadores pro-inflamatorios y profibrogénicos, siendo los más importantes TGF- $\beta$ 1, PDGF, bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), TNF- $\alpha$ , IL-1, MCP-1 y ROS. (Novo et al., 2014; Tacke and Zimmermann, 2014). De este modo, una mayor liberación de TGF- $\beta$ 1 estimula la producción de componentes de la matriz extracelular y TIMP-1, PDGF estimula la proliferación de miofibroblastos activados, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  inducen un subsiguiente reclutamiento de células inflamatorias, perpetuando así, el estímulo pro inflamatorio y profibrogénico. Además, estos macrófagos presentan una alta expresión de la óxido nítrico-síntasa inducible (iNOS), produciendo altos niveles de óxido nítrico, lo que amplifica más aún el estímulo pro-inflamatorio (Ramachandran and Iredale, 2012).

Sin embargo, los macrófagos se caracterizan por su gran plasticidad y dependiendo del microambiente en el que se encuentren pueden diferenciarse funcionalmente en diferentes subtipos (Foey, 2014; Tacke and Zimmermann, 2014). Los clásicamente activados **M1** se caracterizan por un perfil pro-inflamatorio como el ya descrito y han sido involucrados en la progresión de la fibrosis hepática. Por otro

lado, los macrófagos alternativamente activados **M2** tienen un perfil anti-inflamatorio e inmunosupresor y, dependiendo del repertorio de citoquinas y factores que expresen, pueden mediar procesos de reparación tisular, inmunidad humoral, defensa contra parásitos o promoción tumoral, entre otros (Foey, 2014). Esta variedad de funciones, definidas por los diferentes repertorios de citoquinas y receptores que expresen, permite subdividirlos en tres subclases más (M2a, M2b y M2c) (Foey, 2014; Gordon and Martinez, 2010). Sin embargo, se ha sugerido que los macrófagos involucrados en la resolución de la fibrosis hepática, también llamados “**macrófagos restaurativos**”, no podrían ser clasificados dentro de una de estas clases si se tiene en cuenta su perfil funcional y de expresión de citoquinas y receptores (Lee et al., 2015b; Tacke and Zimmermann, 2014). En distintos modelos experimentales se ha comprobado que macrófagos hepáticos secretan metaloproteasas (MMPs), como MMP2, MMP9, MMP12 y MMP13, que degradan MEC favoreciendo la resolución de la fibrosis y reduciendo el daño (Barnes et al., 2015; Fallowfield et al., 2007; Pellicoro et al., 2012). Asimismo, se ha demostrado que la administración sistémica de macrófagos maduros en ratones con fibrosis avanzada resultó en la inducción de la producción en el tejido hepático de MMP9 y MMP13, IL10 (que reduce la inflamación y activación de las CEHs) y de factores de crecimiento como IGF-I, VEGF y CSF-1 (que protegen de la injuria hepática) (Thomas et al., 2011). Además, los macrófagos pueden inducir la apoptosis de las CEHs mediante la liberación de MMP9 y del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) (Ramachandran and Iredale, 2012). Por otro lado, se ha reportado que las células de Kupffer también pueden proteger del daño hepático a través de mecanismos de autofagia (Lodder et al., 2015).



**Figura 6. Macrófagos como reguladores centrales de la fibrogénesis y resolución de la fibrosis.**

Los macrófagos hepáticos, con perfil pro-fibrogénico, pueden activar e inducir la proliferación de las CEHs liberando TGF- $\beta$ 1 y PDGF, reclutar monocitos circulantes por la producción de quemoquinas y amplificar el daño hepatocelular aumentando la inflamación del hígado por la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Los macrófagos con perfil resolutivo pueden liberar MMPs que degradan la MEC e inducir la apoptosis de las CEHs activadas a través de TRAIL y MMP9. Figura adaptada de (Ramachandran and Iredale, 2012)

Pese a encontrarse bien estudiado el rol en la progresión y reversión de la fibrosis hepática, hasta el momento se desconoce el origen de los macrófagos restauradores en la fibrosis hepática (Ramachandran and Iredale, 2012). En estudios recientes en un modelo murino de fibrosis hepática reversible se ha evaluado la expresión diferencial de Ly6C, un marcador de membrana característico de monocitos circulantes, para identificar la fuente de macrófagos restauradores implicado en la resolución de la fibrosis (Ramachandran et al., 2012). Se ha reportado que en la fibrogenesis hepática los monocitos circulantes con alta expresión de Ly6C (Ly6C<sup>alto</sup>) serían reclutados tempranamente en entornos inflamatorios y promoverían la fibrogenesis, activando las CEHs y atrayendo más células inflamatorias (Karlmark et

al., 2009); por otra parte, los monocitos circulantes con baja expresión de Ly6C (Ly6C<sup>bajo</sup>) infiltrarían mayormente el hígado durante la etapa de resolución de la fibrosis (Ramachandran et al., 2012). Esta población de macrófagos estaría caracterizada por el perfil de expresión Ly6C<sup>bajo</sup>CD11b<sup>alto</sup>F4/80<sup>intermedio</sup> y por expresar altos niveles de MMPs y de factores de crecimiento como IGF-1 y HGF, y que serían requeridos para la degradación de la MEC. Finalmente, en el mismo estudio se muestran resultados *in vitro* que sugieren que estos macrófagos derivarían de monocitos Ly6C<sup>alto</sup> (Ramachandran et al., 2012).

### 1.2.5 Cirrosis

La fibrosis hepática puede evolucionar hacia su fase terminal, la cirrosis (Heidelbaugh and Bruderly, 2006; Lefton et al., 2009). Esta se caracteriza por una alteración difusa de la arquitectura hepática, cuya característica predominante es la fibrosis extensa y la distorsión del parénquima hepático que adquiere un aspecto nodular como resultado de la regeneración de células hepáticas parenquimatosas para reponer las células muertas como consecuencia de la injuria (Anthony et al., 1978; Garcia-Tsao et al., 2010). Estos cambios conllevan a una alteración vascular intrahepática y a una reducción de la masa funcional que llevan a la hipertensión portal y a la insuficiencia hepática.

La cirrosis suele presentarse en pacientes entre 40 y 70 años de edad y, en general, no suele tener manifestaciones clínicas en las primeras etapas de la enfermedad, por lo que los pacientes suelen permanecer en este estado asintomático durante años (cirrosis hepática compensada) (Heidelbaugh and Bruderly, 2006). En ocasiones, su diagnóstico es casual ante hallazgos como hepatomegalia, ictericia, esplenomegalia, estigmas cutáneos de hepatopatía crónica o alteraciones de los valores de laboratorio (descenso del valor de plaquetas o alteraciones en las pruebas de coagulación, entre otras). A medida que la función hepática se deteriora, se pueden

presentar complicaciones mayores. Estas complicaciones consisten en la presencia de ascitis, hemorragia por varices esófago-gástricas, encefalopatía hepática o HCC (Garcia-Tsao et al., 2010). Particularmente, el riesgo de padecer HCC aumenta considerablemente en pacientes con cirrosis. Algunos trabajos, muestran un incremento de más de 20 veces en la incidencia del HCC luego de adquirida la cirrosis (dependiendo de la etiología de la misma), por lo que el HCC se posiciona como la principal causa de muerte en pacientes con esta enfermedad (El-Serag and Rudolph, 2007).

#### **1.2.6 Factor de crecimiento insulínico tipo 1 y cirrosis**

El factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) es una hormona polipeptídica de 70 aminoácidos segregada en múltiples tejidos por efecto de la hormona de crecimiento (GH). Aunque puede ser producida por el riñón, pulmón, placenta, ovarios, testículos, piel o páncreas, el 90% del IGF-I circulante es de origen hepático (Bonfeld and Moller, 2011; Conchillo et al., 2007; Daughaday and Rotwein, 1989). Además de mediar el efecto de la GH, tiene un efecto hipoglucemiante y anabolizante, ejerciendo efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos en múltiples tejidos (Bonfeld and Moller, 2011; Daughaday and Rotwein, 1989). En esencia, IGF-I es un factor anabólico o de crecimiento; está implicado en el metabolismo de proteínas reduciendo la proteólisis y estimulando su síntesis, aumenta la masa muscular al inducir la absorción de aminoácidos, aumenta la absorción de glucosa e inhibe la gluconeogénesis, entre otras funciones (Daughaday and Rotwein, 1989; Sepp-Lorenzino, 1998). IGF-I circula unida a una familia de seis proteínas, IGFBP1 a IGFBP6 (*IGF binding proteins*) que regulan su actividad biológica (Bonfeld and Moller, 2011). Entre éstas, la más abundante y de mayor afinidad es la IGFBP3 que se une de forma no covalente al IGF-I y a la subunidad ácido lábil formando un trímero de 150 KDa. De esta forma, esta proteína transportadora actúa como reservorio circulante de IGF-I, y es a su vez

regulada por distintos estímulos que inducen la producción de proteasas que la degradan permitiendo la liberación de IGF-I y su acción (Riedemann and Macaulay, 2006). La acción principal de IGF-I es mediada por la unión a su receptor específico, el receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1R), presente en numerosos tipos de tejidos (Sepp-Lorenzino, 1998). IGF1R es una glicoproteína de membrana perteneciente a una amplia familia de receptores de tipo tirosina quinasa, entre los que se encuentran el receptor de insulina (IR) o el receptor de IGF-II (IGF2R), a los cuales IGF-I también se une aunque con muy baja afinidad (Sepp-Lorenzino, 1998).

Como consecuencia de la insuficiencia hepatocelular, durante la cirrosis se produce una disminución progresiva de la producción hepática de IGF-I llegando a ser indetectable en la enfermedad avanzada, influyendo significativamente en las alteraciones metabólicas y funcionales propias de esta patología (Bonefeld and Moller, 2011; Caregaro et al., 1998). Algunas de las complicaciones de la cirrosis que podrían estar relacionadas con esta carencia de IGF-I son fundamentalmente nutricionales y metabólicas, como la resistencia a insulina, desnutrición, osteopenia, hipogonadismo o alteraciones intestinales (Conchillo et al., 2007). Por otro lado, conforme avanza la cirrosis hepática también se observa un desbalance de los niveles séricos de las proteínas transportadoras de IGF-I (Scharf et al., 1996). Asimismo, otros autores observaron en pacientes cirróticos una disminución en los niveles séricos de IGFBP3: los mismos fueron correlacionados negativamente con el valor de MELD (*Model for End-stage Liver Disease*, sistema de puntuación utilizado para evaluar la severidad de la enfermedad hepática y posicionar a los pacientes en la lista de espera para trasplante) y regresaron a valores normales luego de 6 meses de realizado un trasplante hepático (Castro et al., 2013).

Por otro lado, en modelos de cirrosis por CCl4 en ratas se demostró que el tratamiento con dosis bajas de IGF-I recombinante (rIGF-I) ejerce actividades



hepatoprotectoras mejorando la funcionalidad hepática, disminuyendo la hipertensión portal, el daño por estrés oxidativo y la fibrosis hepática (Castilla-Cortazar et al., 1997; Conchillo et al., 2007). Además, como consecuencia de la recuperación en la funcionalidad hepática, el tratamiento con rIGF-I promovió una mejoría de las alteraciones extrahepáticas de la cirrosis al mejorar la incorporación de nutrientes como glucosa y aminoácidos, y aumentar la respuesta a la insulina y la masa muscular y ósea (Conchillo et al., 2007). Efectos similares se observaron en modelos de cirrosis por ligadura del conducto colédoco (Canturk et al., 2003). Asimismo, en un estudio clínico piloto en pacientes cirróticos (de origen alcohólico y por cirrosis biliar primaria) tratados durante 4 meses con una dosis diaria de rIGF-I (100 ug/Kg peso corporal) se reportó un aumento significativo en los niveles de albúmina sérica, como marcador de síntesis hepática (Conchillo et al., 2005). Sin embargo, el restablecimiento de los niveles de IGF-I en pacientes cirróticos requiere el uso de altas dosis de esta proteína y frecuente administración, lo que conlleva un alto costo del tratamiento.

Se desconocen en gran medida los mecanismos a través de los cuales IGF-I ejercería su efecto anti-fibrótico. Por un lado se postula que podría actuar sobre las CEHs (Mair et al., 2011). En ensayos *in vitro* se ha observado que IGF-I no estimulan la proliferación ni la síntesis de colágeno en las CEHs (Gentilini et al., 1998; Gentilini et al., 2000). Por otra parte, en estudios *in vivo* se observó que IGF-I reduce la activación e induce la apoptosis CEHs, al mismo tiempo que induce la expresión de HGF en el hígado (Sanz et al., 2005). En concordancia con estos resultados, se ha reportado que la administración de HGF en animales cirróticos induce la apoptosis de las CEHs (Kim et al., 2005).

### **1.2.7 Tratamiento de la fibrosis y cirrosis hepática**

En la actualidad no existen tratamientos probados para la fibrosis hepática y la estrategia terapéutica de elección es eliminar el agente causal del daño y tratar los síntomas en los estadios más avanzados (Lee et al., 2015b). Sin embargo, esto no siempre es posible, por ejemplo en pacientes que no responden al tratamiento antiviral (particularmente por hepatitis B). Por otra parte, para los pacientes con cirrosis avanzada el trasplante hepático es la única alternativa posible (Friedman, 2003). Sin embargo, este procedimiento no sólo es costoso sino que también su aplicación es limitada debido a la escasez de donantes. Además, en pacientes con hepatitis C, el hígado trasplantado se reinfecta rápidamente y vuelve a desarrollarse la fibrosis y la cirrosis en un breve lapso de tiempo (Henderson and Iredale, 2007). Por lo tanto, en los últimos años se han realizado numerosos esfuerzos con el fin de encontrar alternativas terapéuticas y nuevas dianas que permitan detener la progresión de la cirrosis o contribuir a su resolución. Gracias al creciente conocimiento de los mecanismos por los que se establece la fibrosis hepática y posterior cirrosis, en los últimos años se ha avanzado significativamente en el desarrollo de nuevas terapias que están en plena evaluación. Recientemente, los autores Schuppan y Kim publicaron una revisión donde detallan las nuevas estrategias terapéuticas que se están evaluando a partir de distintos ensayos clínicos ya finalizados o en proceso de análisis (Schuppan and Kim, 2013). Como se ha mencionado previamente, la primera opción terapéutica, y la que se aplica actualmente, es eliminar el agente causante de la injuria hepática y tratar los síntomas la patología. Los nuevos enfoques terapéuticos se basan en drogas que bloquean receptores en las CEHs que inducen activación y por ende progresión de la fibrosis, o bien, inhibidores de la señalización de vías profibrogénicas fundamentales como TGF- $\beta$ 1 o CTGF. Asimismo, otras alternativas se basan en promover la resolución de la fibrosis; por ejemplo, induciendo la apoptosis de CEHs a

través de drogas o por la actividad de células NK, aumentando la degradación de la MEC por macrófagos fibrolíticos o inhibiendo la actividad de las TIMPs (Lee et al., 2015b). Sin embargo, los resultados publicados hasta el momento demostraron una eficacia terapéutica limitada y, dada la complejidad de los mecanismos fisiopatológicos, se plantea el enfoque de tratar la patología interfiriendo en múltiples puntos del proceso fibrogénico (Lee et al., 2015b; Schuppan and Kim, 2013).

Por otro lado, en los últimos años hubo avances en la aplicación de terapias celulares, particularmente con células estromales mesenquimales (MSCs) y/o de origen hematopoyético (Fiore et al., 2015; Schuppan and Kim, 2013). Los primeros resultados arrojados incluyen mejoras en la funcionalidad hepática y en determinados parámetros utilizados para evaluar la progresión de la patología.

### **1.2.8 Modelos animales de fibrosis hepática**

Los modelos animales de fibrosis hepática permiten no sólo entender mejor la fisiopatología de la fibrogénesis hepática, sino también poder determinar la efectividad de nuevos tratamientos. Debido a la gran diversidad de causas de la fibrosis y a que no hay ningún modelo animal que reproduzca exactamente la enfermedad, existen numerosos modelos que brindan información complementaria. Particularmente, en este trabajo de tesis doctoral se utilizó el modelo en ratón de toxicidad crónica inducido por tioacetamida (TAA). La TAA es conocida como un potente agente hepatotóxico (Hunter et al., 1977). Una vez administrado, este compuesto es bioactivado por el citocromo p450 y/o por el sistema monoxigenasa conteniendo flavina (FMO) que lo convierten en TAA-S-óxidos, los cuales son capaces de generar necrosis de los hepatocitos centrolobulillares, o de la zona 3 (Hunter et al., 1977). La muerte de hepatocitos por este hepatotóxico se debe, en parte, a la inducción de cambios en la permeabilidad celular, incremento de los niveles de Ca<sup>2++</sup> e inhibición de la actividad

mitocondrial en el hepatocito (Ambrose et al., 1949; Neal and Halpert, 1982). La aplicación crónica de TAA induce una fibrosis preferentemente pericentral con eventual formación de puentes entre venas centrales y porto-portales (Li et al., 2002; Muller et al., 1988; Oren et al., 1996).

Otro modelo experimental ampliamente utilizado para generar fibrosis es el modelo de ligadura del conducto colédoco. En este modelo se produce una obstrucción quirúrgica extra-hepática del flujo de bilis hacia el duodeno. La acumulación de ácidos biliares tóxicos induce la apoptosis y necrosis de hepatocitos y colangiocitos (Miyoshi et al., 1999). Asimismo, se ha demostrado que los ácidos biliares tóxicos estimulan el estrés oxidativo y aumentan la producción de TGF- $\beta$ 1 y colágeno (Matsubara et al., 2012; Sokol et al., 1995). El daño se produce principalmente en el área periportal con la generación de inflamación y la inducción de la muerte de los hepatocitos (Palmeira and Rolo, 2004). En este modelo experimental de fibrosis, la duración de esta obstrucción puede extenderse hasta 16 días en ratones observándose una fibrosis periportal con formación de puentes de fibrosis porto-portales.

### **1.3 Células madre mesenquimales**

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años se ha avanzado significativamente en el uso de las células madre mesenquimales, o también llamadas células estromales mesenquimales (MSCs), como estrategia terapéutica en una gran diversidad de patologías, entre éstas la cirrosis hepática (Fiore et al., 2015; Schuppan and Kim, 2013; Sutton and Bonfield, 2014).

Las MSCs han sido descritas como una fuente circulante de células madre adultas de origen mesodérmico (Minguell et al., 2001). Estas células presentan propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias junto con una especial capacidad

de migrar hacia sitios de injuria o remodelación. En respuesta al daño tisular, las MSCs serían capaces de cubrir las demandas de regeneración celular del órgano o tejido. Por estas propiedades, entre otras, es que este tipo de células representan un futuro prometedor para la medicina y son cada vez más empleadas en investigaciones tanto básicas como aplicadas.

### 1.3.1 Reseña histórica

En el siglo XIX, Julius Cohnheim propuso que la médula ósea podía ser una fuente de fibroblastos que contribuirían en la cicatrización de heridas (Cohnheim, 1867; Prockop, 1997). Sin embargo, recién al final de la década del 60, Friedenstein logró aislar por primera vez a partir de médula ósea células con capacidad de adherirse al plástico, morfología similar a fibroblastos y capacidad de autorenovación (Friedenstein et al., 1976). Estudios posteriores demostraron que estas células podían diferenciarse a osteocitos y adipocitos (Bennett et al., 1991; Owen and Friedenstein, 1988). Desde entonces, numerosos grupos han descripto y aplicado a estas células sucesivamente los siguientes nombres: células estromales de médula ósea, células madre mesenquimales y, más recientemente, células multipotentes estromales o células mesenquimales estromales, pudiendo asimismo aislar células con propiedades similares a partir de numerosos tejidos (Dominici et al., 2006; Friedenstein et al., 1976).

### 1.3.2 Caracterización

De acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*, ISCT) (Dominici et al., 2006), los requisitos mínimos para definir a las MSCs humanas son:

- capacidad de adherirse al plástico en cultivo;
- capacidad de diferenciarse hacia adipocitos, osteocitos o condrocitos;

- expresión de marcadores de superficie de origen mesenquimal: CD105, CD73 y CD90;
- ausencia de expresión de marcadores de linaje hematopoyético CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y el antígeno leucocitario humano (HLA) clase II.

Por otra parte, también ha sido reportado que las MSCs podrían diferenciarse en cardiomiocitos, células endoteliales, neuronas, hepatocitos y células epiteliales (Krampera et al., 2007; Pittenger et al., 1999; Sato et al., 2005; Silva et al., 2005), aunque en varios de estos casos dicha diferenciación parecería ser parcial. Asimismo, en ratón las MSCs expresan también Sca-1 (Stem cells antigen 1) (da Silva Meirelles et al., 2006).

### **1.3.3 Fuentes y origen de las MSCs**

Como se menciona más arriba, las MSCs fueron aisladas inicialmente a partir de la médula ósea. Sin embargo, luego de su caracterización se lograron obtener cultivos con propiedades similares a partir de diferentes tejidos u órganos fetales y adultos. Entre otros, se ha reportado el aislamiento de MSCs a partir de sangre periférica, tejido adiposo, músculo esquelético, pulmón, hígado, páncreas, pulpa dental, cerebro, membrana sinovial, bazo y timo (Li and Ikehara, 2013). Sin embargo, por la facilidad de su obtención y accesibilidad a un número adecuado de células algunos de estos tejidos son preferidos como fuentes de MSCs en vistas a su aplicación en investigación clínica (da Silva Meirelles et al., 2006). Por ejemplo, aunque estas células pueden ser aisladas a partir de sangre periférica las mismas sólo pueden obtenerse en muy pequeñas cantidades, por lo que las fuentes de elección más frecuentes son la médula ósea y el tejido adiposo (Kang et al., 2003; Pittenger et al., 1999; Wan et al., 2006). Por otro lado, pueden obtenerse cultivos de MSCs a partir de diversos tejidos extraembrionarios incluyendo la placenta (In 't Anker et al., 2004), el amnios (Marcus et al., 2008) y el cordón umbilical. En relación con el cordón

umbilical, se han establecido este tipo de cultivos a partir de todo el tejido (Majore et al.), del tejido conectivo mesenquimático o “gelatina de Wharton” (Karahuseyinoglu et al., 2007) o de la sangre contenida en el cordón umbilical (Broxmeyer et al., 2006). La ventaja adicional de utilizar estos tejidos neonatales es su amplia disponibilidad y ausencia de cuestionamientos éticos ya que se utiliza material de descarte. Se ha sugerido también que las MSCs obtenidas a partir de tejidos neonatales podrían tener una mayor capacidad proliferativa, vida útil y un mayor potencial de diferenciación en comparación con las obtenidas a partir de tejidos adultos (Bayo et al., 2014; Hass et al.).

A pesar del amplio espectro de tejidos/órganos a partir de los que han sido aisladas, hasta el momento no se conoce suficientemente el origen celular *in vivo* de las MSCs en la mayoría de las fuentes exploradas. Hay evidencias de que tanto células derivadas de la cresta neural (Nestina+) como no derivadas de la cresta neural pueden contribuir a los cultivos de MSCs (Morikawa et al., 2009; Takashima et al., 2007; Wislet-Gendebien et al., 2012). Asimismo, la evidencia sugiere que los distintos precursores, a partir de los cuales podrían obtenerse MSCs, al ser cultivados *in vitro* modifican su perfil de expresión de marcadores de superficie. Por ejemplo, se ha reportado el aislamiento en fracciones enriquecidas en células CD133+ o P75+ de dos subpoblaciones de MSCs de médula ósea con propiedades biológicas diferentes. Sin embargo, ambas subpoblaciones celulares perdieron la expresión de los marcadores específicos que permitieron su aislamiento a partir del segundo pasaje celular al mismo tiempo que adquirieron características homogéneas para marcadores típicos de MSCs que antes no expresaban (Bakondi et al., 2009). Por otro lado, también se ha reportado que precursores de células de Schwann presentes en la pulpa dental son fuente de las MSCs aisladas a partir de ese tejido (Kaukua et al., 2014).

Si bien el fenotipo *in vivo* de las células que contribuyen con cultivos de MSCs no es aún suficientemente conocido, existe actualmente aceptación entre los científicos de que las mismas estarían localizadas en la zona perivascular (Bianco et al., 2013; Corselli et al., 2013). Asimismo, a partir de muestras de tejido adiposo y médula ósea fetal ha sido recientemente demostrado que células perivasculares CD146+ que coexpresan Nestina, CXCL12 y el receptor de leptinas tienen la capacidad de sostener la hematopoyesis *in vitro*. Es interesante destacar que se encontró que estas células tras ser cultivadas por varios pasajes (de 3 a 10) pierden esta capacidad de promover sitios de generación de células sanguíneas (Corselli et al., 2013).

#### **1.3.4 Funciones fisiológicas de las MSCs**

Como se describió anteriormente, las MSCs tienen la capacidad de diferenciarse principalmente a células de origen mesodérmico y por lo tanto podrían ser utilizadas para reemplazar tejidos dañados de ese origen (Dominici et al., 2006; Pittenger et al., 1999). Si bien existen evidencias de diferenciación, al menos parcial, *in vitro* de MSCs en células de otros orígenes embrionarios, tales como hepatocitos, cardiomiocitos, neuronas, células de islotes beta del páncreas y queratinocitos (Li and Ikehara, 2013), es aún más controversial la posibilidad de que esto pueda suceder también *in vivo*. Es por este motivo que se postula que gran parte de las mejoras funcionales en modelos de lesión *in vivo* obtenidas a partir de la aplicación de MSCs se deberían fundamentalmente a la acción paracrina de distintos factores solubles producidos y liberados por estas células o bien al contacto célula-célula (**Figura 7**).

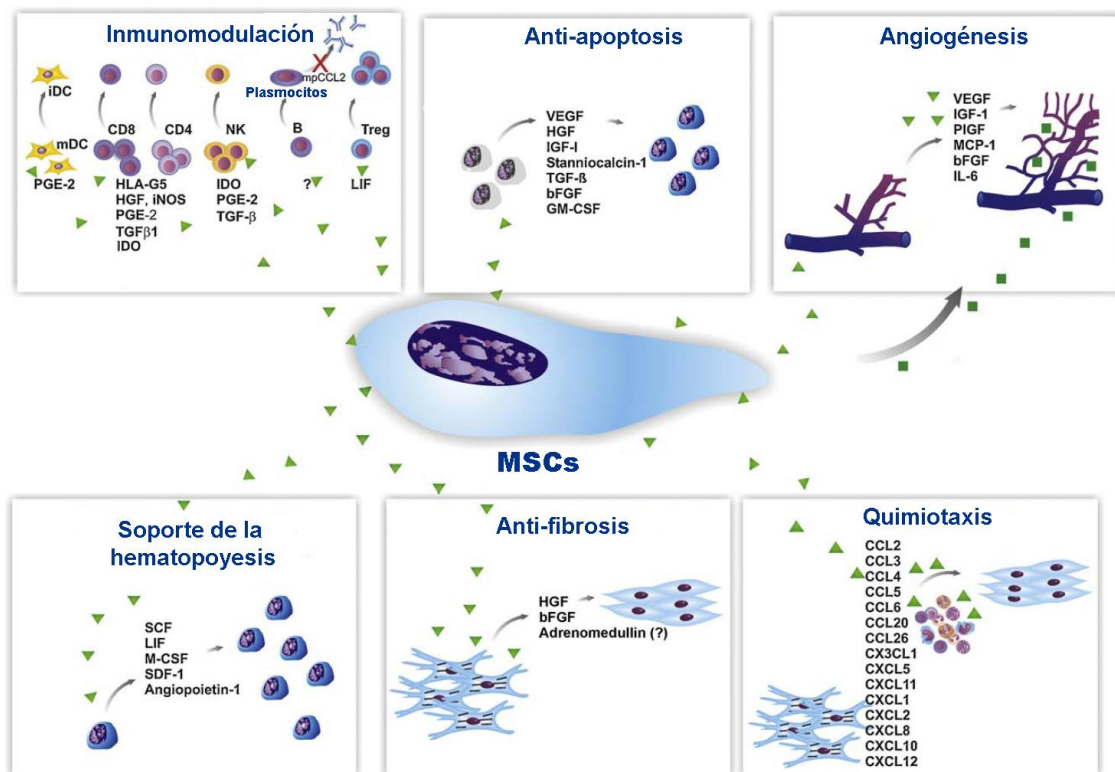
Las dos funciones primordiales que cumplirían las MSCs *in vivo* serían las de soporte tanto de la reparación de tejidos dañados como de la hematopoyesis (Aquino et al., 2010). Al incorporarse a tejidos dañados las MSCs pueden diferenciarse en componentes del tejido conectivo, ayudando al proceso de vasculogénesis, o secretar



citoquinas y factores de crecimiento lo que facilitaría el proceso de cicatrización (Aquino et al., 2010). Particularmente, esta capacidad de promover la reparación de tejidos se ha observado en diversas patologías que afectan al hígado, páncreas, cerebro, corazón, hueso, cartílago, pulmón, entre otros órganos (Brooke et al., 2007; Li and Ikehara, 2013). Asimismo, se ha demostrado que las MSCs pueden producir citoquinas antiapoptóticas como SDF-1, VEGF, HGF, IGF-I, TGF- $\beta$ 1, bFGF y GM-CSF (Meirelles Lda et al., 2009). Particularmente, este efecto antiapoptótico y proregenerativo ha sido demostrado en modelos de daño hepático a partir de la administración de MSCs aisladas a partir de distintas fuentes tisulares (Balber; Hematti, 2008; Jung et al., 2013; Kaibori et al., 2012; Li et al., 2013a; Li et al., 2012; Li et al., 2013b; Ortiz et al., 2007; van Poll et al., 2008; Zhang et al., 2012). Más aun, las MSCs pueden secretar citoquinas como el HGF, EGF, IL-6, entre otras, las cuales pueden estimular la proliferación de hepatocitos y aumentar su funcionalidad celular, lo que es consistente con los elevados niveles de secreción de albúmina y urea, alcanzados luego del trasplante de MSCs (Kiss et al., 2008).

En su función como soporte de la hematopoyesis, las MSCs derivadas de médula ósea secretan numerosas moléculas tróficas, incluyendo glicoproteínas de la MEC, citoquinas y factores de crecimiento como SDF-1, LIF (Leukemia inhibitory factor), M-CSF y angiopoyetina-1, entre otros (Dorshkind, 1990; Haynesworth et al., 1996; Hematti, 2008; Meirelles Lda et al., 2009). Por otra parte, se ha comprobado que las MSCs secretan numerosos componentes de la MEC y citoquinas como VEGF, PDGF, IL6, IL8, IGF-I, MCP-1 y bFGF, muchas de las cuales promueven la proliferación de células parenquimáticas y la angiogénesis (Beckermann et al., 2008). Asimismo, las MSCs secretan factores que inducen remodelación de la MEC y quimioquinas que atraen distintos tipos celulares los que a su vez mediarían en su acción (Meirelles Lda et al., 2009).

Finalmente, es importante tener en cuenta que las MSCs pueden modificar el patrón de factores liberados tras su interacción con otros tipos celulares, particularmente del sistema inmune (Meirelles Lda et al., 2009).



**Figura 7. Funciones de las MSCs mediada por efecto paracrino.** Las MSCs cultivadas *in vitro* pueden secretar una amplia diversidad de factores que actúan sobre las células del entorno. Estos factores pueden mediar funciones inmunomoduladoras, dar soporte a la hematopoyesis, proteger de la apoptosis, estimular la angiogénesis, el remodelamiento de la MEC y reclutar células para mantener la homeostasis del tejido dado. Figura adaptada de (Meirelles Lda et al., 2009)

### 1.3.5 Características inmunomoduladoras de las MSCs

Las MSCs expresan bajos niveles de moléculas de HLA de clase I y no expresan moléculas de HLA de clase II (Prockop and Oh, 2012). Esta particularidad, que permite su consideración como células inmunoprivilegiadas, facilitan que puedan evadir la respuesta inmunitaria alogénica convirtiéndolas en excelentes candidatos tanto para los trasplantes autólogos como alogénicos (Le Blanc and Ringden, 2007; Le Blanc et al., 2007). En este sentido, numerosos estudios han demostrado que las

MSCs tienen un efecto inmunosupresor generalizado tanto sobre células de la inmunidad adaptativa como de la inmunidad innata (**Figura 7**), incluyendo, linfocitos T, linfocitos B y células NK. Las MSCs pueden suprimir la actividad de linfocitos T CD8+ citotóxicos, ya sea directamente inhibiendo su proliferación, como indirectamente mediante el incremento de la proporción relativa entre linfocitos T CD4+ colaboradores de tipo II y linfocitos T CD4+ reguladores (Aggarwal and Pittenger, 2005). Además, la influencia de las MSCs sobre los linfocitos T podría indirectamente suprimir las funciones de los linfocitos B debido a que la activación de estos últimos depende de la actividad de los primeros (Augello et al., 2005). También se postula que las MSCs podrían ejercer una influencia directa sobre las células B mediante interacciones célula-célula así como la secreción de citoquinas (**Figura 7**) (Corcione et al., 2006; Meirelles Lda et al., 2009).

Por otra parte, las MSCs pueden modular la actividad de las células que forman parte de la inmunidad innata incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas, células NK y neutrófilos. En estudios *in vitro* se ha observado que las MSCs, según su entorno, pueden direccionar la actividad de los macrófagos haciendo que cambien de un perfil proinflamatorio (clásicamente activado M1) a otro antiinflamatorio (alternativamente activado M2). Los macrófagos tienen la capacidad de producir niveles elevados de citoquinas estimuladoras de la respuesta inmunitaria como TNF $\alpha$ , IL-6, IL1b y de especies reactivas del oxígeno (ROS); sin embargo, dependiendo del contexto pueden cambiar a un perfil antiinflamatorio reduciendo la expresión de éstas citoquinas proinflamatorias y aumentando la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$ 1 (Dayan et al., 2011; Foey, 2014; Maggini et al., 2010). Asimismo, las MSCs pueden tener efectos inhibitorios sobre la maduración de las células dendríticas (Prockop and Oh, 2012). Además, las MSCs tienen un fuerte efecto inhibitorio sobre la función de las células NK el cual se encuentra mediado por factores solubles tales como indoleamino 2,3-

dioxigenasa (IDO) y prostaglandina E2. Estos factores suprimirían la proliferación mediada por IL-2, su actividad citolítica, y la producción de citoquinas (Spaggiari et al., 2008). Por último, en estudios *in vitro* se demostró que las MSCs pueden inhibir la apoptosis, la expresión de moléculas de adhesión y la capacidad de migrar de los neutrófilos. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que en el nicho de médula ósea, las MSCs protegen a los neutrófilos de la apoptosis y preservan sus funciones efectoras. Más aun, las MSCs pueden también reducir la intensidad del estallido respiratorio por parte de los neutrófilos así como la activación inapropiada del metabolismo oxidativo (Raffaghello et al., 2008).

Por todo lo descrito, se está investigando actualmente la aplicación potencial de las MSCs en patologías relacionadas con procesos inflamatorios y/o autoinmunes, como la esclerosis múltiple o la enfermedad del injerto contra el huésped (Wolff et al., 2009; Zappia et al., 2005). Asimismo, el proceso fibrogénico, como se describió previamente, incluye fases de desarrollo de procesos inflamatorios por lo que también se ha sugerido y se encuentra en estudio la aplicación de MSCs en modelos experimentales *in vivo* con el objeto de modular dichos eventos y así evitar la progresión de la fibrosis hepática.

### **1.3.6 Capacidad migratoria de las MSCs hacia sitios de injuria e inflamación**

Las MSCs han sido propuestas como una herramienta celular potente involucrada en los mecanismos de reparación tisular (Chapel et al., 2003), lo cual se vería facilitado por la capacidad de estas células de migrar hacia sitios de injuria e inflamación (Francois et al., 2006; Kidd et al., 2009; Volarevic et al., 2014). En condiciones fisiológicas estas células se encontrarían circulando en sangre periférica en muy bajas cantidades, mientras que la mayoría residiría en la médula ósea (Kuznetsov et al., 2001; Mansilla et al., 2006). En respuesta a señales endocrinas liberadas luego de una injuria, como por ejemplo un aumento en la concentración de

VEGF y G-CSF en sangre periférica, las MSCs se movilizarían dentro del torrente sanguíneo y migrarían al sitio de lesión a fin de regenerar el tejido dañado (Karp and Leng Teo, 2009; Mansilla et al., 2006; Tondreau et al., 2005; Wang et al., 2008). Consistente con ello, se ha observado en pacientes con cáncer o cirrosis hepática que células con propiedades de generar cultivos de MSCs se movilizan desde la médula ósea por el flujo sanguíneo en cantidades significativamente superiores que en individuos sanos (Fernandez et al., 1997; Lorenzini et al., 2008; Tondreau et al., 2005). Asimismo, en el microambiente que se genera durante el proceso fibrogénico se producen altos niveles de citoquinas que han sido involucrados en la migración de las MSCs, tales como VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ , MCP-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, SDF-1 (Bayo et al., 2014). Si bien se desconocen en gran medida los mecanismos mediante los cuales las MSCs interactúan con los capilares del tejido dañado, se postulan para las MSCs los descriptos para la migración y extravasación leucocitaria (Ley et al., 2007). En este sentido, mediante experimentos de bloqueo empleando anticuerpos contra proteínas involucradas en el tipo de interacciones que podrían tener lugar se ha demostrado que la adhesión al endotelio activado por parte de las MSCs estaría mediada por P-selectina y por la interacción de VLA-4/VCAM-1 (Ip et al., 2007; Ruster et al., 2006). Luego de la unión a las células endoteliales activadas, se requiere que tenga lugar un proceso de trans migración a través de las mismas y de la membrana basal subyacente, inducida mediante estímulos quimiotácticos. Las MSCs expresan numerosos receptores de citoquinas y factores de crecimiento los que han sido previamente caracterizados en la migración tanto de leucocitos así como de células madres hematopoyéticas (Spaeth et al., 2008). Se ha sugerido que la mayoría de los ligandos que se unen a estos receptores inducen quimiotaxis, migración transendotelial, activación de moléculas de adhesión y actividad de metaloproteasas

en las MSCs (Ko et al., 2009; Ponte et al., 2007; Segers et al., 2006; Smith et al.; Spaeth et al., 2008; Steingen et al., 2008; Tondreau et al., 2009).

### **1.3.7 Uso de las MSCs en el tratamiento de la fibrosis hepática**

Teniendo en cuenta la capacidad de las MSCs de migrar hacia sitios de injuria y remodelación tisular, así como sus propiedades regenerativas e inmunomoduladoras, se ha propuesto el empleo de las mismas para el tratamiento de la cirrosis hepática. Como fue explicado previamente, esta patología se caracteriza por un proceso crónico de lesión-inflamación-cicatrización que conduce a la distorsión de la arquitectura hepática y a la formación de nódulos de regeneración. Resultados de estudios previos realizados en animales sugieren que las MSCs podrían ser utilizadas para revertir el proceso fibrótico, inhibiendo el depósito de colágeno y la producción de TGF- $\beta$ 1 (Banas et al., 2008; Tsai et al., 2009). Recientemente, en un modelo de fibrosis inducido por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), se demostró que esta inhibición estaría dada por una supresión directa de la activación de las células estrelladas hepáticas a través de la inhibición de la proteína Dlk1 (Pan et al.). Asimismo, en los últimos años se ha avanzado significativamente en ensayos clínicos a través de la aplicación de MSCs en pacientes cirróticos y se han demostrado efectos beneficiosos relativos para el tratamiento de la cirrosis hepática. En algunos casos se observaron mejorías a nivel de funcionalidad hepática y calidad de vida de los pacientes tratados, demostrando además eficiencia en la modulación de procesos inflamatorios (Ma et al., 2015; Mohamadnejad et al., 2007; Wang et al., 2013; Xu et al., 2014).

## **1.4 Terapia génica y MSCs**

Con el objetivo de aumentar la eficacia terapéutica se han utilizado las MSCs como vehículo de genes terapéuticos en modelos experimentales de cirrosis hepática

(Aquino et al., 2010). Por ejemplo, se observó que la aplicación de MSCs transfectadas con un plásmido o un adenovirus que codifican el gen del factor de crecimiento hepatocitario (HGF) resultó en una reducción en la acumulación de colágeno en el hígado y en un aumento de la migración de las MSCs hacia el tejido lesionado (Ishikawa et al., 2011; Kim et al., 2014).

La terapia génica podría definirse como la transferencia de material génico exógeno a células, tejidos u órganos para corregir un defecto genético o conferir una nueva función biológica con el propósito de prevenir o tratar una enfermedad (Anderson, 2000). El material génico que puede ser transferido es muy diverso y entre los de mayor uso se encuentran los genes completos (Schiedner et al., 1998), moléculas antisentido (Dias and Stein, 2002), o ARN de interferencia (Shim and Kwon, 2010). La transferencia de material genético a los tejidos o a las células puede realizarse *in vivo* o *ex vivo*. El procedimiento *ex vivo* requiere el aislamiento de las células diana, su cultivo *in vitro*, la transferencia del material genético y, posteriormente, la reintroducción de las células en el huésped. Por el contrario, en el procedimiento *in vivo*, el material genético se introduce directamente en el organismo sin aislar previamente a las células diana. Como se describe a continuación para la transferencia del material génico es necesaria la utilización de un vehículo o vector que facilite la introducción de dicho material génico.

#### **1.4.1 Vectores**

Un vector ideal es aquel capaz de transferir el material genético a las células deseadas de una manera segura y específica pudiendo expresar las cantidades adecuadas del gen que contiene (Prieto et al., 2004). Además, el vector ideal no debe resultar tóxico para las células o el huésped, ni inmunogénico. Los vectores pueden ser de dos tipos: no virales o físicos y virales.

#### **1.4.1.1 Vectores no virales.**

Existen numerosos métodos de transferencia génica basados en vectores no virales. En general son simples y fáciles de preparar, permiten transferir moléculas de gran tamaño, son poco inmunogénicos, su toxicidad suele ser baja y son seguros. Sin embargo, la eficacia de transferencia génica alcanzada suele ser baja y son poco específicos en cuanto a las propiedades que deban tener las células para que sean transfectables (Ledley, 1995). Los vectores no virales más empleados son el DNA desnudo (plásmidos), los liposomas, la pistola génica, los polímeros catiónicos (poliplejos), los complejos DNA-proteína y los ARN de interferencia.

#### **1.4.1.2 Vectores virales.**

Los más eficaces, y a su vez los más empleados actualmente, son los vectores de tipo viral. Su diseño se realiza mediante la supresión de regiones implicadas en el proceso de replicación viral y la incorporación, en su lugar, del material genético de interés (Prieto et al., 2004). De esta forma el nuevo virus es defectivo, lo que significa que mantiene la capacidad de infectar las células pero es incapaz de replicarse en ellas. Se utilizan diferentes virus para construir vectores, entre ellos los más utilizados son los adenovirus (Ad), los retrovirus (incluyendo lentivirus), virus adenoasociados (AAV), herpesvirus, baciniavirus, entre otros (Waehler et al., 2007).

De particular interés en esta tesis doctoral es el uso de vectores adenovirales. Los adenovirus recombinantes se encuentran entre los vectores virales más empleados (Hall et al., 2010). Son virus pertenecientes a la familia adenoviridae, de estructura icosaédrica, y carentes de envoltura. Están constituidos por ADN y proteína, con una partícula viral de aproximadamente 75 nanómetros de diámetro y un genoma de 36 Kb. Existen 6 subgéneros (A-F) y alrededor de 47 serotipos diferentes de los cuales los tipo 2 y 5 son los más empleados (Hall et al., 2010). El virus posee un



ciclo de replicación dividido en dos fases: una fase temprana que implica a los sucesos que ocurren antes de la replicación del ADN, y otra tardía que se corresponde al empaquetamiento del ADN y armado final de virus. Las proteínas necesarias para la transcripción y replicación viral (regiones E1a y E1b, E2a y E2b, E3 y E4) son expresadas durante la fase temprana. En la fase tardía (L1-L5) lo hacen las proteínas que conformarán la envoltura del adenovirus (Zhang, 1999).

Los vectores adenovirales se construyen mediante la delección de los genes de la región E1, lo cual los convierte en virus defectivos, ya que E1 es un trans-activador del resto de los genes del adenovirus. Los adenovirus recombinantes se propagan en células empaquetadoras que expresan en forma constitutiva la proteína E1 (células 293) (Graham et al., 1977). Los adenovirus no integran su material genético en el genoma del huésped permaneciendo en las células infectadas de forma episomal, por lo que su expresión es transitoria (Volpers and Kochanek, 2004). Otros tipos de virus (retrovirus y lentivirus) si bien permiten una producción prolongada del transgen los mismos infectan células en división celular (retrovirus) e insertan aleatoriamente su material genético en múltiples sitios del genoma, lo que supone riesgos de bioseguridad con vistas a su empleo terapéutico.

Los adenovirus penetran las células que infectan a través de un proceso de endocitosis dependiente de receptores, mecanismo que se inicia cuando la fibra proteica se une al receptor de superficie. El receptor de virus coxsackie y adenovirus (CAR) y la cadena pesada del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de tipo I han sido descritos como las proteínas capaces de unir el virus a las células e iniciar la entrada a las mismas (Bergelson et al., 1997).

#### **1.4.2 Terapia génica aplicada a la fibrosis hepática**

En los últimos años se ha avanzado significativamente en el empleo de herramientas de terapia génica para el tratamiento de la cirrosis hepática en modelos experimentales (Salazar-Montes et al., 2015). En relación con la utilización de vectores físicos, por ejemplo, se han utilizado plásmidos o liposomas para incorporar genes que induzcan la regeneración hepática o inhiban el progreso de la fibrosis. Sin embargo, si bien se han obtenido resultados positivos luego de su aplicación, estos fueron limitados debido a la baja eficiencia y durabilidad de la expresión génica. Hasta el momento no se ha reportado el empleo de vectores virales en ensayos clínicos en fibrosis hepática; sin embargo, considerando las ventajas que presentan, los vectores de tipo virales han sido los más utilizados en modelos experimentales. En este contexto, con el fin de revertir la fibrosis se han aplicado adenovirus que expresan genes como el activador de plasminógeno tipo uroquinasa humano (Ad-huPA) (Miranda-Díaz et al., 2004), metaloproteasa tipo 1 (Ad-MMP1) (Salazar-Montes et al., 2015) y metaloproteasa tipo 8 (Ad-MMP8) (García-Banuelos et al., 2002; Siller-López et al., 2004). Asimismo, el empleo de adenovirus con el objeto de bloquear vías de señalización de mediadores clave en el proceso de fibrogenesis, como TGF- $\beta$ 1 (AdT $\beta$ RII $\Delta$ cyt que codifica para receptor dominante negativo de TGF- $\beta$ 1, Ad5-CMV-AS-TGF- $\beta$ 1 que expresa la secuencia antisentido de TGF- $\beta$ 1) (Arias et al., 2003) o PDGF (Ad5-CMV-asPDG, adenovirus antisentido para PDGF), han resultado también eficaces en reducir el grado de fibrosis hepática (Salazar-Montes et al., 2015).

Por otra parte, otro vector terapéutico empleado para vehicular la transferencia génica en modelos de fibrosis hepática fue el virus SV40 (virus del simio 40) (Vera et al., 2007). SV40 es un virus desnudo icosaédrico con un genoma de ADN bicatenario que reconoce en las células proteínas del CMH tipo I a través de una glicoproteína vírica (VP1) para ser endocitado posteriormente a través de vesículas.

Se han reportado estudios en modelos experimentales de cirrosis establecida en los que el tratamiento con el virus SV40 codificante para IGF-I redujo el daño hepatocelular, disminuyó la expresión de genes profibrogénicos y estimuló la fibrólisis; lo que condujo a una mejora en la funcionalidad del hígado y a una reducción del grado de fibrosis hepática (Sobrevals et al., 2010). Si bien estos resultados son promisorios, la utilización de vectores virales presenta algunas limitaciones ya que la expresión del transgen es transitoria y cuando son administrados directamente en el huésped pueden generar respuesta inmunitaria innata o específica tanto contra proteínas virales como contra el transgen. Como consecuencia de esta respuesta inmunitaria la vida media de estos vectores es reducida y puede generar efectos colaterales no deseados en el huésped cuando son administrados de forma sistémica (Verma and Somia, 1997; Yang et al., 1994).

#### **1.4.3 MSCs como vehículo de genes terapéuticos**

Como fue comentado en la sección anterior, el empleo de las herramientas disponibles hasta el momento para terapia génica tiene limitaciones. Si bien con virus, por ejemplo, se obtiene la expresión del transgen sostenida en el tiempo durante algunos días, posteriores aplicaciones del tratamiento podrían generar rechazo debido a la memoria inmunológica, en particular cuando se utilizan adenovirus de primera generación. Por estos motivos, surgen como nuevas alternativas la combinación de terapias celulares y génicas a modo de protección de transgen. En particular, la capacidad de las MSCs de migrar preferencialmente a sitios de lesión e injuria sumado a que son capaces de evadir y modular la respuesta del sistema inmunológico las convierte en excelentes potenciales transportadores de vectores terapéuticos. Son numerosos los artículos científicos de reciente aparición que aplican MSCs como vehículo de genes en la fibrosis hepática experimental como estrategia terapéutica. Por ejemplo, se ha reportado que la aplicación en ratas cirróticas de MSCs

transducidas con un adenovirus que codifica para el factor inhibidor del plasminógeno (AdhuPA) mejora la función hepática en mayor medida que las MSCs sin transducir (Avital et al., 2001; Sun et al., 2008). Los mecanismos involucrados serían: la reducción del grado de fibrosis y de la activación de las CEHs y la expresión de TGF- $\beta$ 1 y colágeno I/III, y un aumento en la expresión de MMPs y HGF y en la proliferación de hepatocitos. Asimismo, la aplicación de MSCs sobreexpresando IL10 (Ad5-IL10) generó una disminución de la inflamación y fibrogénesis hepática estimulando la proliferación de células parenquimáticas. Esto resultó en la mejora de la función hepática (Lan et al., 2008). Resultados similares se obtuvieron en un modelo de cirrosis en ratas inducido por dimetilnitrosamina. La administración por vía esplénica de MSCs transducidas con un adenovirus para expresar HGF tuvo un efecto terapéutico superior al de las MSCs sin infectar (Kim et al., 2014).

## ***Hipótesis y Objetivos***

---

## 1.5 Hipótesis

Las MSCs constituirían excelentes transportadores de genes que codifiquen proteínas terapéuticas para modular el proceso fibrogénico hepático y la aplicación combinada de una terapia celular con una terapia génica basada en el empleo de estas células modificadas genéticamente para producir exógenamente IGF-I resultaría eficaz en distintos modelos de fibrosis hepática establecida. La capacidad inmunomoduladora y de migración a sitios de lesión e injuria de las MSCs sumado a la posibilidad de manipularlas genéticamente *ex vivo* mediante vectores virales o no-virales podría evitar la respuestas inmunitaria del huésped hacia el vector y su transgen luego de múltiples aplicaciones, al mismo tiempo que constituiría un sistema de liberación tejido específico de factores, de forma sostenida y por tiempos más extensos. La *hipótesis principal* de este trabajo de tesis es que las MSCs tendrían un efecto beneficioso sobre la fibrosis hepática avanzada y que dicho efecto sería superior si se utilizaran estas células como vehículo de genes terapéuticos tales como IGF-I. Para esto, proponemos estudiar en modelos experimentales *in vivo* de cirrosis hepática inducidos en ratón la aplicación de células madres mesenquimales de médula ósea manipuladas genéticamente mediante un adenovirus que contiene la secuencia codificante de IGF-I para sobreexpresar esta proteína y facilitar su liberación en el hígado fibrótico.

## 1.6 Objetivos Generales

Los objetivos generales de este trabajo fueron evaluar el potencial terapéutico de las células madres mesenquimales (MSCs) de médula ósea de ratón al modificarlas genéticamente para sobreexpresar IGF-I y analizar los mecanismos involucrados en su posible efecto.

## 1.7 Objetivos Específicos

1. Generar y caracterizar cultivos de MSCs en cuanto a su perfil de expresión y su potencial de diferenciación.
2. Analizar la supervivencia de MSCs en el hígado cirrótico.
3. Determinar el efecto terapéutico de modificar genéticamente MSCs para la expresión de IGF-I o GFP (control).
4. Caracterizar los mecanismos involucrados en el efecto terapéutico de las MSCs modificadas o no genéticamente para la expresión de IGF-I.
5. Evaluar el rol de los macrófagos en la resolución de la fibrosis hepática mediada por las MSCs.
6. Caracterizar el efecto antifibrótico de aplicar múltiples dosis de MSCs, modificadas o no genéticamente para la expresión de IGF-I, en ratones inmunocompetentes.

## ***Materiales y Métodos***

---



## **2 Materiales y Métodos**

### **2.1 Líneas celulares**

La línea celular HEK 293 se utilizó para la amplificación y purificación de los adenovirus (ATCC CRL-1573). La línea celular empaquetadora HEK293 deriva de células de riñón embrionario humano. Está transfectada de manera estable con el gen que codifica para la región E1 perteneciente al adenovirus humano tipo 5 (Ad5), transformación que permite que los adenovirus empleados puedan replicarse y amplificarse en el interior de estas células, por poseer dicha región que se encuentra eliminada en la secuencia de los adenovirus que se utilizan en estos experimentos. El medio de cultivo empleado fue DMEM (Dulbecco Modified Minimal Essential Medium) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (%v/v) inactivado a 56°C, 2 mM glutamina, 100 µg/ml estreptomina y 100 UI/ml penicilina.

Para ensayos *in vitro* se utilizó la línea de CEHs, CFSC-2G (cedida por le Dr. Rojkind, Albert Einstein College of Medicine, NY). Esta línea celular fue generada por inmortalización espontánea a partir de hígados de ratas Wistar cirróticas. Las células fueron obtenidas por perfusión con colagenasa seguida de un gradiente de Percoll. Luego del clonado por dilución límite se seleccionaron 4 clones diferentes, uno de los cuales fue denominado CFSC-2G. Las células CFSC-2G expresan colágeno tipo I y III, así como también desmina, vimentina, fibronectina, laminina y TGF-β1 (Greenwel et al., 1991). El medio de cultivo empleado fue MEM (Minimum Essential Medium) suplementado con aminoácidos esenciales, SFB al 10% (%v/v), 2 mM glutamina, 100 µg/ml estreptomina, 100 UI/ml penicilina.

## **2.2 Producción de vectores adenovirales**

Los adenovirus recombinantes utilizados en este trabajo de tesis, AdIGF-I y AdGFP, fueron gentilmente provistos por el Dr. Rodolfo Goya (Universidad Nacional de La Plata). El AdIGF-I contiene la secuencia codificante de IGF-I regulada por una secuencia promotora de expresión en células eucariotas (CMV). Para la construcción del AdIGF-I, realizada por el equipo del Dr. Goya, se empleó el sistema comercial AdMax® (Console et al., 2008). Brevemente, mediante digestión enzimática se escindió la secuencia codificante de IGF-I de rata previamente clonada en el plásmido pBluescript KS y luego fue insertada en el sitio de múltiple clonado del plásmido pDC515. El sitio de múltiple clonado del pDC515 se encuentra contenido entre la secuencia promotora de citomegalovirus de ratón (CMV; aguas abajo) y la secuencia de poliadenilación de virus de simio 40 (SV40; aguas arriba) conformando un caset de expresión. Un segundo plásmido utilizado, el pBHGfrt(del)E1,3 FLP, contiene el genoma completo del adenovirus tipo 5 a excepción de las regiones E1 y E3 que se encuentran deletionadas. Posteriormente, se co-transfectaron células HEK293 cells con el pDC515 conteniendo la secuencia de expresión de IGF-I y con el pBHGfrt(del)E1,3 FLP. Por recombinación homóloga, el caset de expresión de IGF-I se inserta dentro del genoma viral generando el vector adenoviral AdIGF-I (Console et al., 2008). Por otro lado, el AdGFP consiste en una construcción similar que contiene la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (GFP, Green Fluorescent Protein), que se utilizará como control y gen reportero en los diferentes experimentos.

### **2.2.1 Preparación del stock y purificación de los vectores adenovirales**

El primer paso en la generación del stock adenoviral consistió en infectar células HEK-293 cultivadas en una placa de 150 mm con una confluencia aproximada del 80%. Se retiró el medio sobrenadante de la placa y se colocaron 8 ml de DMEM

2% SFB, luego las células fueron infectadas con 1-2  $\mu$ l de un stock viral provisto por el Dr. Goya. Tras una incubación de 3 hs con agitación esporádica se agregó medio y las células se incubaron por 18-20 hs. Se colectaron las células y se lisaron por ciclos de congelado/descongelado. Luego de centrifugar por 10 min a 4000 rpm, se utilizó el sobrenadante para infectar 15 placas de 150 mm. Se incubó 2 hs a 37°C con agitación cada 20 m y se esperó 24 h para colectar las células infectadas. Luego de este tiempo las células se centrifugaron y se lisaron por congelado/descongelado. Para obtener el virus, el extracto se centrifugó a 4000 rpm por 10 min y el sobrenadante fue utilizado para purificar el virus amplificado. Se utilizó un gradiente de cloruro de cesio (CICs; 1ml CICs densidad 1,6 + 1ml CICs densidad 1,3) para separar el virus del ADN remanente y de las cápsides vacías. El sobrenadante se sembró sobre el gradiente y se centrifugó a 35000 rpm durante 1,5 hs. Se obtuvieron tres bandas, la banda inferior que corresponde al virus, se extrajo con una aguja y se sometió a una nueva centrifugación. Para ello se colocó la muestra obtenida del primer gradiente sobre 2ml de CICs densidad 1,34 y se centrifugó a 35000 rpm durante 18 hs. De esta forma se obtuvo una nueva banda con virus puro el cual fue dializado en solución de diálisis (1l de PBS / Cl<sub>2</sub>Mg 1mM). El virus se resuspendió en glicerol 10% y las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

### **2.2.2 Titulación de stock adenoviral**

El título de adenovirus fue determinado mediante análisis de formación placas de lisis en cultivo por ensayo de dilución límite. Para ello se infectaron células HEK-293 (1x10<sup>4</sup> células por pocillo) previamente sembradas en placas de 96 pocillos. El adenovirus fue diluido en series de 10 por duplicado. Se removió el sobrenadante de la placa de 96 y se agregó el adenovirus diluido en un volumen de 100  $\mu$ l por pocillo. Se incubaron a 37°C durante un período de 10 días, fecha en la cual fue evaluada la presencia del efecto citopático del virus sobre las células mediante tinción con cristal

violeta. El título de los vectores fue expresado como 50% de dosis infectiva por mililitro sobre células HEK-293 (TCID<sub>50</sub>/ml), que representa el número de partículas virales infectivas por unidad de volumen, aplicando el siguiente calculo:

$$\text{TCID}_{50}/\text{ml} = -\log (X_0 + \frac{1}{2} + 1 * \sum X/n)$$

**X<sub>0</sub>**: exponente de la dilución con 100% de efecto citopático

**X**: número de pocillos con 100% de efecto citopático

**n**: número de réplicas

### **2.3 Cultivo primario de MSCs de médula ósea de ratón**

Para la generación de las MSCs de médula ósea se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c. Los mismos fueron sacrificados por dislocación cervical y se disecaron fémur y tibia. Tras limpiar los huesos de músculo y tejido conectivo adheridos, se extrajo la médula ósea cortando las epífisis y aplicando un flujo de DMEM baja glucosa completo (suplementado con 2 mM glutamina, 100 µg/ml estreptomina y 100 UI/ml penicilina). Una vez obtenidas la suspensión celular, se aisló la fracción mononuclear (PBMNC) mediante un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience) centrifugando a 450xg por 30 m a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X (centrifugando 350xg por 5 m a temperatura ambiente), resuspendiendo las células en DMEM baja glucosa completo suplementado con 10% de SFB. Se realizó el recuento de viabilidad celular con el colorante azul de tripan al 0.05% para determinar las viabilidad celular. Finalmente a se plaquearon a una densidad de 5x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> en DMEM baja glucosa completo suplementado con 10% SFB. Se realizaron cambios de medio cada 72 h hasta obtener una confluencia del 90%, luego se realizó el pasaje de células por tripsinización (tripsina 0,25% + EDTA 1mM) y se sembraron las células a una densidad de 5.000 células/cm<sup>2</sup>. De esta manera las células se cultivaron hasta el pasaje 4,

momento en que fueron caracterizadas fenotípicamente y utilizadas en los ensayos posteriores.

## **2.4 Caracterización de MSCs de médula ósea de ratón**

Las características fenotípicas de las MSCs fueron determinadas mediante citometría de flujo. La caracterización se realizó utilizando los anticuerpos anti-ratón específicos de: SCA-1, CD44, CD105, CD106, Ter-119, GR-1, CD3, CD11b, CD31, CD45, CD45R y CD117. Todos los anticuerpos fueron incubados durante 30 m, y las muestras fueron analizadas utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson). La información obtenida fue analizada utilizando el programa WinMDI 2.8 (ScrippsInstitute, LaJolla, CA).

Para los ensayos de diferenciación las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, y cultivadas con los respectivos medios de diferenciación.

**Diferenciación a osteocitos:** Las células fueron cultivadas durante 28 días, realizando cambios de medio cada 72 h, en DMEM baja glucosa completo suplementado con 10% de SFB, 10 µg/mL de insulina, 50 µg/mL de ácido ascórbico, 100 nM de dexametasona y 10mM de Niβ-glicerofosfato. La detección de las áreas calcificadas fue realizada mediante la tinción de rojo alizarina (Sigma).

**Diferenciación a adipocitos:** Las células fueron cultivadas durante 28 días, realizando cambios de medio cada 72 h, en DMEM baja glucosa completo suplementado con 10% de SFB, 10 µg/mL de insulina, 0,5 µM de hidrocortisona, 0.5 µM de isobutilmetilxantina (IBMX) y 60 µM de indometacina. La diferenciación fue revelada mediante la tinción con el colorante Oil-Red, la cual sirve para la detección inclusiones lipídicas.

**Diferenciación a condrocitos:** Las células fueron cultivadas durante 21 d, realizando cambios de medio cada 72 horas, en DMEM baja glucosa completo suplementado con 10% de SFB, 50 µg/mL de ácido ascórbico, 100 nM de dexametasona, 6.25 µg/mL transferrina, 6.25 µg/mL de selenito, 5.33 µg/mL de ácido linoleico, 10 ng/mL de TGF-β (Preprotech) y 1.25 µg/mL de BSA. La diferenciación a condrocitos fue detectada por la tinción con ácido periódico de Schiff (PAS), revelando los mucopolisacáridos neutros (magenta) y ácidos (azul). Todos los reactivos utilizados fueron comprados a Sigma-Aldrich.

## **2.5 Transducción de MCS con adenovirus**

### **2.5.1 Puesta a punto**

En primera instancia se pusieron a punto las condiciones óptimas de infección para obtener máximos niveles de expresión de la proteína de interés sin afectar las características fenotípicas y funcionales de las MSCs. Para esto, se infectaron las células a distintas multiplicidades de infección (MOI; es el número de partículas virales infectivas por célula) y se evaluó su expresión a distintos tiempos post-infección (1 a 12 días). En el caso del AdGFP, los niveles de expresión se evaluaron directamente por microscopía fluorescente; y en el caso del AdIGF-I dosando IGF-I por ELISA (R&D System) en el sobrenadante de cultivo de las MSCs infectadas. La infección se llevó a cabo incubando las células con el virus en medio bajo en suero (DMEM baja glucosa, 2% FBS y antibióticos) con la mitad del volumen correspondiente a la superficie cultivada durante las dos primeras horas post-infección agitando cada 15 m para facilitar la difusión del virus y el contacto con las células. Luego de transcurridas las dos horas se completó el volumen con medio completo (DMEM baja glucosa, 10% FBS y antibióticos).

### **2.5.2 Preparación de las MSCs modificadas genéticamente para experimentos in vivo**

Las MSCs se plaquearon en un 70% de confluencia y se incubaron con el AdIGF-I (AdIGF-I-MSCs) o AdGFP (AdGFP-MSCs) a la MOI determinada por la puesta a punto. Luego del tiempo óptimo de infección, las células se colectaron por tripsinización (tripsina 0,25% + EDTA 1mM), se lavaron 2 veces con PBS 1X y se diluyeron a una concentración de  $1,2 \times 10^6$  células/ml en PBS más ADNasa (Roche) 0,1 mg/ml.

### **2.5.3 Preparación de medios condicionados de las MSCs para ensayos in vitro**

La infección de las MSCs se realizó de la misma manera que se describió en el ítem anterior. En este caso, luego del tiempo óptimo de infección, las AdIGF-I-MSCs y AdGFP-MSCs fueron lavadas con PBS 1X y cultivadas durante 24 horas en DMEM completo sin SFB. Posteriormente se colectaron los sobrenadantes y se centrifugaron durante 30 minutos a 16000xg a fin de eliminar posibles restos celulares. Los sobrenadantes así generados fueron guardados hasta el momento de su utilización en freezer de -70°C.

## **2.6 Efecto de la infección con adenovirus sobre las propiedades inmunológicas de las MSCs**

### **2.6.1 Caracterización fenotípica de MSCs infectadas con adenovirus**

Mediante citometría de flujo se analizó la posibilidad de que la infección con adenovirus afectara la expresión de las moléculas de superficie de las MSCs. Para esto, además de los marcadores descritos en el punto 2.4, se evaluaron moléculas

de co-estímulo implicadas en la presentación antigénica como CD80 (PE, BD Bioscience), CD86 (APC, BD Bioscience) y MHCII (APC, BD Bioscience).

### **2.6.2 Ensayo de Cultivo Mixto Linfocitario (MLR)**

Mediante un ensayo de tipo MLR se evaluó la reactividad de células T contra las AdIGF-I-MSCs y las AdGFP-MSCs. Se plaquearon MSCs (control sin infección), AdGFP-MSCs o AdIGF-I-MSCs ( $1 \times 10^4$  células/pocillo) en una placa de 96 pocillos. Al día siguiente las células fueron tratadas por 20 minutos con 50 mg/mL de mitomicina C (Sigma) para inhibir la proliferación. Luego, sobre las MSCs se sembraron esplenocitos derivados de ratones C57Bl/6 ( $50 \times 10^4$  células/pocillo) y se incubaron por 48 horas. Durante las últimas 18 horas se pulsaron las células con timidina tritiada 1  $\mu$ Ci/ml (actividad específica 20 Ci/ml; Perkin Elmer). Posteriormente, las células fueron lisadas con NaOH 0,1 M y SDS 1%, se precipitó el ADN con ácido tricloroacético 40% y se traspasó a un papel de filtro. Finalmente se lavó el ADN con ácido tricloroacético 10% y luego con etanol 100%. Se midió la incorporación radioactiva utilizando un contador de centelleo (BeckmanLS 6500). Cada muestra fue sembrada por sextuplicado y la proliferación de células T se expresó en cuentas por minutos (CPM).

### **2.6.3 Determinación de anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus**

El título de anticuerpos anti-adenovirus se determinó por un ensayo de neutralización viral. Para esto, ratones BALB/c recibieron 3 dosis de MSCs o AdGFP-MSCs (a día 7, 10 y 13) y se tomaron muestras de sangre para obtener suero a día 0 (basal), 10, 14 y/o 21. Posteriormente, se mezcló 100ul de una solución de 1TCDI50 AdGFP/ul con suero en diluciones seriadas al cuarto y se incubó a 37°C por 30 minutos. Después se agregó la mezcla a células HEK293 previamente plaqueadas en placas de 96 pocillos ( $2 \times 10^4$  células/pocillo). Luego de 5 días se evaluó la formación de placas de lisis. Como control positivo se utilizó suero de animales inmunizados con



AdGFP y suero fetal bovino como control negativo. Cada condición se sembró por triplicado y el título se calculó como la inversa de la dilución máxima a la cual no se observó efecto citopático en ninguno de los pocillos.

## **2.7 Experimentos *in vitro***

Para evaluar el efecto de los factores liberados por las MSCs sobre las células involucradas en la fibrosis hepática, se realizaron ensayos *in vitro* pre-incubando CEHs y hepatocitos con sobrenadante de las MSCs. Para esto se utilizó el sobrenadante de las AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs generados como se describió en el ítem anterior.

### **2.7.1 Efecto sobre las CEHs**

Células CFSC-2G fueron incubadas por 18 y 40 horas con DMEM (control) o sobrenadante de AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs. Para evaluar la expresión de genes, luego del tiempo de incubación, se colectaron las células en Trizol (Sigma-Aldrich Co), y se extrajo ARN total para sintetizar ADN copia (ADNc). Por qPCR se cuantificó el ARN mensajero (ARNm) de TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA and COL1A2 (detallados en la sección **Tabla 2**). La expresión de cada gen se expresó como las veces de cambio (*Fold Change*) respecto al control de las células sin tratar (DMEM). Para cuantificar la producción de factores (a nivel proteico), luego del tiempo de incubación con los distintos tratamientos, las CEHs fueron lavadas con PBS 1X y cultivadas en DMEM sin SFB durante 24 horas. Luego se colectó este sobrenadante sobre el cual se determinó la concentración de TGF- $\beta$ 1 por ELISA. Alternativamente, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% para realizar inmunofluorescencia (IF) sobre las células pre-tratadas.

### **2.7.2 Efecto sobre hepatocitos**

Los hepatocitos fueron aislados a partir de ratones BALB/c adultos por perfusión local del hígado. Brevemente, el hígado fue perfundido con buffer de lavado (Hank's balance salt solution) a través de la vena porta por medio de una cánula, seccionando la vena cava para evacuar la sangre y soluciones que lo atraviesen. Posteriormente se digirió con colagenasa V (Sigma-Aldrich Co.) durante 15 minutos y se extrajo el hígado. Luego se removieron las células de la cápsula, las células hepáticas fueron recolectadas y centrifugadas a 200xg. Finalmente fueron lavadas y plaqueadas en DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB a una densidad de  $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Después de 3 horas, se cambió el medio removiendo las células en suspensión y quedando los hepatocitos adheridos a la placa de cultivo. Al día siguiente, los hepatocitos fueron incubados por 18 horas con DMEM (control sin tratar) o sobrenadante de AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs. Luego de este tiempo, se recolectaron los hepatocitos en Trizol para extraer ARN total y analizar la expresión de ARNm de IGF-I, HGF y PCNA.

## **2.8 Efecto terapéutico de las MSCs transducidas con adenovirus sobre la fibrosis hepática**

### **2.8.1 Animales**

En los estudios realizados se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de entre 6 y 8 semanas de edad comprados a la Comisión de Energía Atómica (CNE, Ezeiza, Buenos Aires). Los animales fueron mantenidos en el bioterio de nuestra institución (Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Pilar, Buenos Aires) de acuerdo a las normas indicadas en la "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" (National Academy Press, Washington, D.C. 1996).

### **2.8.2 Modelo de inducción de fibrosis con TAA**

Se administró TAA de forma intraperitoneal (i.p.) a animales BALB/c 3 veces por semana durante 8 semanas. Se utilizó una dosis de 200 mg/kg de peso corporal. En la semana 6 de inducción de fibrosis, se administró solución salina por vía intravenosa (vehículo; control sin tratamiento),  $5 \times 10^5$  AdGFP-MSCs (control de células modificadas genéticamente) o  $5 \times 10^5$  AdIGF-I-MSCs (tratamiento experimental). Se tomaron muestras de sangre e hígado a 1, 3 y 14 días post-tratamiento. En sangre se dosaron los niveles de transaminasas hepáticas (AST y ALT), albúmina e IGF-I. En muestras de hígados se realizaron estudios anatomo-patológicos y extracción de ARN y proteínas.

### **2.8.3 Comparación del efecto terapéutico de las AdIGF-MSCs contra IGF-I recombinante**

Con el objetivo de comparar el efecto terapéutico mediado por las MSCs con la administración de rIGF-I, se diseñaron nuevos experimentos donde a los grupos descritos en el punto anterior se adicionaron dos grupos complementarios. Estos grupos consistieron en ratones que luego de 6 semanas de inducción de fibrosis hepática recibieron AdGFP-MSCs más rIGF-I o rIGF solo. La proteína recombinante se administró por vía subcutánea durante los 14 días de tratamiento dividida en dos dosis diarias a una concentración  $0,5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  de ratón por dosis. Los ratones que no recibieron rIGF-I fueron inyectados con vehículo para exponerlos a todos al mismo estrés. Luego de este tiempo se sacrificaron los ratones y se tomó muestras de hígado para evaluar el efecto terapéutico mediante tinción de colágeno y el efecto sobre la activación de las CEHs por medio de inmunohistoquímica contra  $\alpha$ -SMA (secciones 2.11 y 2.12).

#### **2.8.4 Modelo de inducción de fibrosis por ligadura del conducto colédoco**

Como un modelo alternativo al desarrollo de fibrosis por TAA se utilizó el de ligadura del conducto colédoco. Ratones BALB/c de 8 semanas de edad, fueron anestesiados por inhalación de isofluorano. Se practicó una laparotomía medial y tras exponer la vía biliar extrahepática se ligó el conducto colédoco con seda 5-0, realizando una doble sutura. A los 2 días de haberse realizado la cirugía, se administraron las células ( $5 \times 10^5$  AdIGF-I-MSCs o AdGFP-MSCs) o solución salina como control sin tratamiento, por vía sistémica. Los animales fueron sacrificados 6 días post-tratamiento y se obtuvieron muestras de sangre y/o hígado para su posterior análisis.

### **2.9 Efecto de las MSCs transducidas con adenovirus sobre la actividad biológica de los macrófagos hepáticos**

Para evaluar el efecto de las MSCs y los factores liberados por las mismas sobre los macrófagos hepáticos, se realizaron experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los experimentos *in vitro* consistieron en aislar macrófagos hepáticos de ratones con fibrosis establecida y exponerlos al sobrenadante de las AdIGF-I-MSCs o AdGFP-MSCs, mientras que los experimentos *in vivo* consistieron en analizar la presencia de macrófagos en el hígado un día posterior al tratamiento y extraerlos para evaluar la expresión de genes.

#### **2.9.1 Experimentos *in vitro***

##### **2.9.1.1 Aislamiento de macrófagos hepáticos**

Se establecieron cultivos primarios de macrófagos hepáticos a partir de hígados de ratones Balb/C sanos o con fibrosis establecida (6 semanas de aplicación de tioacetamida) (sección 2.8.2). Para el aislamiento de macrófagos se aplicó un

protocolo de perfusión *in situ*. Brevemente, los hígados fueron perfundidos con buffer de lavado (Hank's balance salt solution), a través de la vena porta por medio de una cánula y seccionando la vena cava inferior para evacuar la sangre y otras soluciones utilizadas. Posteriormente, para digerir la matriz extracelular y liberar las células de la cápsula del hígado se incubó con colagenasa V (Sigma-Aldrich Co.), durante 15 minutos. Se filtró la suspensión celular por una malla de 70  $\mu$ m y se centrifugó a 500 rpm para decantar los hepatocitos. Posteriormente, se centrifugó el sobrenadante a 1250 rpm por 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo RPMI y se sembró en una solución de Nicodenz al 30%, lo que permitió la generación de un gradiente de densidad y separar así la fracción parenquimatosa (hepatocitos y colangiocitos) de la no parenquimatosa (macrófagos hepáticos, CEHs, células endoteliales, etc). Luego de centrifugar durante 20 minutos a 2700 rpm se observó una banda intermedia, conteniendo la fracción no parenquimatosa, y al fondo del tubo un pellet con hepatocitos y restos celulares. Se cosechó esa banda intermedia, se lavó con medio RPMI y se resuspendió para contar y sembrar las células obtenidas. A partir de esta fracción celular se separaron los macrófagos hepáticos, por adhesión de los mismos al plástico de placas de cultivo: a los 30 minutos de incubación se desechó la fracción no adherente.

#### **2.9.1.2 Cultivo de macrófagos hepáticos con sobrenadante de MSCs transducidas con adenovirus.**

Los macrófagos hepáticos fueron aislados como se describió en la sección anterior y fueron incubados, durante 18 horas, con DMEM (control) o sobrenadante de AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs. Para evaluar la expresión de genes, luego del tiempo de incubación, se colectaron las células en Trizol (Sigma-Aldrich Co), y se extrajo ARN total para sintetizar ADN copia (ADNc). Por qPCR, se cuantificó el ARN mensajero (ARNm) (detallado en la sección 2.13) de Arginasa-1, iNOS, IGF-I, HGF, TGF- $\beta$ 1,

TNF- $\alpha$ , IL10, IL6, IL1b (**Tabla 1**). Los niveles de ARNm de cada gen fueron expresados como las veces de cambio (Fold Change) respecto al control de las células sin tratar con sobrenadante (DMEM). Con el objeto de cuantificar al nivel de proteínas la producción de factores, luego del tiempo de incubación con los distintos tratamientos las células fueron lavadas con solución salina y cultivadas en DMEM sin SFB durante 24 horas. Se recolectó el sobrenadante de esos cultivos y se determinó en los mismos, mediante ELISA, la concentración de IGF-I, TNF- $\alpha$ , IL12, IL10 e IL6. A partir de las mismas muestras de sobrenadantes se determinó la actividad gelatinasa de MMP2 y MMP9. Finalmente, se obtuvieron extractos de proteínas totales de las células utilizadas, sobre los cuales también se hicieron determinaciones de expresión proteica por ELISA.

### ***2.9.1.3 Determinación de niveles proteicos en el sobrenadante de macrófagos hepáticos.***

Mediante ELISA se determinaron los niveles de expresión en sobrenadante de IGF-I, IL12 e IL10 (R&D), al igual que de IL6 y TNF $\alpha$  ((BD Bioscience). En todos los casos se siguieron los protocolos de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes. Las determinaciones se hicieron por duplicado al menos dos veces para cada proteína.

### ***2.9.1.4 Efecto de los macrófagos hepáticos pre-condicionados con sobrenadantes de MSCs transducidas con adenovirus sobre CEHs.***

Con el objetivo de evaluar el efecto que ejercen los macrófagos hepáticos modulados por las MSCs sobre las CEHs, células CFSC-2G fueron incubadas durante 18 horas con los sobrenadantes de macrófagos pre-tratados con DMEM o con el medio condicionado de las AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs. Nuevamente, para evaluar

la expresión de genes se recolectaron las células en Trizol (Sigma-Aldrich Co), y se extrajo ARNm total para sintetizar ADNc. Por QPCR se cuantificó el ARNm de TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA and COL1A2 (detallado en la sección 2.13). La expresión de cada gen se expresó como las veces de cambio (Fold Change) con respecto al control de las células sin tratar con sobrenadante (DMEM).

### **2.9.2 Experimentos *in vivo***

Los experimentos *in vivo* fueron realizados en base al diseño experimental mediante el cual se evaluó el efecto terapéutico, con la salvedad de que las muestras fueron tomadas al día de haberse aplicado el tratamiento. Brevemente, luego de 6 semanas de inducción de fibrosis con TAA se administró por vía intravenosa solución salina (vehículo; como control sin tratamiento celular) y  $5 \times 10^5$  AdGFP-MSCs (control celular) o AdIGF-I-MSCs. Al día siguiente, los ratones fueron sacrificados y se tomaron muestras de hígado o se aislaron macrófagos hepáticos.

#### **2.9.2.1 Cuantificación de macrófagos presentes en el hígado**

La evaluación de los posibles cambios en el número de macrófagos hepáticos se realizó mediante inmunohistoquímica para F4/80. Con este fin, el tejido hepático fue congelado rápidamente en OCT y seccionado en un espesor de 12  $\mu$ m, mediante uso decriostato. Los cortes fueron fijados directamente en formalina alcohólica durante 15 min. Se realizó bloqueo y permeabilización celular, mediante incubación en 5% suero normal de burro (NDS), 2% BSA, 0.3% triton-X en PBS1x, durante 30 min en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Las secciones fueron luego incubadas ON a 4°C con un anticuerpo monoclonal de rata anti-F4/80 murino (abcam) en una dilución 1:350, en 0,1% BSA, 0,3% tritón en PBS. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS, de 15 min cada uno y la incubación con un anticuerpo secundario anti-rata, generado en burro, conjugado a Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes) en una dilución 1:950 en 2%

BSA y PBS, durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 1 vez con PBS durante 15 min, se tiñó con Hoechst (1/900, en PBS; marcación nuclear) y se lavó 2 veces más en PBS. Finalmente se montó en glicerol para posterior visualización en microscopio de fluorescencia.

### **2.9.2.2 Cultivo de macrófagos hepáticos de ratones tratados con MSCs transducidas con adenovirus.**

Los macrófagos hepáticos fueron aislados a partir de hígados de ratones fibróticos que el día anterior habían sido tratados experimentalmente con AdIGF-I-MSCs o controles, aplicando el protocolo detallado en la sección 2.9.1.1. Se recolectaron los macrófagos (células adheridas al plástico luego de 30 minutos de incubación) fueron recolectados en Trizol y se extrajo ARN total para sintetizar ADN copia (ADNc). Por qPCR, se cuantificó el ARNm (detallado en la sección 2.13) de Arginasa-1, iNOS, IGF-I, HGF, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL10, IL6, IL1b (**Tabla 1**). Alternativamente, luego de remover la fracción no adherente, las células que permanecieron adheridas fueron incubadas por 24 horas en DMEM sin SFB, para obtener de esta manera el sobrenadante de dichos cultivos. Los mismos fueron centrifugados durante 30 minutos a 16000xg, a fin de eliminar posibles restos celulares, y conservados en freezer de -70°C. A partir de estas muestras se hicieron las determinaciones de niveles de IL12, mediante ELISA.

### **2.9.2.3 Efecto de la depleción de macrófagos sobre la acción terapéutica de las AdIGF-I-MSCs.**

Con el objeto de evaluar el rol de los macrófagos hepáticos en el efecto terapéutico mediado por las AdIGF-I-MSCs sobre la fibrosis hepática establecida, los mismos fueron depletados. Para ello se utilizó clodronato encapsulado en liposomas lipídicos (LipClod, <http://clodronateliposomes.org/>) (Van Rooijen and Sanders, 1994;



van Rooijen and van Kesteren-Hendriks, 2003). Esta técnica ha sido aplicada con éxito empleándose para ello distintas vías de administración, según el interés experimental (población específica de macrófagos a eliminar, según el tejido en que se encuentren). En este caso, el clodronato se administró por vía intravenosa, ya que ello permite lograr, a partir del primer día posterior a su aplicación, la depleción de macrófagos mayoritariamente del hígado y el bazo. Se tomaron muestras de hígado de ratones que recibieron LipClod al día siguiente de la administración para corroborar la eficiencia del procedimiento. El diseño experimental consistió en generar fibrosis hepática mediante aplicación crónica de TAA, como se describió anteriormente, y luego de 6 semanas se administraron 0,2 mL LipClod/25 gr de ratón, o solución salina como control sin depleción. Al día siguiente, cada uno de esos dos grupos se subdividió en dos y se administró por vena de la cola solución salina (control sin tratamiento celular) o  $5 \times 10^5$  AdIGF-I-MSCs. De esta forma se conformaron 4 grupos experimentales: Salino, Salino+LipClod, AdIGF-MSCs y AdIGF-I-MSCs+LipClod. Posteriormente, se continuó administrando TAA y luego de dos semanas del tratamiento se sacrificaron los ratones para evaluar el efecto terapéutico, como se describió en la sección 2.8.2.

## **2.10 Ensayo de migración *in vivo***

Con el fin de analizar la biodistribución de las MSCs, éstas fueron transducidas con el AdGFP. La expresión del gen reportero GFP permite identificar las células transplantadas mediante inmunohistoquímica. Para esto, se aplicaron por vía intravenosa  $5 \times 10^5$  AdGFP-MSCs en ratones BALB/c en los que se generó fibrosis con TAA y se realizó una monitorización de la localización y expresión génica mediante detección de GFP por inmunohistoquímica. Alternativamente, se analizó la biodistribución de forma no invasiva, para lo cual AdIGF-I-MSCs fueron marcadas con

CM-DiR, un colorante que emite fluorescencia en el infrarrojo, y luego monitoreadas mediante bioluminómetro hasta finalizar el experimento. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas mediante el sistema *In Vivo* Xenogen y analizadas utilizando el programa IVIS Living Image (Caliper Life Sciences). Las regiones de interés (ROI, del inglés *regions of interest*,) fueron seleccionadas manualmente mediante marcación alrededor de los órganos aislados y se evaluó la señal fluorescente emitida por los mismos. Los resultados fueron expresados como la eficiencia radiante en fotones/segundo dentro de la región de interés [p/s]/[ $\mu$ W/cm<sup>2</sup>].

A los días 1, 3, 7 y 14 de aplicación de las células se tomaron muestras de hígado, pulmón, corazón y bazo, se analizó la fluorescencia presente en los mismos y se fijó el tejido en paraformaldehído al 4% y luego se embebió en sacarosa 20% y se incluyó en OCT (Cryoplast; Biopack).

## **2.11 Tinciones histológicas**

Los hígados fueron fijados en formalina 10%, embebidos en parafina, seccionados (5  $\mu$ m) y posteriormente procesados de modo diferente para realizar las siguientes tinciones:

**-H&E:** Se desparafinizó el tejido mediante dos pasajes de 10 minutos cada uno en xilol (Biopack) y se hidrató en agua. Se incubó con una solución de hematoxilina por 15 minutos. Se lavó con agua corriente durante 5 minutos. Para rehidratar el tejido se incubó 1 minuto en etanol 100%, 1 minuto en etanol 96%, 1 minuto en etanol 70% y 1 minuto en agua. Se realizó una contratinción con solución de eosina alcohólica durante 2 minutos. Se eliminaron los restos de eosina con etanol 70%. Se incubó 2 veces en etanol 100% por 2 minutos. Se aclaró en xilol y montó con bálsamo de Canadá (Biopack).

**-Rojo sirio:** Se desparafinizó el tejido mediante dos pasajes en xilol durante 10 minutos. Se incubó durante 1 hora con rojo sirio (rojo sirio 0,1 % m/v; Sigma Aldrich 365548) en ácido pícrico saturado. Se lavó dos veces en ácido acético glacial al 0,005% en agua destilada. Se deshidrató mediante dos pasajes de 30 segundos en etanol 100%. Se aclaró en xilol y se montó con bálsamo de Canadá. Con el objeto de cuantificar el área marcada, se obtuvieron alrededor de 80 fotografías por muestra a una magnificación de 200X, utilizando un microscopio Nikon E800 asociado a una cámara digital y se obtuvo el valor promedio de área marcada para cada sección utilizando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health).

**-Tricrómico de Masson:** Se desparafinizó el tejido mediante dos pasaje de 10 min en xilol y se lavó con agua destilada por 5 min. Se incubó con una solución de hematoxilina férrica de Weigert por 10 min. Se lavó en flujo de agua corriente por 5 min. Se incubó con rojo Masson (Fucsina ácida 0,4% m/v, Rojo Biedbric 1,6% m/v (Sigma-Aldrich, B6008). Se lavó con agua destilada. Se trató con solución acuosa de ácido fosfotúngstico (1% m/v en agua destilada), durante 15 min. Se lavó con agua destilada. Se tiñó con solución verde luz (Verde Luz 0,3% m/v, Acético Glacial 0,3 % v/v en agua destilada) durante 5 min. Se lavó en solución de ácido acético al 1% durante 5 min a temperatura ambiente. Se deshidrató mediante un pasaje de 30 seg en etanol 70%, 30 seg en etanol 96% y 30 seg en etanol 100%, se aclaró en xilol y se montó con bálsamo de Canadá.

## **2.12 Ensayos de inmunohistoquímica**

Para estudiar la expresión de  $\alpha$ -SMA, GFP o PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) en el tejido hepático se realizaron ensayos de inmunohistoquímica. El tejido se fijó en formol al 10% y se incluyó en parafina. Se cortaron secciones de 5  $\mu$ m, se desparafinizó y se rehidrataron los tejidos. La peroxidasa endógena se bloqueó incubando los preparados en 3% Peróxido de hidrógeno en Metanol durante 30 minutos. Se realizó la recuperación antigénica en buffer citrato pH 6,0 calentando la muestra en microondas. Se bloquearon avidina y biotina endógena incubando subsecuentemente con las respectivas soluciones de bloqueo (Vector). Las marcaciones específicas se realizaron incubando hasta el día siguiente a 4°C con anticuerpos anti-GFP (GFP; 1/500; Abcam), anti- $\alpha$ -SMA policlonal (1/100; Abcam) o anti-PCNA monoclonal (1/100; Santa Cruz Biotechnology). Luego de un lavado exhaustivo, los preparados fueron incubados a temperatura ambiente durante 2 horas con anticuerpos secundarios biotinilados de cabra anti-conejo (1/100, Vector) o anti-ratón (1/100, Vector), respectivamente. Luego de nuevos lavados, se incubó la muestra con un conjugado enzimático avidina-peroxidasa (Extravidin-peroxidase, Sigma-Aldrich) diluido 1:100 en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente en PBS y acetato de sodio 0,1 M. El revelado se realizó en una mezcla de una solución con diaminobenzidina 0,1% en agua destilada y una solución con sulfato de amonio-níquel 5%,  $\text{CINH}_4$  0,08% y glucosa 0,4% en acetato de amonio 0,2 M. Finalmente, se realizaron lavados en acetato 0,1 M y PBS, el tejido fue deshidratado con pasajes de 30 seg por alcohol 70%, 96%, 100% y xilol, y montado con bálsamo de Canadá. Se realizaron controles de la técnica en que se omitió incubación con anticuerpos primarios.

Con el objetivo de realizar un análisis cuantitativo de la expresión de  $\alpha$ -SMA se hizo un estudio morfométrico de 50 imágenes de microscopía (200X) por espécimen y

se obtuvo el valor promedio de área marcada a partir de cada sección utilizando el software ImageJ. De modo similar, se calculó el número de células PCNA positivas por campo utilizando para ello fotografías 200X (50 imágenes/muestra) y el sistema informático CellProfiler ([www.cellprofiler.com](http://www.cellprofiler.com)). Se expresó el valor como la media del número de células por campo.

## **2.13 Análisis de la expresión de ARNm**

### **2.13.1 Extracción a ARN total**

En experimentos in vivo, se recolectaron entre 150-200 mg de tejido hepático por muestra. Los tejidos se homogenizaron con Polytron (Janke & Kunkel IKAWERK) y el ARN total se extrajo usando Trizol (Invitrogen), según las recomendaciones del fabricante

En experimentos in vitro, el ARN total se extrajo directamente a partir de la placa de cultivo incubando 2 – 3 minutos las células ( $1 \times 10^5$  –  $5 \times 10^5$ ) con Trizol Reagent® (Invitrogen). La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa.

### **2.13.2 Síntesis de ADNc a partir de ARN total**

En todos los casos el ARN fue tratado con ADNasa I (Thermo Scientific) previamente a la retrotranscripción. En un volumen final de 10  $\mu$ l se incubaron 2  $\mu$ g de ARN, solución buffer ADNasa 1X y ADNasa I (2U) durante 30 minutos a 37°C. Luego de agregar 0,5  $\mu$ l de EDTA 25 mM se inactivó durante 10 min a 65°C.

La transcripción reversa se realizó utilizando el sistema First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente se incubaron 2  $\mu$ g de ARN, cebador oligo-dT, 1mM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP

durante 5 minutos a 65°C. Posteriormente se colocaron las muestras en hielo y se agregó solución buffer 5X, inhibidor de ARNasa RiboLock y 40U de la retrotranscriptasa M-MuLV. Se incubó 1 hora a 37°C y 5 minutos a 70°C.

### **2.13.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)**

Se estudió la expresión de diversos genes por qPCR utilizando primers específicos detallados en la **Tabla 1**. En todos los casos se utilizó la enzima Taq platinum (Invitrogen), dNTPS (0,2 mM), cebadores (0,4 µM), y el colorante SYBR Green (1,96 µM) para realizar la QPCR en un termociclador Stratagene Mx3005p (Stratagene). Se realizó una incubación de 10 min a 95°C seguida de 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg al Tm que depende de la composición de bases de los primers y 60 seg a 72°C; finalmente una extensión de 10 min a 72°C. Al terminar la reacción de PCR se aumentó la temperatura de forma gradual (2°C) desde 60°C hasta 95°C y se midió fluorescencia cada 15 seg de forma de construir una curva de disociación para cada inserto amplificado. El gen para GAPDH fue utilizado como control de la carga y amplificación, por lo que todos los valores fueron normalizados según su nivel de expresión y se aplicó el método de  $\Delta\Delta C_t$  para el análisis de los datos obtenidos. Todos los ensayos se repitieron dos o tres veces en triplicado.

GEN	SECUENCIA SENTIDO (5'-3')	SECUENCIA ANTISENTIDO (5'-3')
ABL1	AGAAAGATGCGCCTGACACC	AGGAAGCAGTGGCGATACAG
ARGINASA1	CAGAAGAATGGAAGAGTCAG	CAGATATGCAGGGAGTCACC
BRCA2	AGCCGAGCTTGAAGCAAGT	TGGCTCTTCAGGATCATTCCG
CCNA1	AAGCATGCCTCAGTATCCCC	CAGGGGAAGAAGTACAGGCG
COL1A2	CCTACATGGACCAGCAGACTG	GGAGGTCTTGGTG GTTTTGTA
GADD45A	CTGCAGAGCAGAAGACCGAA	TACACGCCGACCCTAATGG
GAPDH	CATCTCTGCCCCCTCTGCTG	GCCTGCTTCACCACCTTCTTG
HGF	GGCTGAAAAGATTGGATCAGG3	CCAGGAACAATGACACCAAGA
IGF-I	CAGTTCGTGTGTGGACCAAG	GTCTT GGGCATGTCAAGTGTG
IL10		
IL1B	TGACAGTGATGAGAATGACCTGTTC	TTGGAAGCAGCCCTTCATCT
IL6	AGTTGCCTTCTTGGACTGA	TCCACGATTTCCAGAGAAC
iNOS	AAGATGGCCTGGAGGAATGC	TGCTGTGCTACAGTTCCGAG
MYB	CAGATGTGCAGTGCCAACAC	GACCAACGCTTCGGACCATA
NOTCH2	GTGTGGACAAAGTCAACCGC	ATGTCGATCTGGCACACTGG
PCNA	AAAGATGCCGTCGGGTGAAT	TTCCCATTGCCAA GCTCTCC
TGF-β1	CCACTCGC TTCTTTGAGACC	TAGTGAAGTGGGTGGGGAC
TNFα	GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT	CCACTTGGTGGTTTGCTACGA
TWEAK	GCCCTGC GCTGCCTGGAAGA	TCACTGAGGGGCCTTGCTCT
α-SMA	ACTGGGACGACATGG AAAA	CCATCTCCAGAGTCCA GCAC

Tabla 1: Secuencia de los cebadores

## 2.14 Microarreglo de PCR

Con el objetivo de determinar los cambios de expresión de genes relacionados con proliferación y protección al daño celular se utilizó un arreglo de PCR, Cell Cycle RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array (Qiagen, SABioscience, catálogo PAMM-020Z). Este sistema de arreglo de PCR consiste en dos placas de 96 pocillos con cebadores específicos adheridos al plástico, donde se pueden analizar 84 genes de interés más los de referencia y controles negativos en simultáneo para una muestra (Tabla 2). A partir de muestras de hígado de ratones que recibieron las AdIGF-I-MSCs o solución salina (control sin tratamiento) tomadas al día 1 posterior al tratamiento, se purificó ARN total mediante las columnas RNeasy mini kit (Qiagen) para obtener un alto grado de pureza. Luego se juntaron cantidades iguales de ARN de los distintos animales de cada grupo (n=3 por grupo) y se realizó la síntesis del ADNc como se describió en la sección 2.13.2. Brevemente; se trató 1ug de ARN de cada *pool* con ADNasa I

(ThermoScientific) para digerir restos de ADN genómico y luego se realizó la transcripción reversa utilizando el sistema First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific). A partir del ADNc sintetizado se corrió una RT-qPCR para cada *pool* en un termociclador Stratagene Mx3005p (Stratagene). El programa de corrida sugerido por instrucciones del fabricante consistió en una incubación de 10 min a 95°C seguida de 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C cada uno. Finalmente, el análisis de los resultados se realizó a través de un programa en línea disponible en el sitio web del fabricante <http://sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>. Los resultados se expresan como las veces de cambio respecto al control salino (Fold change  $\Delta\Delta Ct$ ) y se consideró como expresión diferencial cuando este valor fue igual o superior a 2.

Tabla 2: Disposición de genes en la placa de RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR

<b>Abl1 A01</b>	Atm A02	Atr A03	Aurka A04	Aurkb A05	Bcl2 A06	Birc5 A07	Brca1 A08	Brca2 A09	Casp3 A10	Ccna1 A11	Ccna2 A12
<b>Ccnb1 B01</b>	Ccnb2 B02	Ccnc B03	Ccnd1 B04	Ccnd2 B05	Ccnd3 B06	Ccne1 B07	Ccnf B08	Cdc20 B09	Cdc25a B10	Cdc25c B11	Cdc6 B12
<b>Cdc7 C01</b>	Cdk1 C02	Cdk2 C03	Cdk4 C04	Cdk5ra p1 C05	Cdk6 C06	Cdkn1a C07	Cdkn1b C08	Cdkn2a C09	Cdkn2b C10	Cdkn3 C11	Chek1 C12
<b>Chek2 D01</b>	Cks1b D02	Ddit3 D03	Dst D04	E2f1 D05	E2f2 D06	E2f3 D07	E2f4 D08	Gadd45 a D09	Gpr132 D10	Hus1 D11	Itgb1 D12
<b>Mad2l1 E01</b>	Mcm2 E02	Mcm3 E03	Mcm4 E04	Mdm2 E05	Mki67 E06	Mre11a E07	Msh2 E08	Myb E09	Nbn E10	Nek2 E11	Notch2 E12
<b>Pkd1 F01</b>	Pmp22 F02	Ppm1d F03	Rad17 F04	Rad21 F05	Rad51 F06	Rad9a F07	Ran F08	Rb1 F09	Rbl1 F10	Rbl2 F11	Sfn F12
<b>Shc1 G01</b>	Skp2 G02	Slnf1 G03	Smc1a G04	Stag1 G05	Stmn1 G06	Terf1 G07	Tfdp1 G08	Trp53 G09	Trp63 G10	Tsg101 G11	Wee1 G12
<b>Actb H01</b>	B2m H02	Gapdh H03	Gusb H04	Hsp90a b1 H05	MGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

## 2.15 Análisis Estadístico

Los intervalos de confianza (IC) de 95 % se determinaron a través del cálculo de los valores promedios y el Error Estándar de la Media (SEM). Para evaluar si las diferencias entre los valores obtenidos eran significativas se utilizaron el Test *t* de Student, Mann-Whitney, el análisis de varianza (ANOVA) o el Test de Kruskal-Wallis



según fuera requerido por el tipo de análisis. Se empleó el software Prism (Graph Pad) y se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

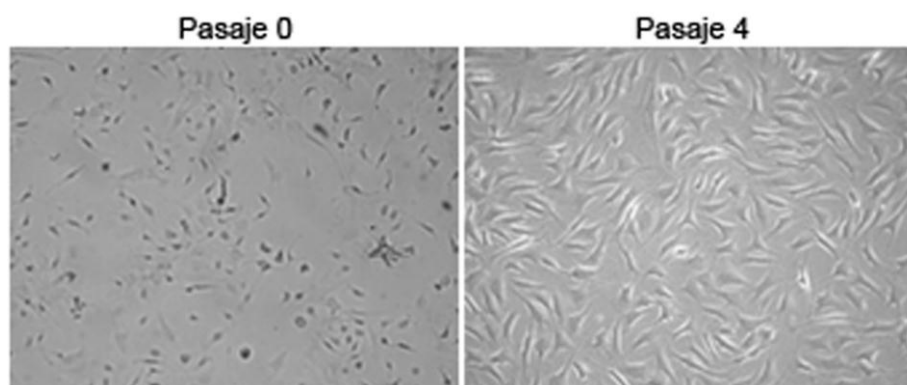
## ***Resultados***

---

### 3 Resultados

#### 3.1 Cultivo y caracterización de las MSCs de médula ósea

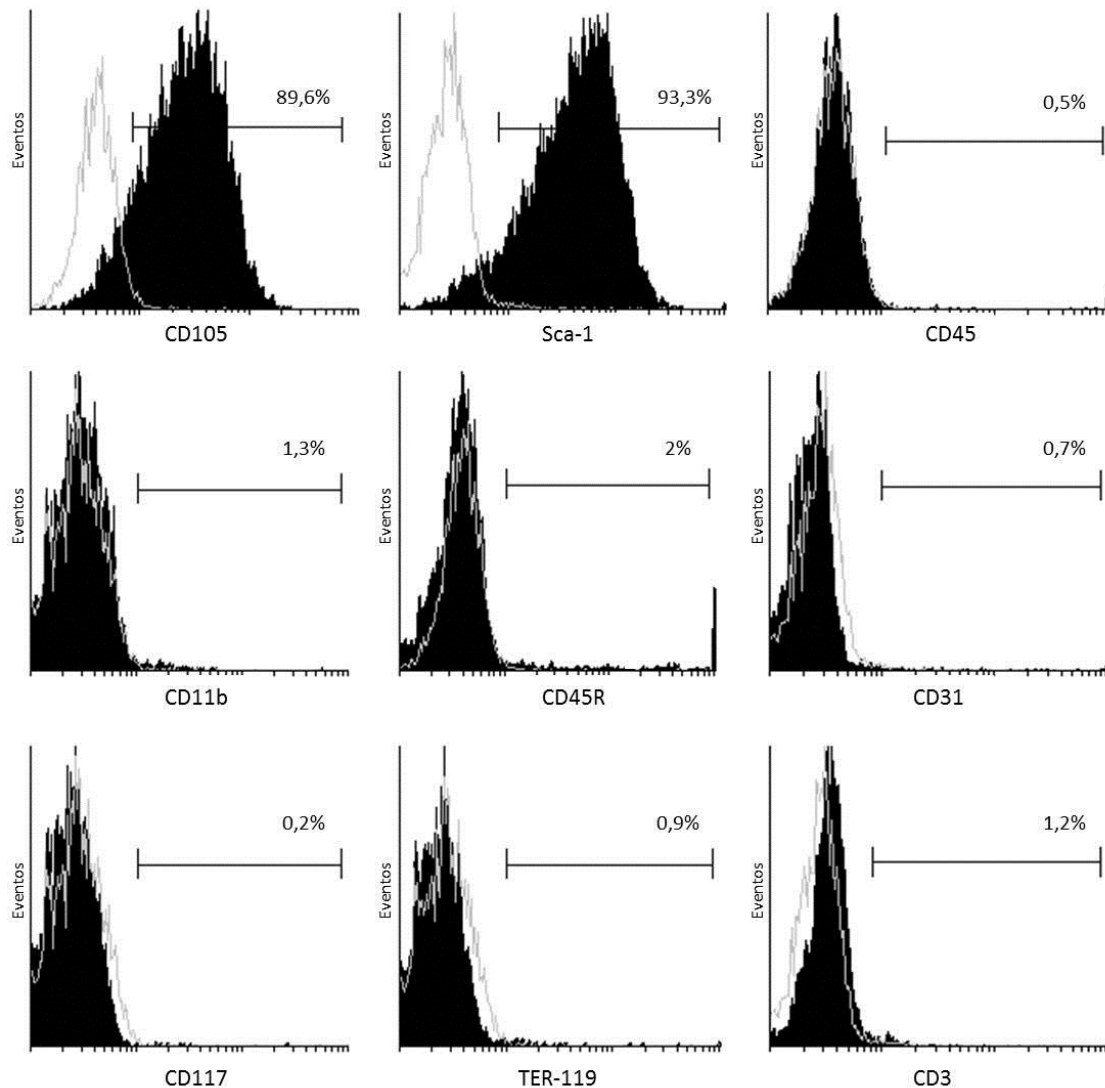
El primer paso para el desarrollo de este trabajo de tesis fue poner a punto un protocolo para aislar y cultivar células mesenquimales estromales de médula ósea de ratones. Se intentaron varios protocolos disponibles en la bibliografía empleando las cepas de ratones C57Bl/6J y BALB/c. Finalmente se logró poner a punto el protocolo descrito en Materiales y Métodos (ítem 2.3) en la cepa BALB/c, separando la fracción mononuclear de médula ósea a partir de un gradiente de Ficoll-Hypaque. Las células adherentes de esta fracción fueron cultivadas con cambios de medio de cultivo cada 3 – 4 días y pasajes periódicos, una vez que alcanzaban un 90% de confluencia. Al inicio de los cultivos, las células crecieron formando colonias, pudiéndose observar morfologías celulares diversas. Luego de algunos pasajes, se logró una homogeneización del cultivo con presencia de células con morfología fibroblástica (Figura 8).



**Figura 8: Cultivo de MSCs.** Microfotografías (100X) en campo claro de un cultivo representativo de MSCs donde se observa la morfología de las células a pasajes 0 y 4.

Una vez puesto a punto el protocolo de aislamiento de las MSCs, se caracterizó su perfil de expresión siguiendo los criterios de la International Society for Cellular Therapy (ISCT) para la definición de MSCs murinas. Mediante citometría de flujo de los cultivos primarios se analizó el fenotipo de las células obtenidas a través de los

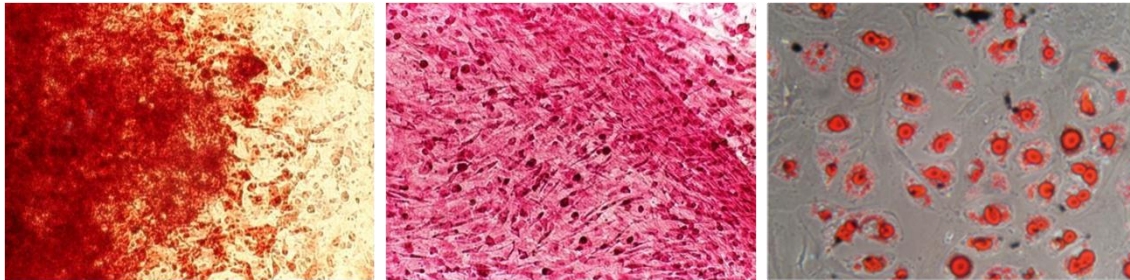
pasajes sucesivos. Como se muestra en la **figura 9**, a partir del cuarto pasaje se obtuvieron cultivos de células adherentes que expresaron marcadores de origen mesenquimal SCA-1 y CD105 y no expresaron marcadores de origen hematopoyético Ter-119, CD3, CD11b, CD31, CD45, CD45R y CD117.



**Figura 9. Citometría de Flujo de MSCs.** Histogramas representativos de los marcadores positivos o negativos de las MSCs, con sus respectivos porcentajes.

Asimismo, mediante incubación en medios de inducción de diferenciación a tipos celulares específicos se corroboró que las células obtenidas fueron capaces de

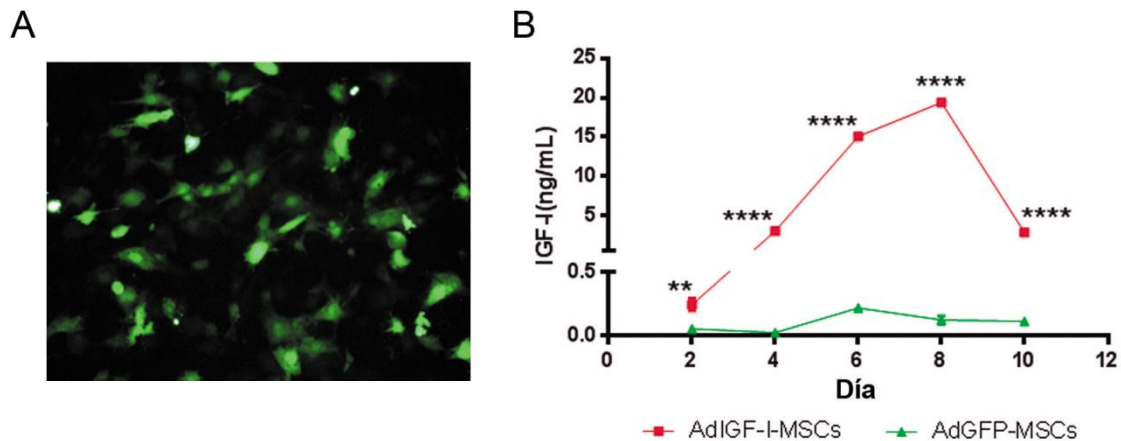
diferenciarse a los tres linajes característicos de las MSCs: adipoblastos, condroblastos y osteoblastos (**Figura 10**). Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos podemos confirmar que las células obtenidas en nuestros cultivos corresponden a MSCs.



**Figura 10. Potencial de diferenciación de las MSCs.** Microfotografías a 40X de cultivos de MSCs diferenciadas a osteoblastos (tinción de rojo alizarina, panel izquierdo), condroblastos (tinción de PAS, panel central) y adipoblastos (tinción Oil-Red-O, panel derecho).

### 3.2 Transducción de las MSCs con AdIGF-I y AdGFP

Con el objetivo de poner a punto las condiciones óptimas de infección (obtención de la expresión máxima del transgen sin afectar la viabilidad y funcionalidad celular), se evaluó la expresión de GFP tras la infección con cantidades crecientes de AdGFP (MOI=2 a MOI=200). La condición óptima se obtuvo a una MOI de 30, con una eficiencia de transducción del  $82.25 \pm 0.79\%$ . Asimismo, se evaluó a distintos tiempos post-infección la producción de IGF-I en el sobrenadante de cultivo de las MSCs infectadas con AdGFP y AdIGF-I. Como se muestra en la **figura 11**, mientras niveles bajos de producción de IGF-I fueron encontrados en cultivos de AdGFP-MSCs estos fueron significativamente superiores (en dos órdenes de magnitud) en las AdIGF-I-MSCs, con un pico a los 8 días post-infección. A partir de este tiempo, la producción de IGF-I decreció, lo cual concuerda con el tipo de modificación génica transitoria mediada por los adenovirus utilizados.



**Figura 11. Transducción de MSCs con adenovirus.** (A) Microfotografía (100X) de AdGFP-MSCs. (B) Dolaje mediante ELISA de IGF-I en el sobrenadante de cultivo de las AdIGF-I-MSCs y AdGFP-MSCs a días 2, 4, 6, 8 y 10 post-infección. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*vs. AdGFP-MSCs.

Considerando los resultados obtenidos, se tomó como condición óptima de transducción para su aplicación en los distintos ensayos, la infección de las MSCs a una MOI de 30 durante 4 días. Luego de este tiempo, las células modificadas genéticamente fueron administradas sistémicamente en ratones (experimentos *in vivo*) o empleadas en ensayos *in vitro*.

### 3.3 Efecto de la infección sobre la inmunogenicidad de las MSCs

Debido a que la infección con adenovirus podría modificar alguna/s de las características de las MSCs, se llevaron a cabo ensayos para evaluar su perfil de expresión de membrana y algunas de sus propiedades inmunológicas. En primera instancia se analizó el fenotipo de las MSCs por citometría de flujo. Como se observa en la **Tabla 3**, la infección no alteró el perfil de expresión de marcadores de superficie de las MSCs y tampoco indujo un incremento en la expresión de moléculas de coestímulo implicadas en la presentación antigénica como CD80, CD86 o MHC II.

Marcador	MSCs	AdIGF-I-MSCs
<b>Sca-1</b>	97,6	97
<b>CD105</b>	88,2	91
<b>CD44</b>	96,9	96,7
<b>CD45</b>	1,5	0,6
<b>CD45R</b>	9,8	11,2
<b>GR1</b>	9,8	5,8
<b>CD11b</b>	0,3	0,3
<b>CD3</b>	1,1	0,6
<b>MHC-II</b>	0,2	0,2
<b>CD80</b>	24	31
<b>CD86</b>	0,7	0,4

Tabla 3. Caracterización fenotípica de las MSCs y AdIGF-I-MSCs

Una propiedad inmunológica descrita para las MSCs es que éstas no tendrían la capacidad de inducir proliferación de células T y B provenientes de otra cepa de ratón. Para analizar esta propiedad en las MSCs aisladas en nuestro laboratorio y en aquellas modificadas genéticamente, esplenocitos provenientes de ratones C57Bl/6 fueron expuestos a las AdGFP-MSCs, AdIGF-MSCs y MSCs (control), aisladas a partir de ratones Balb/C, y se constató que la infección con adenovirus no indujo inmunogenicidad en las MSCs (**Figura 12**).

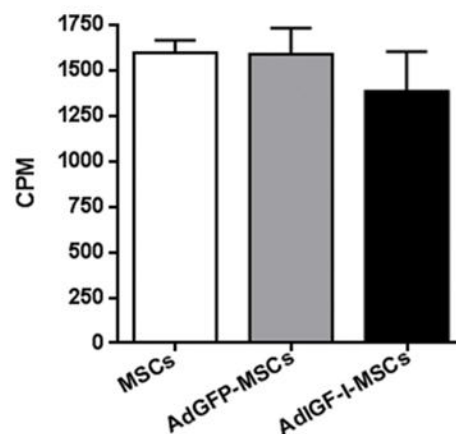


Figura 12. Proliferación de esplenocitos en presencia de MSCs infectadas con AdGFP y AdIGF-I. El nivel de proliferación celular se expresa como cuentas por millón (CPM).

Finalmente, considerando que la exposición a repetidas dosis de MSCs infectadas podría inducir la producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus o el transgen, se evaluó la presencia de éstos en el suero de animales que recibieron múltiples dosis de AdGFP-MSCs. Como se describió anteriormente, se tomaron muestras de sangre de los ratones antes de la inoculación de la primer dosis (condición basal), a los 3 días posteriores a haber recibido una dosis celular y a los 14 días posteriores a la primera dosis, tras haber recibido 3 dosis de AdGFP-MSCs. Como se muestra en la **Tabla 4**, no se detectaron anticuerpos neutralizantes contra las AdGFP-MSCs en el suero de los ratones tratados.

Muestra	Título (Dil <sup>-1</sup> )	
	MSCs	AdGFP-MSCs
Basal	n.d.	n.d.
Día 3	n.d.	n.d.
Día 14	n.d.	n.d.
Control +		3200
Control -		n.d.

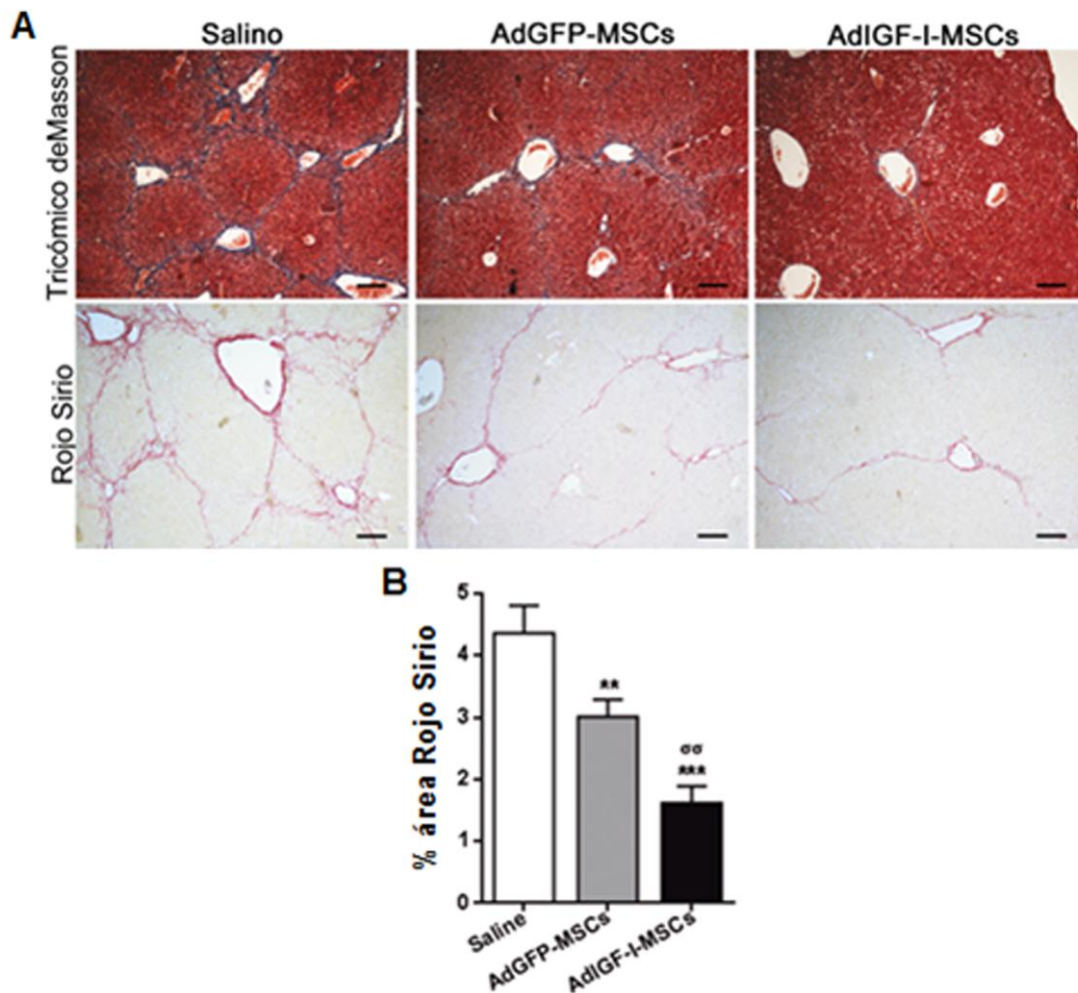
**Tabla 4. Determinación de Anticuerpos neutralizantes.** El título de anticuerpos neutralizantes se expresó como la inversa de la dilución máxima del suero. Título no detectable (n.d.)

En conjunto, estos resultados sugieren que la infección adenoviral no resulta en cambios significativos en características inmunológicas que resultan importantes en relación con bioseguridad y funcionalidad de las MSCs, ya que no se modificó el perfil de expresión de marcadores de membrana, ni se indujo proliferación de linfocitos alogénicos ni se detectaron anticuerpos neutralizantes contra proteínas virales. En relación a este último resultado, una conocida limitación de las estrategias terapéuticas basadas en la administración repetida directa de genes por medio de vectores adenovirales es que el sistema inmunológico suele generar respuesta antiviral; en este





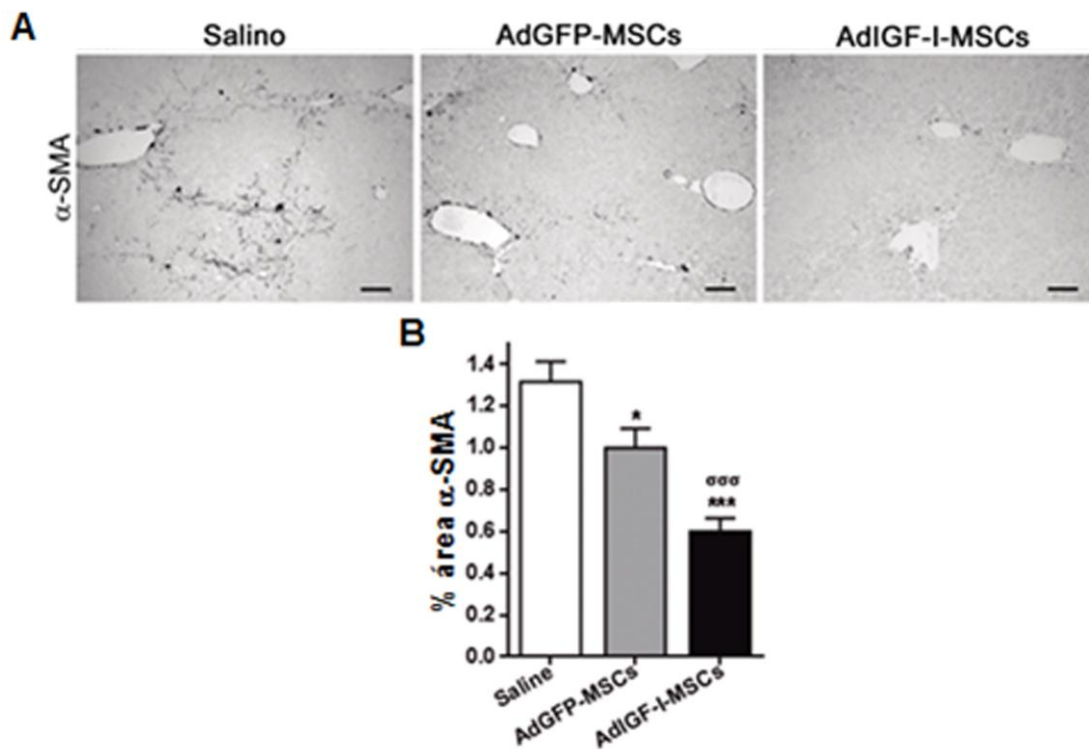
comparación con el tratamiento control (inyección de solución salina; vehículo). Interesantemente, la aplicación de AdIGF-I-MSCs resultó en una disminución aún mayor en el grado de fibrosis.



**Figura 14. Efecto terapéutico de las AdIGF-MSCs. (A)** Microfotografías representativas de secciones de hígados teñidos con Tricómico de Masson (paneles superiores) y Rojo Sirio (paneles inferiores). **(B)** Morfometría realizada a partir de tejido teñido con Rojo Sirio.  $^{**\sigma\sigma}p<0.01$ ;  $^{***}p<0.001$ ; \*vs. Salino;  $^{\sigma}$ vs. AdGFP-MSCs.

Por otro lado, en los hígados sometidos a injuria y que desarrollan fibrosis se observa un aumento en el número de CEHs activadas y de células con aspecto de miofibroblastos. Las CEHs activadas (al igual que los miofibroblastos) se caracterizan por expresar  $\alpha$ -SMA por lo que este marcador es utilizado como signo de grado de fibrosis y de actividad de estos tipos celulares. Consistentemente con la disminución

del grado de fibrosis, el área marcada para  $\alpha$ -SMA, se encontró disminuida en las muestras de hígado de ratones tratados con AdGFP-MSCs respecto al grupo salino, siendo este efecto significativamente superior en los tratados con AdIGF-I-MSCs en comparación con los otros dos grupos (**Figura 15**).



**Figura 15.** Efecto de las AdIGF-MSCs sobre la activación de las CEHs. (A) Microfotografías representativas de secciones de hígados teñidos por inmunohistoquímica para  $\alpha$ -SMA. (B) Morfometría de área  $\alpha$ -SMA positiva. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*vs. Salino;  $^{\sigma}$ vs. AdGFP-MSCs.

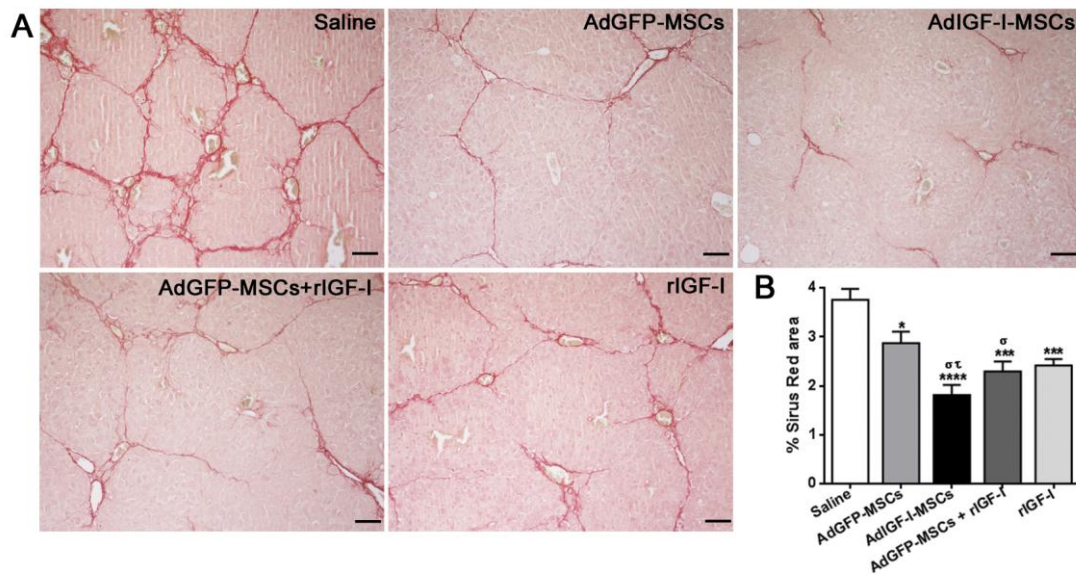
Por otro lado, mediante estudios anatómo-patológicos se evaluó la histología hepática y se aplicó el índice de Knodell, para la valoración y cuantificación del daño hepático. Éste método tiene en consideración la inflamación portal, necrosis hepatocitaria y formación de tractos fibrosos, entre otros parámetros. Como se puede observar en la **Tabla 5**, el tratamiento con MSCs redujo significativamente el índice de Knodell total en comparación con el grupo sin tratar. Además, el índice de fibrosis considerado como un ítem de este método también se vio disminuido en mayor

medida en animales tratados con las AdIGF-I-MSCs en comparación con aquellos tratados con AdGFP-MSCs.

	Salina	AdGFP-MSCs	AdIGF-I-MSCs
<b>Necrosis periportal o periseptal</b>	3 ±0	2,2 ±0,2	2,2 ±0,2
<b>Necrosis confluyente (vena central)</b>	3,4 ±0,4	2,6 ±0,4	2,2 ±0,2 *
<b>Degeneración intralobulillar y necrosis focal</b>	2,6 ±0,24	2,2 ±0,2	2,2 ±0,45
<b>Inflamación portal</b>	3,4 ±0,24	2,4 ±0,24	2,6 ±0,24
<b>Fibrosis</b>	4,6 ±0,24	4 ±0,32	2,8 ±0,2 **σ
<b>Índice de Knodell</b>	17 ±0,45	12,5 ±0,64 *	11,5 ±0,29 **

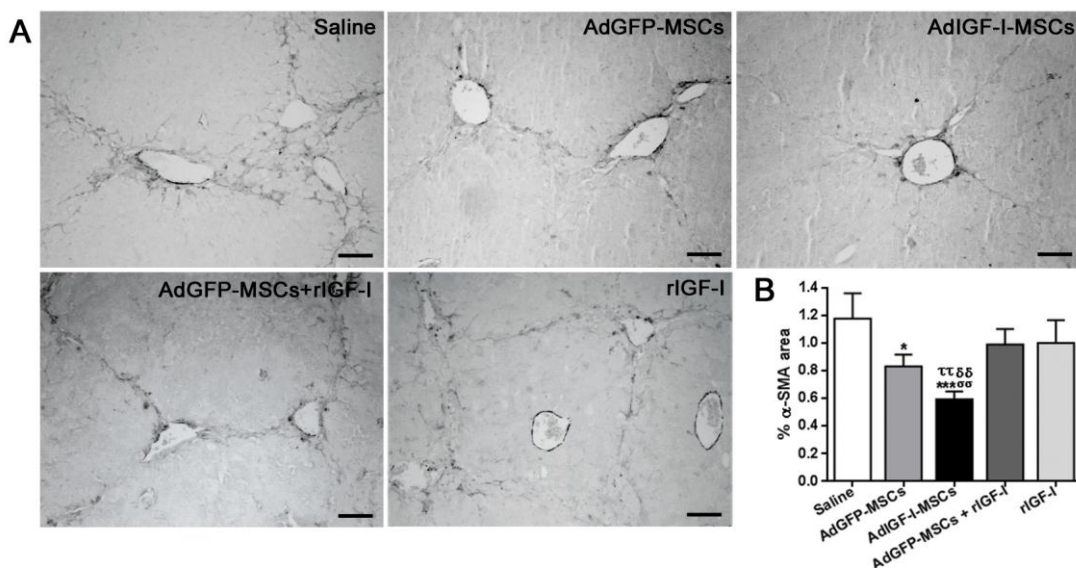
**Tabla 5:** Índice de Knodell (Knodell et al., 1981).

Estos resultados son consistentes con efectos beneficiosos que se conocían para la aplicación de IGF-I y de MSCs sobre la cirrosis hepática (ver Introducción). Asimismo, ha sido reportado un ensayo clínico piloto en que el tratamiento con IGF-I recombinante (rIGF-I) resultó en niveles superiores de albúmina en el suero de pacientes como signo de mejora de la funcionalidad hepática. Sin embargo, esta estrategia tuvo un efecto limitado y requiere además de aplicaciones diarias de la proteína recombinante. En base a estos antecedentes, se realizaron nuevos experimentos *in vivo* en que se buscó comparar el efecto sobre el grado de fibrosis hepática de aplicar una única dosis de las AdIGF-MSCs con el de administrar AdGFP-MSCs más rIGF-I o rIGF-I solo. Para esto, al diseño experimental detallado anteriormente se le agregaron otros dos grupos de ratones a los que se inyectó diariamente rIGF-I (1µg/100g de ratón), de forma subcutánea, durante los 14 días posteriores al tratamiento con las AdGFP-MSCs (grupo AdGFP-MSCs+rIGF-I) o vehículo (grupo rIGF-I). El efecto de la administración de una sola dosis de AdIGF-I-MSCs resultó significativamente superior en la reducción de los depósitos de colágeno en comparación con los otros grupos experimentales, según pudo observarse luego de la tinción con Rojo Sirio (**Figura 16**).



**Figura 16. Efecto terapéutico de AdIGF-MSCs vs. IGF-I recombinante.** (A) Microfotografías representativas de secciones hígados teñidos Rojo Sirio (F) morfometría de Rojo Sirio.(G-K) Microfotografías de preparados histológicos marcados contra  $\alpha$ -SMA. (I) Morfometría del área  $\alpha$ -SMA positiva. \* $\sigma\tau^p < 0.05$ ; \*\* $\sigma\sigma\tau\tau p < 0.01$ ;  $\sigma\sigma^* p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; \*vs. Salino;  $\sigma$ vs. AdGFP-MSCs;  $\tau$  AdGFP-MSCs+rIGF-I;  $\delta$  vs. rIGF-I.

Consistente con la mayor reducción del grado de fibrosis hepática mediada por las AdIGF-I-MSCs en comparación con la obtenida mediante la administración de la proteína recombinante, se observó también una menor expresión de  $\alpha$ -SMA en el tejido hepático, lo que sugiere una menor activación de las CEHs (Figura 17).

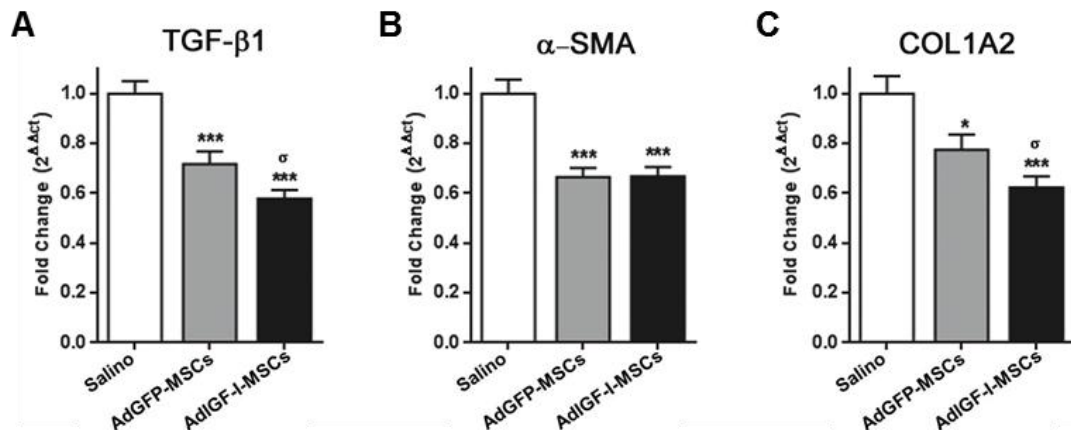


**Figura 17. Activación de las CEHs de AdIGF-MSCs vs. IGF-I recombinante.** (A) Microfotografías de preparados histológicos marcados contra  $\alpha$ -SMA. (B) Morfometría del área  $\alpha$ -SMA positiva. \* $< 0.05$ ;

\*\*σσττρ<0.01; σσσ\*\*\*p<0.001; \*vs. Salino; σvs. AdGFP-MSCs; τ AdGFP-MSCs+rIGF-I; δ vs. rIGF-I.

Teniendo en cuenta que la administración de rIGF-I fue menos efectiva que la aplicación de AdIGF-I-MSCs para el tratamiento de la fibrosis hepática, sumado al estrés al que son expuestos los animales por las múltiples aplicaciones (diarias), los grupos experimentales con aplicación de rIGF-I fueron excluidos en los siguientes experimentos.

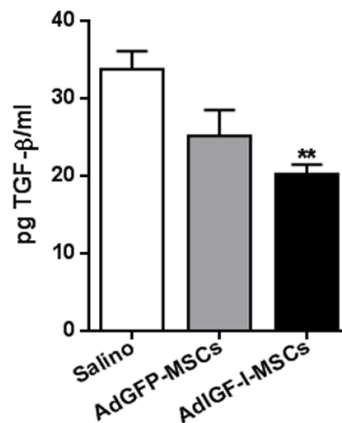
A fin de confirmar el efecto de los distintos tratamientos con MSCs sobre la fibrosis hepática, se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de factores claves en el proceso fibrogénico. TGF-β1 es una citoquina fundamental producido tanto por las CEHs activadas como por otras células (por ejemplo, macrófagos) durante el estímulo profibrogénico y como señal de persistencia del mismo. Además, es considerada junto α-SMA y COL1A2, marcador del grado de activación de las CEHs. COL1A2 es una proteína componente principal de la MEC producida por estas células activadas en respuesta al daño. En consistencia con los resultados previos, los niveles de expresión de todos estos genes se redujeron después del tratamiento con las MSCs en comparación con los animales tratados con vehículo. Por otra parte, y de acuerdo con los resultados anteriores, en los animales que recibieron las AdIGF-I-MSCs los niveles de ARNm de TGF-β1 y COL1A2 disminuyeron significativamente en comparación con los tratados con las AdGFP-MSCs (**Figura 18**).



**Figura 18. Expresión de genes profibrogénicos.** Análisis de la expresión de ARNm de TGF-β1 (A), α-SMA (B) y COL1A2 (C) en el hígados de ratones controles (salino) y tratados con AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs. \*<sup>o</sup>p<0.05; \*\*<sup>oo</sup>p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*vs. salino; <sup>σ</sup>vs. AdGFP-MSCs.

Finalmente, se determinaron los niveles proteicos de TGF-β1 activo a nivel sistémico, en el suero de los ratones, al momento en que se analizó el efecto terapéutico (14 días post-tratamiento experimental). En consonancia con los resultados mostrados previamente, se detectó una disminución de TGF-β1 sérica en los animales que recibieron MSCs; sin embargo, ésta llega a ser significativa con respecto al control salino, en los animales tratados con AdIGF-I-MSCs ( $33.75 \pm 2.28$  vs.  $25.14 \pm 3.29$  vs.  $20.21 \pm 1.25$ ; salino vs. AdGFP-MSCs vs. AdIGF-I-MSCs;  $P = 0.0099$ , AdIGF-I-MSCs vs. salino) (**Figura 19**).



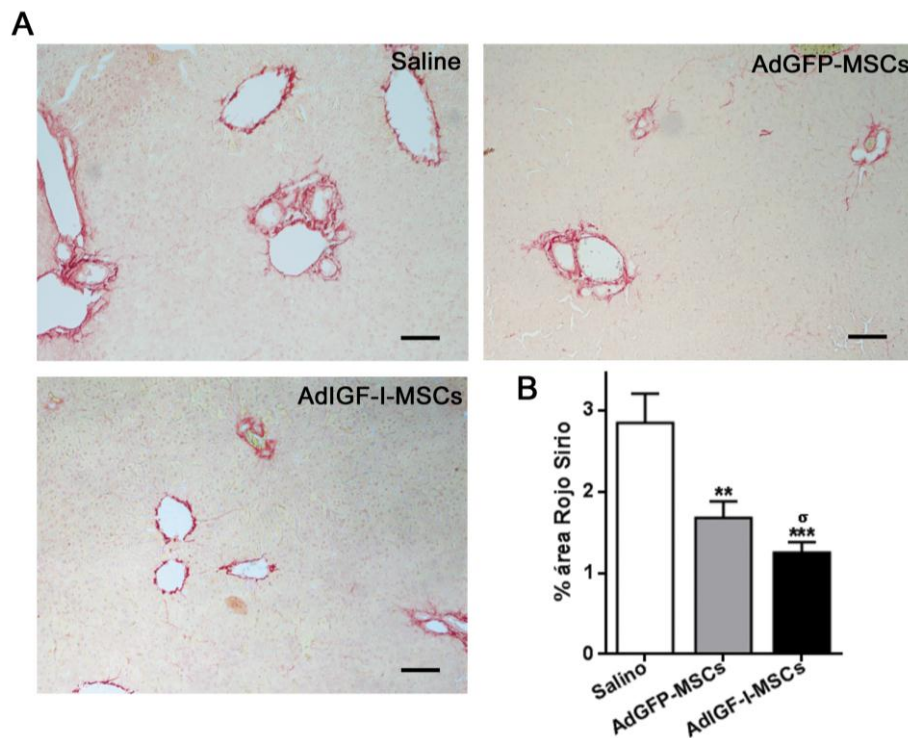


**Figura 19. Niveles de TGF-β1 en suero.** Determinación por ELISA de TGF-β1 activo en el suero de ratones controles (salino) y tratados con AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs; \*\* $p < 0.01$ ; \*vs. salino.

### 3.5 Efecto terapéutico de las AdIGF-I-MSCs sobre la fibrosis en el modelo de ligadura del conducto colédoco

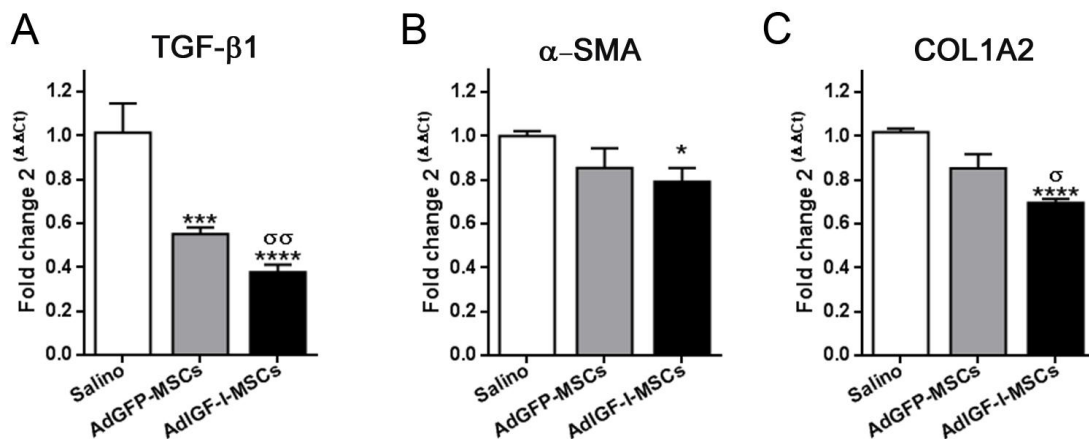
Con el objetivo de confirmar el efecto terapéutico en un modelo de daño hepático alternativo al de la administración crónica de TAA, se evaluó el potencial terapéutico de las AdIGF-I-MSCs en el modelo de ligadura del conducto colédoco. Este modelo consiste en la obstrucción quirúrgica del conducto colédoco, lo que impide la eliminación de la bilis del hígado. Al acumularse, los ácidos biliares tienen efecto hepatotóxico, induciendo apoptosis de hepatocitos por estrés oxidativo. Este modelo tiene la característica de desarrollar una fibrosis significativa, con localización periportal, en un breve lapso. El diseño experimental consistió en la realización de la cirugía de ligadura del conducto colédoco y luego de dos días proceder a la administración sistémica del vehículo (solución salina) y  $5 \times 10^5$  de AdGFP-MSCs o AdIGF-I-MSCs. Los animales fueron sacrificados 7 días después. De forma similar a los resultados obtenidos en el modelo de TAA, la aplicación de AdGFP-MSCs redujo la fibrosis hepática respecto al control salino. Sin embargo, dicho efecto fue aún mayor en los casos en que las AdIGF-I-MSCs fueron aplicadas (**Figura 20**).





**Figura 20. Efecto terapéutico sobre la fibrosis hepática de las AdIGF-I-MSCs en el modelo de ligadura de colédoco. (A)** Microfotografías de preparados histológicos teñidos con Rojo Sirio provenientes de ratones tratados con solución salina (vehículo), AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs. **(B)** Morfometría de Rojo Sirio.  $\sigma$  <0.05, \*\* $p$ < 0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*vs. salino;  $\sigma$  vs. AdGFP-MSCs.

Por otro lado, para estudiar el grado de avance de la patología y de activación de las CEHs se analizaron cambios en la expresión de factores pro-fibrogénicos luego de los diversos tratamientos. Como se puede observar en la **Figura 21**, la expresión de ARNm de TGF- $\beta$ 1 disminuyó notablemente en los dos grupos que recibieron MSCs, siendo este efecto más notorio en los hígados de los animales tratados con AdIGF-I-MSCs. Asimismo, los niveles de expresión de  $\alpha$ -SMA y COL1A2 se redujeron significativamente en esa misma condición experimental.



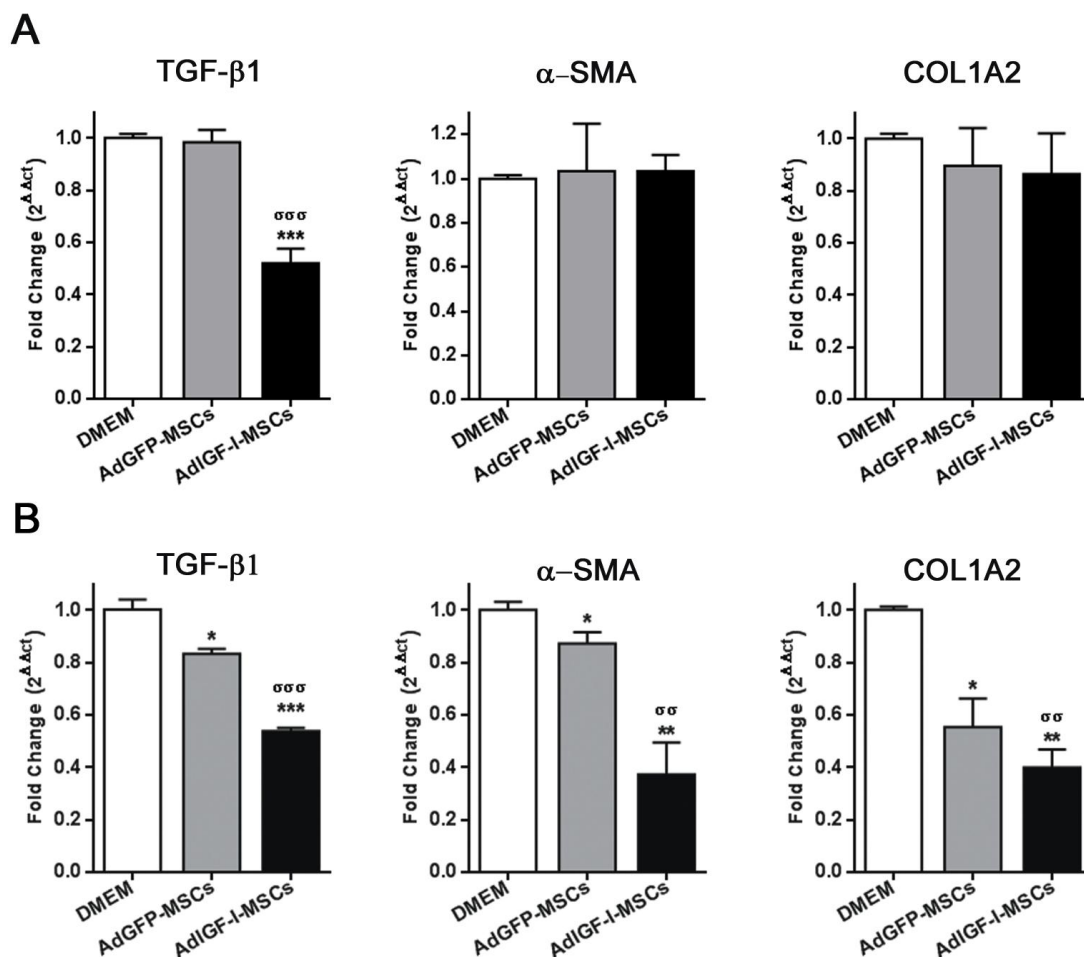
**Figura 21. Efecto terapéutico sobre la fibrosis hepática de las AdIGF-I-MSCs en el modelo de ligadura de colédoco. (A)** Microfotografías de preparados histológicos teñidos con Rojo Sirio provenientes de ratones tratados con solución salina (vehículo), AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs. **(B)** Morfometría de Rojo Sirio.  $\sigma$  <0.05, \*\* $p$ < 0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*vs. salino;  $\sigma$  vs. AdGFP-MSCs.

En conjunto, estos resultados nos permiten afirmar que la administración de las AdIGF-I-MSCs reduce la fibrosis hepática en los dos modelos experimentales evaluados. En ambos casos se redujo significativamente el depósito de colágeno y la expresión de factores claves en el progreso de la fibrogénesis. Estos resultados nos llevaron a indagar cuáles podrían ser los mecanismos involucrados en la mejora de la fibrosis hepática que es mediada por la aplicación sistémica de AdIGF-I-MSCs en el modelo de administración crónica de TAA.

### 3.6 Efecto de las AdIGF-MSCs sobre las células estrelladas hepáticas

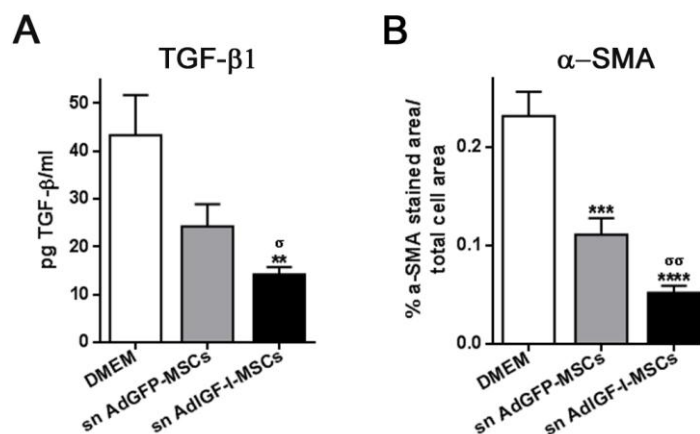
Los resultados obtenidos a partir de los experimentos *in vivo* parecerían sugerir que existe un efecto de las MSCs sobre la activación de las CEHs. Para analizar y eventualmente confirmar este mecanismo se utilizó una línea celular estable de CEHs. Células CFSC-2G fueron incubadas durante 18 h con el sobrenadante de cultivo de las AdIGF-I-MSCs o de AdGFP-MSCs, generado luego de 4 días de infección con los adenovirus. Es interesante destacar que solo la expresión de TGF-β1 se vio disminuida luego de este tiempo de incubación, mientras que la expresión de α-SMA y

COL1A2 permanecieron sin cambios (**Figura 22A**). Considerando que TGF- $\beta$ 1 es una de las citoquinas claves en la activación de CEHs y que cambios en su inducción podría resultar en cambios posteriores en la expresión de  $\alpha$ -SMA, se extendió el tiempo de incubación por 1 día más (40 horas totales). Como se puede observar en la **Figura 22B**, la exposición más prolongada con el sobrenadante de las AdIGF-I-MSCs mantuvo en menor nivel la expresión de TGF- $\beta$ 1 y, además, redujo significativamente la expresión del ARNm de  $\alpha$ -SMA y COL1A2 en CEHs en comparación con los otros tratamientos. Asimismo, este efecto también se observó, aunque en menor medida, con el sobrenadante de las AdGFP-MSCs.



**Figura 22. Efecto del sobrenadante de cultivo de las AdIGF-I-MSCs sobre las CEHs.** Análisis de la expresión de ARNm de TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA y COL1A2 en CEHs tratadas 18(A) y 40 (B) horas con DMEM (control) y medio condicionado AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs. Confirmación a nivel de proteína de expresión de TGF- $\beta$  (D) y  $\alpha$ -SMA (E).  $^{\ast\sigma}$ p<0.05;  $^{\ast\ast\sigma\sigma}$ p<0.01;  $^{\ast\ast\ast\sigma\sigma}$ p<0.001;  $^{\ast}$ vs. saline;  $^{\sigma}$ vs. AdGFP-MSCs.

Finalmente, nos propusimos confirmar al nivel proteico los cambios en la expresión de TGF- $\beta$ 1 activo y de  $\alpha$ -SMA. El análisis de cambios en la expresión de TGF- $\beta$ 1 se realizó por ELISA, a partir del sobrenadante de los cultivos de CEHs, las que fueron previamente incubadas por 40 horas con los medios condicionados. Tras recolectar los medios condicionados, las células fueron fijadas y se analizó la expresión de  $\alpha$ -SMA por inmunofluorescencia. Los resultados fueron consistentes con los obtenidos previamente al nivel de ARNm (**Figura 23**).



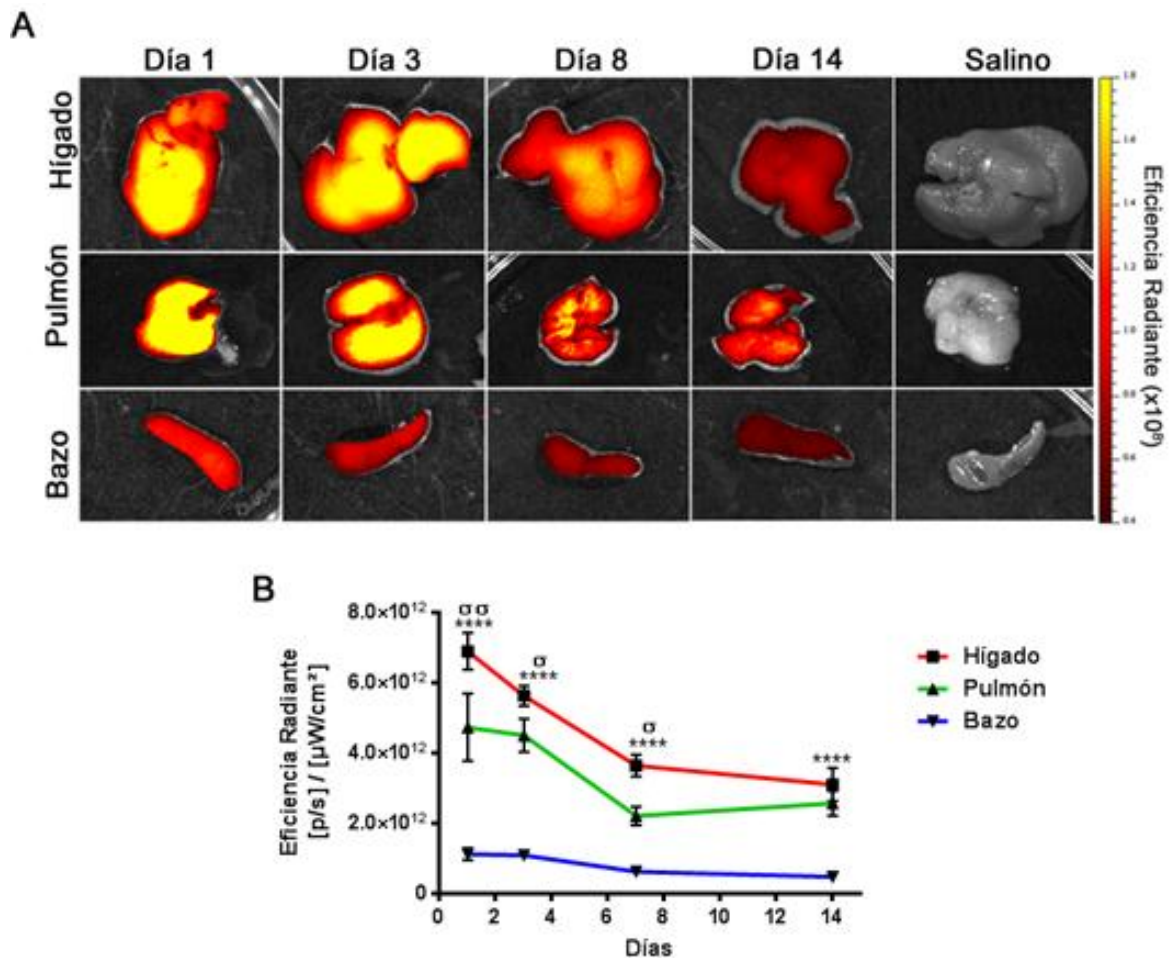
**Figura 23. Efecto del sobrenadante de cultivo de las AdIGF-I-MSCs sobre las CEHs.** Análisis de la expresión a nivel de proteína de la expresión TGF- $\beta$ 1 determinado por ELISA (A) y  $\alpha$ -SMA por inmunofluorescencia. La señal para  $\alpha$ -SMA positiva se expresó como el porcentaje de área positiva sobre el área total de la célula (B). \* $\sigma$  p<0.05; \*\* $\sigma\sigma$  p<0.01; \*\*\* $\sigma\sigma\sigma$  p<0.001; \*vs. saline;  $\sigma$  vs. AdGFP-MSCs.

En conjunto, estos datos sugieren que el tratamiento con las AdGFP-MSCs reduce la activación de las CEHs al menos *in vitro*; sin embargo, este efecto es aún superior cuando las MSCs sobre-expresan IGF-I, lo que resulta en una mayor reducción de la fibrosis hepática.

### 3.7 Biodistribución de las MSCs en el modelo de fibrosis hepática por aplicación de tioacetamida

Con el objetivo de analizar la supervivencia y distribución de las MSCs luego de su aplicación *in vivo*, las AdIGF-I-MSCs fueron marcadas *ex vivo* con un colorante

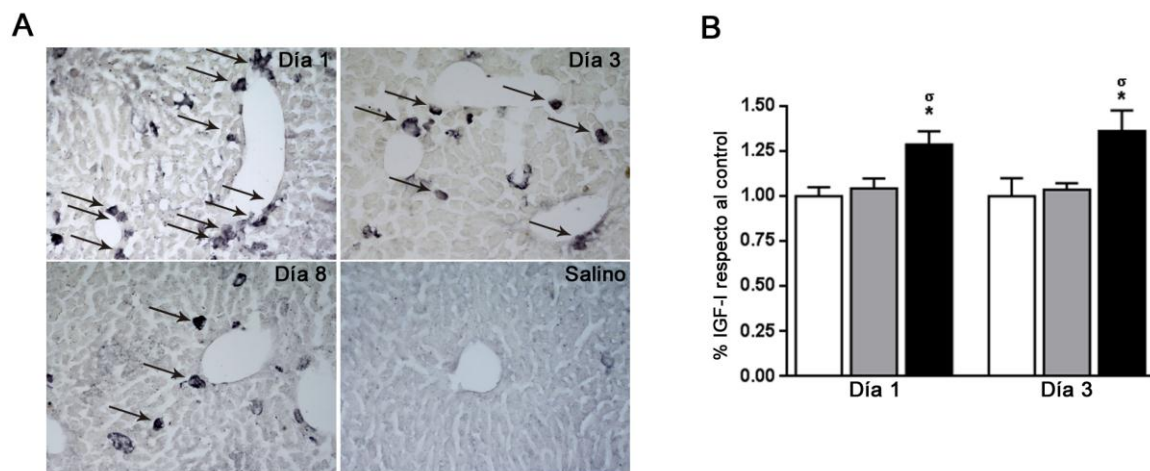
de emisión en el infrarrojo (DiR) previamente a ser administradas por vía venosa en ratones con fibrosis hepática establecida (6 semanas de inducción de fibrosis por TAA). Este colorante permite la monitorización de las células mediante el Sistema de Imágenes In Vivo Xenogen, el cual es capaz de detectar la señal fluorescente emitida por el colorante directamente en los órganos extraídos de los ratones. Los niveles de fluorescencia fueron analizados (expresados como eficiencia radiante) en el hígado, pulmón y bazo, a los 1, 3, 7 y 14 días posteriores a la administración de las células. Como se muestra en la **Figura 24**, se observó una señal más intensa de DiR en el hígado, con un pico al primer día después de la aplicación de las MSCs. Además, señales derivadas de MSCs fueron también registradas, aunque en menor intensidad, en el pulmón y en el bazo (**Figura 24**). En todos los casos, se observó una disminución en los niveles de DiR con el transcurso del tiempo.



**Figura 24. Biodistribución de las MSCs. (A)** Imágenes representativas de hígado, pulmón y bazo extraídos de ratones tratados con las AdIGF-I-MSCs teñidas con CM-DiR. Los órganos se extrajeron a día 1, 3, 8 y 14 post-administración y se tomaron imágenes de la fluorescencia emitida por los órganos (expresada como Eficiencia Radiante ([p/s]/[μW/cm<sup>2</sup>])). **(B)** Cuantificación de la eficiencia radiante y evolución de la fluorescencia en el tiempo. <sup>σ</sup>p<0.05; <sup>σσ</sup>p<0.01; <sup>\*\*\*\*</sup>p<0.001; <sup>σ</sup>vs. Pulmón; <sup>\*</sup>vs. Bazo

Con el fin de confirmar los resultados anteriores al nivel histológico, secciones de tejido hepático fibrótico proveniente de ratones tratados con AdGFP-MSCs fueron analizadas mediante inmunohistoquímica para GFP a 1, 3 y 8 días luego de la aplicación celular. De acuerdo con los resultados obtenidos por bioluminiscencia, un número significativo de células GFP<sup>+</sup> fue encontrado en el hígado en todos los tiempos de supervivencia analizados. Asimismo, se observó un pico en el número de MSCs presentes en el hígado al día de su aplicación con una reducción en esa frecuencia a través del tiempo (**Figura 25A**). A modo de control, no se observó marcación GFP<sup>+</sup> en las secciones de los animales tratados con vehículo ni cuando se

omitió incubación con anticuerpos primarios (**Figura 25A** y no mostrado). En consistencia con los resultados descriptos, se encontró un incremento significativo en los niveles de expresión de IGF-I en los ratones tratados con las AdIGF-I-MSCs en comparación con los controles, al día y a los 3 días posteriores a su aplicación, mediante ELISA (**Figura 25B**).



**Figura 25. Confirmación de localización de las MSCs.** (A) Microfotografías representativas de secciones de hígados de ratones tratados con vehículo o AdGFP-MSCs marcadas para GFP. Muestras obtenidas a día 1, 4 y 8 post-administración de las AdGFP-MSCs. (B) Cuantificación a nivel proteico de IGF-I en extractos de tejido hepático obtenidos 1 y 3 días después de inocular las AdIGF-I-MSCs. Se expresa en cantidades relativas al control sin tratamiento. Las barras representan al control salino (Blanco), AdGFP-MSCs (Gris) y AdIGF-I-MSCs (Negro). \*σp<0.05; \*vs. Salinoσ vs. AdGFP-MSCs.

### 3.8 Eventos tempranos luego del tratamiento con MSCs en el modelo de fibrosis hepática por aplicación de tioacetamida

Diversos mecanismos fueron propuestos anteriormente para explicar el efecto beneficioso de las MSCs cuando son utilizadas para tratar la fibrosis hepática. Sin embargo, en todos los casos dichos estudios fueron realizados a tiempos prolongados luego de la inoculación de las MSCs y no se investigó qué eventos tienen lugar a las pocas horas o días del momento del tratamiento. Considerando que el pico en el número de MSCs presentes en el hígado fue encontrado al día de su aplicación, analizamos el perfil de expresión de algunos genes relevantes a partir de muestras de

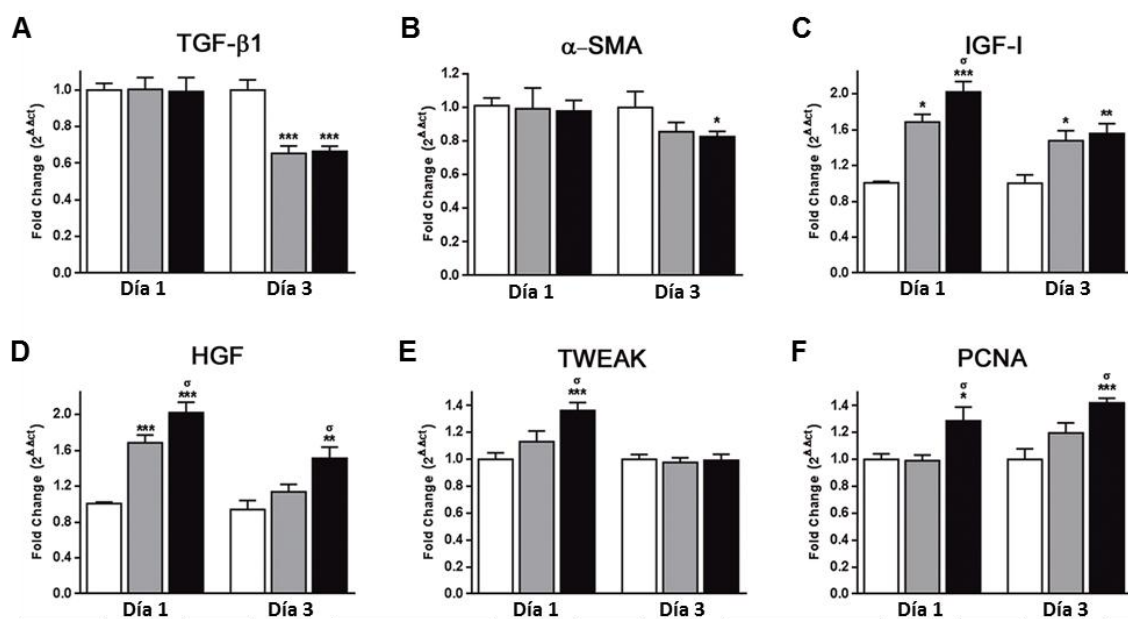


hígado tomadas tras 1 y 3 días de su administración. Como se muestra en la **Figura 26 (A, B)**, la expresión de ARNm de TGF- $\beta$ 1 y  $\alpha$ -SMA permaneció sin cambios durante el primer día. Interesantemente, la expresión de TGF- $\beta$ 1 disminuyó en el hígado de los ratones tratados con MSCs a los 3 días después de la terapia celular en comparación con los tratados con solución salina (**Figura 26A**); sin embargo, una reducción menor pero significativa en los niveles de expresión  $\alpha$ -SMA sólo se encontró en ratones que recibieron las AdIGF-I-MSCs (**Figura 26A**). Tal como se demostró en los experimentos in vitro, esto sugiere que la inhibición de TGF- $\beta$ 1 podría preceder a la de  $\alpha$ -SMA y que la regulación de la expresión de TGF- $\beta$ 1 (con cambios constatables recién a los 3 días) sería a su vez un efecto indirecto de la aplicación de las MSCs, pudiendo a su vez depender de cambios tisulares más tempranos.

En base a estos resultados, decidimos a explorar qué cambios moleculares podrían preceder a la regulación de TGF- $\beta$ 1 y  $\alpha$ -SMA en los hígados fibróticos de animales tratados con MSCs. Considerando que las MSCs tienen la capacidad de migrar a sitios de injuria y mediar la reparación de los tejidos a través la liberación de factores, en adición al efecto hepatoprotector y regenerativo de IGF-I, se evaluaron genes implicados en estos procesos. Como muestra la **Figura 26 (C, D)**, al primer día después del tratamiento con MSCs, los niveles expresión de ARNm de IGF-I endógeno y de HGF aumentaron considerablemente en el hígado de ratones tratados con las AdGFP-MSCs en comparación con el vehículo. Dicha expresión fue a su vez significativamente superior en el hígado de los ratones que fueron tratados con AdIGF-I-MSCs. Además, en la misma sobrevida y en animales tratados con AdIGFI-MSCs se observó un aumento en la expresión de TWEAK (TNF-*Weak Inducer of Apoptosis*) (**Figura 26E**), involucrada en la proliferación de las células progenitoras hepáticas. De forma similar, a los 3 días después del tratamiento, la expresión de IGF-I endógeno se mantuvo aumentada, aunque a niveles más bajos, en el hígado de los



animales tratados con MSCs en comparación con solución salina (**Figura 26A**). Un patrón similar se encontró para HGF, cuyos niveles de expresión permanecieron aumentados en el grupo AdIGF-I-MSCs (**Figura 26B**). No obstante, no se encontraron diferencias en los niveles de expresión de ARNm de IGF-I o HGF entre los grupos experimentales a los 14 días post-tratamiento (no mostrado). Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de IGF y de HGF podrían influir en la regeneración hepática y la proliferación de los hepatocitos, se analizaron los niveles de expresión del marcador de proliferación PCNA. Notablemente, PCNA se indujo significativamente en el tejido hepático luego de 1 y 3 días de la aplicación de las AdIGF-I-MSCs en comparación con AdGFP-MSCs o solución salina (**Figura 26F**).



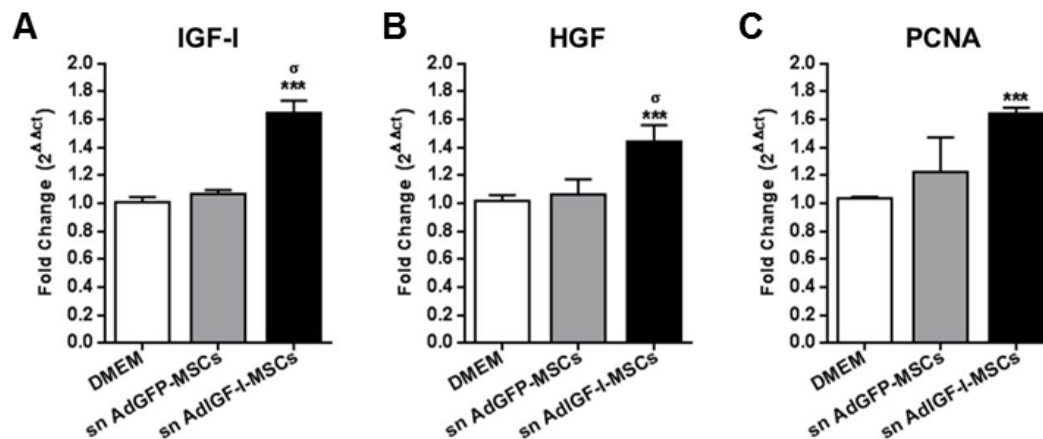
**Figura 26. Cambios tempranos en la expresión de factores pro-fibrogénicos y anti-fibrogénicos/regenerativos.** Análisis de la expresión de ARNm de TGF-β1 (A), α-SMA (B) IGF-I (C), HGF (D), TWEAK (E) y PCNA (F) en muestras de hígado extraídas luego de 1 y 3 de la administración de solución salina (barras blancas), AdGFP-MSCs (barra gris) y AdIGF-I-MSCs (barra negra). \*<sup>σ</sup>p<0.05; \*\*<sup>σσ</sup>p<0.01; \*\*\*p<0.001; \* vs. salino; <sup>σ</sup> vs. AdGFP-MSCs.

De los datos anteriores, se puede concluir que la aplicación de AdIGF-I-MSCs en el contexto de la fibrosis hepática resultaría en la inducción temprana de factores anti-fibrogénicos/pro-regenerativos como IGF-I y HGF y un aumento en la proliferación de células hepáticas, que se ven aumentados al 1<sup>er</sup> día después del tratamiento, y la

subsiguiente reducción de la activación las CEHs, al 3<sup>er</sup> día, sugerido por la reducción en los niveles de expresión de factores pro-fibrogénicos y marcadores de activación de CEHs como TGF- $\beta$ 1 y  $\alpha$ -SMA. Estos eventos tempranos probablemente están implicados en la mejora observada de la fibrosis hepática mediada por la aplicación de MSCs modificadas genéticamente.

### 3.9 Efecto de las AdIGF-MSCs sobre el cultivo primario de hepatocitos

Teniendo en cuenta los cambios importantes en los niveles de expresión de IGF-I y HGF en el tejido hepático de los animales con fibrosis tratados con AdIGF-I-MSCs nos preguntamos acerca de la posibilidad de que los hepatocitos pudieran ser inducidos por el tratamiento a sobre-expresar dichos factores. Con este fin, se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar el efecto del sobrenadante de las MSCs sobre cultivos primarios de hepatocitos. Los mismos fueron incubados durante toda la noche con los sobrenadantes de las AdIGF-I-MSCs y AdGFP-MSCs y se analizó la expresión de genes mediante qPCR. Como se muestra en la **Figura 27**, los niveles de expresión de ARNm de IGF-I y HGF aumentaron en los hepatocitos que fueron expuestos al sobrenadante de las AdIGF-I-MSCs (snAdIGF-I-MSCs) en comparación con los controles (snAdGFP-MSCs y DMEM). Más aún, los hepatocitos tratados con snAdIGF-I-MSCs aumentaron al doble sus niveles de expresión del ARNm de PCNA (**Figura 27C**). En base a dichos resultados, podemos concluir que factores liberados por las AdIGF-I-MSCs inducen la expresión de otros en hepatocitos que estarían relacionados con su supervivencia y proliferación, tales como IGF-I, HGF y PCNA, los que mediarían en parte el efecto de la terapia génica celular.

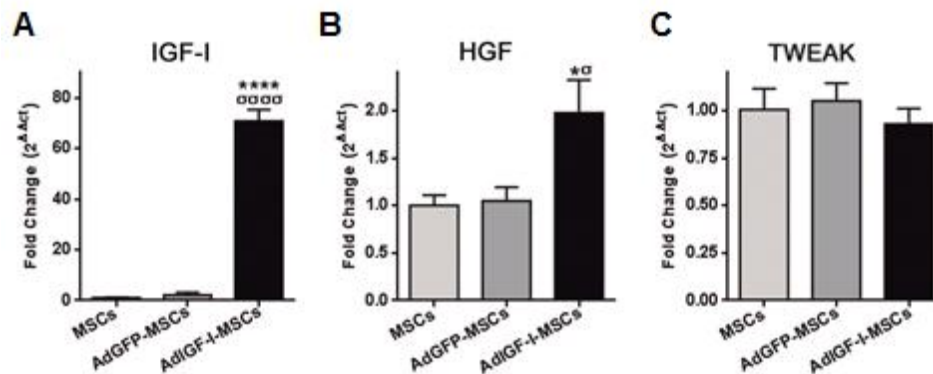


**Figura 27. Efecto del sobrenadante de cultivo de las AdIGF-I-MSCs sobre un cultivo primario de hepatocitos.** Análisis de la expresión de ARNm de IGF-I (A), HGF (B) y PCNA (C) en hepatocitos tratados 18 horas con DMEM (control) o sobrenadante (sn) de AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs. <sup>\*</sup>p<0.05; <sup>\*\*\*</sup>p<0.001; <sup>\*</sup>vs. DMEM; <sup>σ</sup>vs. sn AdGFP-MSCs.

### 3.10 Efecto de la transducción de las MSCs con el AdIGF en el perfil de expresión de genes pro-regenerativos

Considerando que la modificación génica de las MSCs, principalmente por expresión exógena de AdIGF-I, podría modificar el perfil de expresión de genes relevantes involucrados en el efecto terapéutico de las AdIGF-I-MSCs, decidimos evaluar la expresión de factores pro-regenerativos que pueden estar siendo liberados por estas células en el hígado fibrótico al momento de su administración sistémica. De este modo, por qPCR fueron analizados los niveles de ARNm de IGF-I, HGF y TWEAK en MSCs, AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs luego de 4 días de infección con los respectivos adenovirus. Como era esperable, las AdIGF-I-MSCs sobre-expresaron niveles muy superiores de IGF-I en comparación con los controles (**Figura 28A**). Además, estas células aumentaron también significativamente los niveles de ARNm de HGF; sin embargo, TWEAK permaneció invariable (**Figura 28B-C**). De todos modos, no es menos relevante el dato de que las MSCs expresan TWEAK ya que hasta el momento esto no se hallaba reportado y sugeriría que el resultado de la **Figura 26E** podría deberse a un mayor reclutamiento de AdIGF-I-MSCs en el hígado en

comparación con las AdGFP-MSCs o a una mayor proliferación de células progenitoras hepáticas.

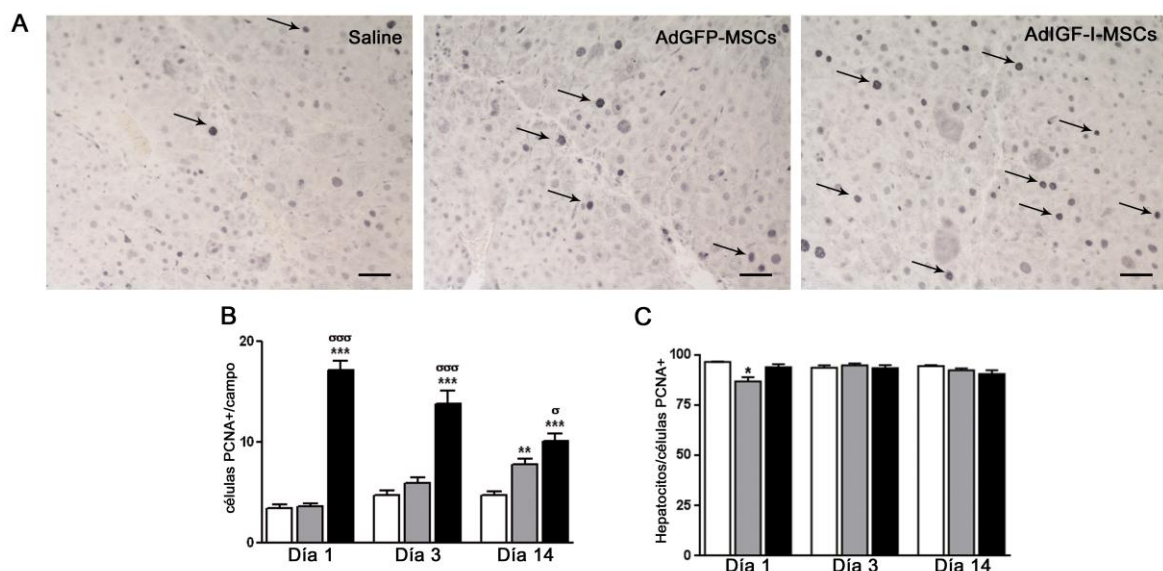


**Figura 28. Perfil de expresión genes pro-regenerativos de las AdIGF-I-MSCs.** Análisis de la expresión de ARNm de IGF-I (A), HGF (B) y TWEAK (C) en las MSCs, AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSC. \*<sup>σ</sup> p<0.05; \*\*\*\*<sup>σσσσ</sup> p<0.0001; \* vs. MSCs; <sup>σ</sup>vs. AdGFP-MSCs.

### 3.11 Inducción de la proliferación celular debida a la aplicación de MSCs

Más arriba reportamos un aumento en los niveles de expresión del ARNm de PCNA a partir del 1er día luego de la administración de las AdIGF-I-MSCs, en comparación con los tratamientos control. Asimismo, el patrón de expresión de ARNm de PCNA luego de 1 y 3 días de la aplicación de las AdGFP-MSCs sugiere una tendencia a aumentar en comparación con el grupo salino (**Figura 26F**). Teniendo en cuenta esos datos, se evaluó la proliferación celular en secciones de tejido hepático mediante análisis de la expresión a nivel proteico de PCNA por inmunohistoquímica. Como se muestra en la **Figura 29 (A-C)**, a los 14 días posteriores al tratamiento se observó un aumento en el número de hepatocitos en proliferación en los animales tratados con MSCs. Además, este efecto fue superior luego de administrar AdIGF-I-MSCs a todas las sobrevividas analizadas, con un pico al 1er día post-tratamiento y posterior gradual decaimiento (**Figura 29D**, barras negras). No obstante, en los animales que recibieron AdGFP-MSCs, se observa un aumento en el número de células en proliferación que con el tiempo llega a ser significativo, en relación con el

grupo tratado con solución salina, a los 14 días luego de la aplicación celular (**Figura 29B**, barras grises). Como se puede ver en la **Figura 29C**, prácticamente la totalidad de las células PCNA+ en el tejido hepático de los distintos grupos fueron hepatocitos (identificados por criterio morfológico: forma celular, tamaño y localización nuclear y abundante citoplasma). Este resultado demuestra que el principal estímulo pro-regenerativo de las AdIGF-I-MSCs se daría través de la inducción de la proliferación de hepatocitos y que los mismos hepatocitos del tejido hepático fibrótico son fuente de factores pro-regenerativos y anti-fibrogénicos como IGF-I y HGF.



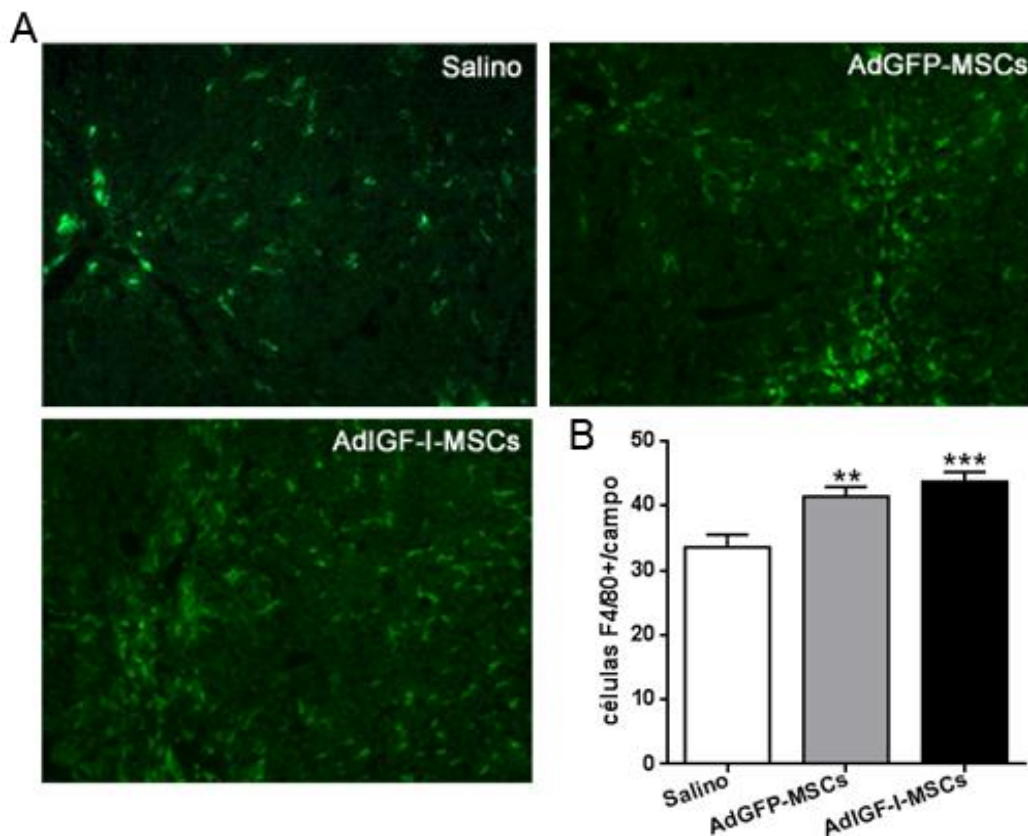
**Figura 29. Efecto de las AdIGF-I-MSCs sobre la regeneración hepática. (A)** Microfotografías representativas de secciones de hígado marcadas para PCNA, grupo salino, AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs. **(B)** Cuantificación de células PCNA+ a día 1, 3 y 14 post-tratamiento (salino, barras blanca; AdGFP-MSCs, barras grises, AdIGF-I-MSCs, barras negras). **(C)** Cuantificación del porcentaje de hepatocitos PCNA+ del total de células que expresan PCNA. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*vs. saline;  $^{\sigma}$ vs. AdGFP-MSCs.

### 3.12 Incidencia de macrófagos hepáticos luego del tratamiento con AdIGF-I-MSCs

Otro componente celular muy importante tanto en la progresión como en la resolución de la fibrosis hepática está constituido por los macrófagos hepáticos, una población mixta de células de Kupffer y macrófagos infiltrantes. Las células de Kupffer

reciben diversos estímulos provenientes de las CEHs, hepatocitos en apoptosis, microvesículas extracelulares, etc., que inducen su producción y liberación de factores profibrogénicos. Estos factores pro-fibrogénicos liberados por las células de Kupffer atraen a otras células del sistema inmunológico y ello exacerba aún más el progreso de la patología. Entre estas células atraídas hacia el hígado se encuentran monocitos/macrófagos que infiltran el tejido. Sin embargo, en los casos en que la injuria hepática fuera detenida, los monocitos/macrófagos (“restaurativos”) infiltrantes tienen la capacidad de resolver la fibrosis hepática, liberando enzimas que degradan la MEC y factores pro-regenerativos (Ramachandran et al., 2012). Teniendo en cuenta que durante este trabajo de tesis pudimos demostrar que la administración de las MSCs produce el efecto de reducir el grado de fibrosis hepática, siendo el mismo superior cuando las MSCs sobre-expresan IGF-I, y que este efecto se desencadena durante las primeras horas después del tratamiento, decidimos evaluar en este contexto la modulación de la actividad biológica de los macrófagos hepáticos al día siguiente de la administración celular, siguiendo un protocolo similar al aplicado en el análisis del efecto terapéutico sobre la fibrosis hepática establecida mediante aplicación crónica de TAA.

Como punto de partida, analizamos la presencia de macrófagos en el hígado mediante inmunomarcación para F4/80 de secciones de tejido hepático tomadas al día siguiente del tratamiento. Como se muestra en la **Figura 30**, la administración de las MSCs induce un aumento en la presencia de macrófagos en el tejido hepático.



**Figura 30. Presencia de macrófagos en el tejido hepático luego del tratamiento con las MSCs. (A)** Microfotografías representativas de secciones de hígado marcadas por inmunofluorescencia para F4/80 en secciones de hígado tomadas un día posterior a la administración de solución salina, AdGFP-MSCs o AdIGF-I-MSCs. **(B)** Cuantificación de células F4/80+ a día 1post.tratamiento. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*vs. salino.

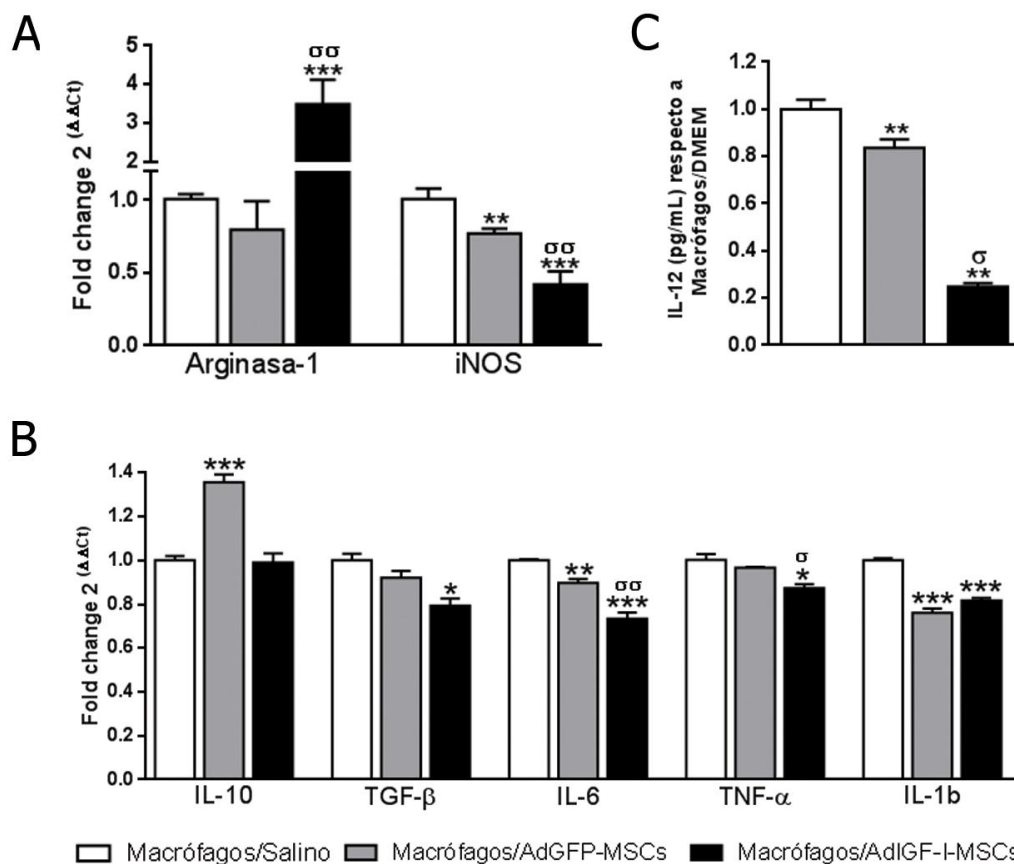
### 3.13 Modulación de la actividad biológica de los macrófagos hepáticos por las MSCs

Teniendo en cuenta el aumento encontrado en la incidencia de macrófagos activos y la inducción en la expresión de factores pro-regenerativos por parte del tejido hepático al día del tratamiento con MSCs, decidimos evaluar el perfil de expresión génica de los mismos. Para esto, al día posterior al tratamiento, se aislaron macrófagos hepáticos por perfusión *in situ*, a partir de la fracción de células no parenquimatosas del hígado, y se evaluó la expresión de citoquinas y mediadores de la producción de óxido nítrico (NO), molécula clave en procesos inflamatorios. El NO es sintetizado a partir de arginina por la enzima NO sintetasa inducible (iNOS), cuya

expresión es incrementada por acción de citoquinas tipo Th1 como TNF- $\alpha$ , IL1, INF- $\gamma$ , etc. Por otro lado, la arginina es también sustrato principal de la Arginasa-1 (Arg-1) en la síntesis de ornitina en la última reacción del ciclo de la urea; esta enzima es inducible por citoquinas tipo Th2, como IL4 e IL10 (Briken and Mosser, 2011). De esta forma, tanto iNOS como Arg-1 que son expresadas por los macrófagos competirían por el mismo sustrato y el tipo de actividad de estas células estaría caracterizado por su perfil de expresión génica (produciendo mayores niveles de iNOS o de Arg-1) el cual sería modulado por el tipo de citoquinas y/o factores solubles presentes en el microambiente celular. De modo que los macrófagos con un perfil pro-inflamatorio (M1), expresan mayormente iNOS, mientras que los macrófagos anti-inflamatorios (M2) expresan altos niveles de Arg-1. Como se observa en la **Figura 31A**, en los macrófagos hepáticos aislados a partir de ratones tratados con las AdIGF-I-MSCs se indujo la expresión génica de Arg-1 y reprimió la de iNOS en relación con el control salino y con AdGFP-MSCs. De forma similar, los niveles de expresión de ARNm de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL6 e IL1b se reprimieron significativamente en los macrófagos provenientes de ratones tratados con las AdIGF-I-MSCs respecto a los controles con AdGFP-MSCs y salino (**Figura 31B**). Sin embargo, los niveles de expresión de IL10 solo se detectaron aumentados en los macrófagos provenientes de ratones tratados con AdGFP-MSCs. Un caso particular es el de la expresión de TGF- $\beta$ 1, ya que si bien es una citoquina considerada habitualmente dentro del subtipo M2 de macrófagos, también se halla involucrada directamente en la activación de las CEHs. Consistentemente con los resultados de una reducción más significativa de la fibrosis hepática luego del tratamiento con AdIGF-I-MSCs, se observa una reducción en la expresión de TGF- $\beta$ 1 en los macrófagos aislados a partir de los hígados de ratones correspondientes a ese grupo experimental (**Figura 31B**). Finalmente, se comparó mediante ELISA la producción de IL12 (p40/p70) en el sobrenadante de



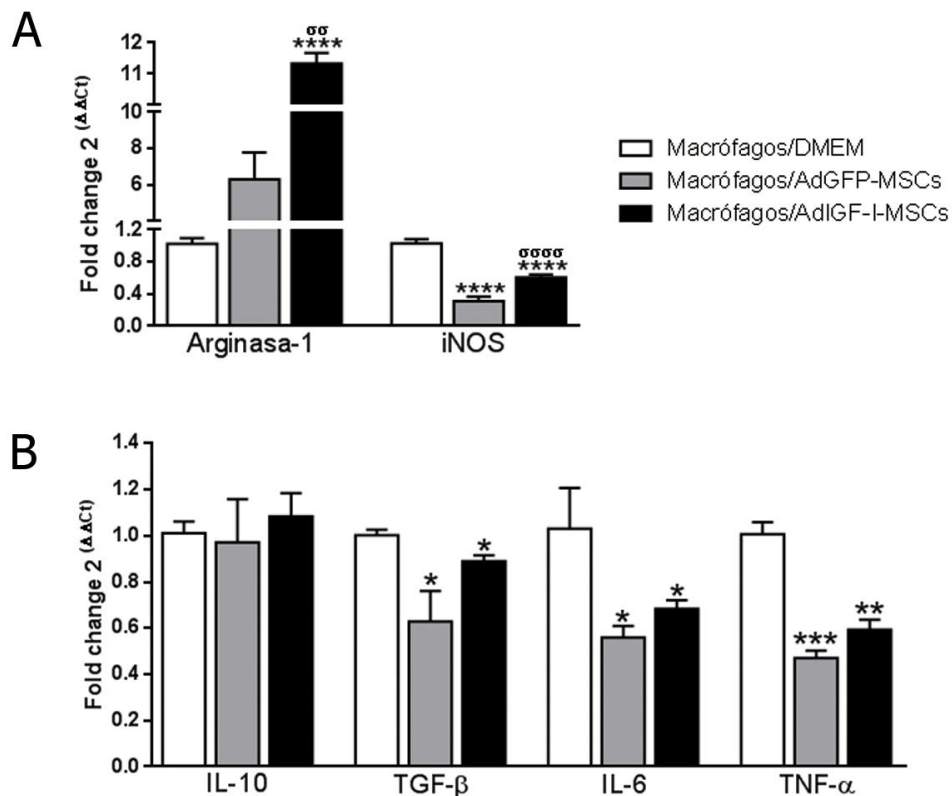
cultivos de macrófagos aislados de tejido hepático en las distintas condiciones. Aquellos provenientes de animales tratados con AdGFP-MSCs produjeron menores niveles de esa citoquina que los tratados con vehículo (**Figura 31C**). A su vez, la concentración de IL12 en los sobrenadantes provenientes de macrófagos obtenidos de hígados provenientes de animales tratados con AdIGF-I-MSCs fue aún menor que en los provenientes del grupo AdGFP-MSCs (**Figura 31C**).



**Figura 31. Modulación del perfil de expresión de los macrófagos hepáticos luego del tratamiento con las MSCs.** Análisis de la expresión de ARNm de mediadores de la producción de ON, iNOS y Arginasa 1 (**A**) y citoquinas implicadas en el proceso fibrogénico TGF- $\beta$ 1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1b e IL-10 (**B**) en macrófagos obtenidos al día posterior de la administración de solución salina (barras blanca), AdGFP-MSCs (barra gris) y AdIGF-I-MSCs (barra negra). (**C**) Expresión de IL-12 a nivel proteico en el sobrenadante de los macrófagos hepáticos.  $\sigma$   $p < 0.05$ ;  $\sigma\sigma$   $p < 0.01$ ;  $\sigma\sigma\sigma$   $p < 0.001$ ; \* vs. Macrófagos/salino;  $\sigma$  vs. Macrófagos/AdGFP-MSCs.

### 3.14 Factores producidos por las MSCs en la modulación de la actividad biológica de los macrófagos hepáticos

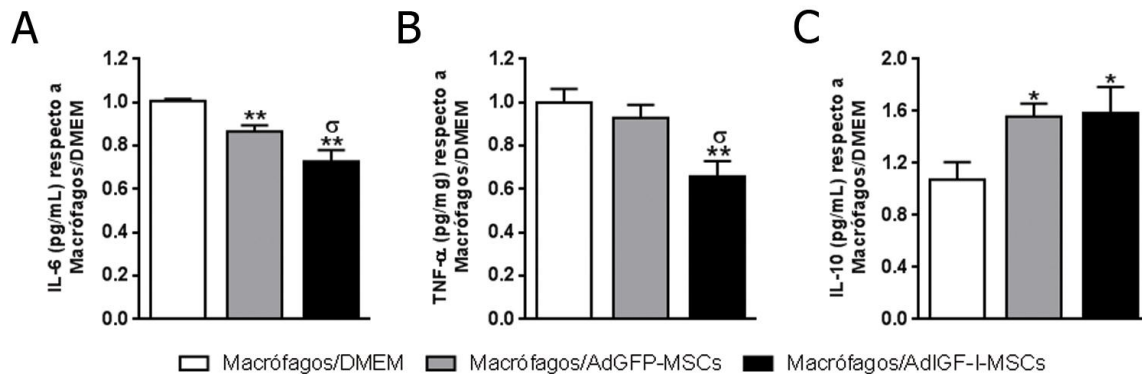
Con el objetivo de evaluar si el efecto en la modulación del perfil de expresión de macrófagos, y como consecuencia su actividad biológica, estaría mediada por factores liberados por las MSCs, analizamos el efecto del sobrenadante de las MSCs sobre la expresión génica de los macrófagos hepáticos aislados a partir de ratones con fibrosis establecida luego de 6 semanas con TAA. Para esto, los macrófagos aislados fueron incubados durante 18 horas con DMEM, sobrenadante de cultivo de las AdGFP-MSCs o AdIGF-I-MSCs, todos suplementados con SFB al 2%; y luego de la incubación se analizó la expresión de ARNm de citoquinas y mediadores de la producción de NO. Consistentemente con los resultados anteriores, el nivel de expresión de Arg-1 aumentó luego del tratamiento con sobrenadante de AdIGF-I-MSCs y el de iNOS disminuyó luego de la incubación con los sobrenadantes de MSCs (**Figura 32A**). Asimismo, los niveles de expresión de ARNm de IL6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 disminuyeron significativamente en los macrófagos tratados con el sobrenadante de las MSCs respecto al control incubado con DMEM, mientras que los niveles de expresión de IL10 no se modificaron (**Figura 32B**). A partir de estos resultados podemos concluir que factores solubles producidos por las MSCs explicarían, al menos parcialmente, el efecto de modulación de la expresión génica de los macrófagos encontrado *in vivo*.



**Figura 32. Efecto de los factores producidos por las MSCs en la modulación del perfil de expresión génica de los macrófagos hepáticos.** Análisis de la expresión de ARNm de mediadores de la producción de ON, iNOS y Arginasa 1 (A) y citoquinas implicadas en el proceso fibrogénico TGF-β1, IL-6, TNF-α e IL-10 (B) en macrófagos pre-incubados durante 18 hpras con DMEM (barras blanca), snAdGFP-MSCs (barra gris) o snAdIGF-I-MSCs (barra negra). \*<sup>σ</sup>p<0.05; \*\*<sup>σσ</sup>p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*<sup>σσσσ</sup>p<0.0001; \* vs. Macrófagos/DMEM; <sup>σ</sup> vs. Macrófagos/AdGFP-MSCs.

Previamente encontramos que los macrófagos aislados a partir de animales tratados con AdGFP-MSCs liberaron concentraciones menores de IL12 que los tratados con vehículo y que este efecto fue mucho más notable en los animales tratados con AdIGF-I-MSCs. Quisimos entonces confirmar también al nivel proteico, mediante ELISA, la regulación de la expresión de IL6, TNF-α e IL10 por parte de macrófagos provenientes de hígados cirróticos tratados con sobrenadantes de MSCs o DMEM. Como se observa en la **Figura 33A**, los niveles de IL6 en el sobrenadante de los macrófagos tratados con medios condicionados de MSCs disminuyeron en comparación con el control, siendo este efecto superior en la condición AdIGF-I-MSCs. Un patrón similar se detectó en la expresión de TNF-α en extractos proteicos (**Figura**

**33B).** Asimismo, los niveles de IL10 en el sobrenadante de cultivo de los macrófagos incubados con los medios condicionados de MSCs aumentaron en relación con el control (**Figura 32C**).

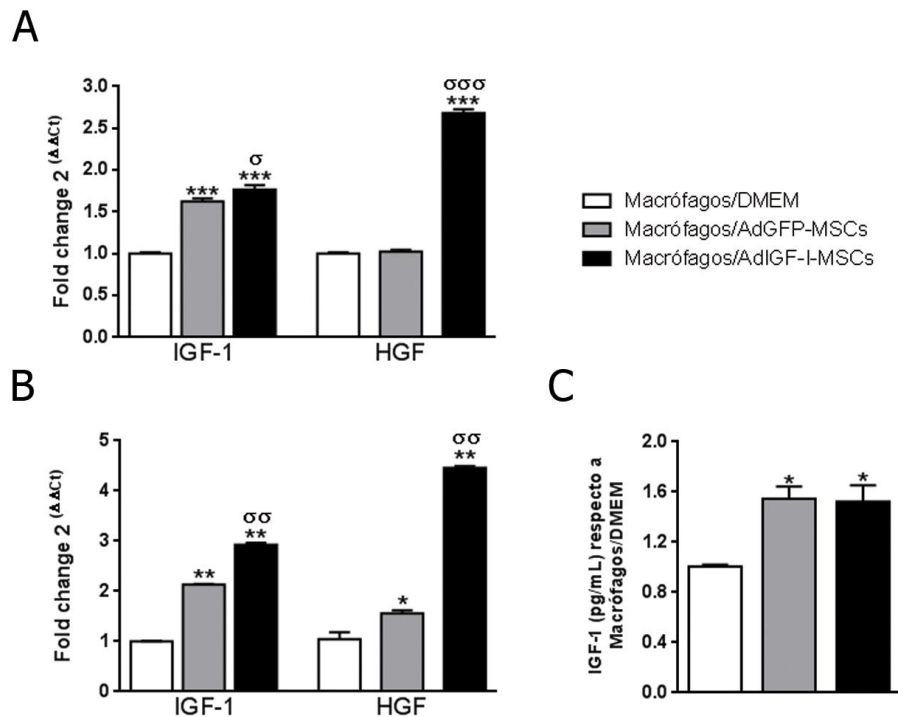


**Figura 33. Efecto de los factores producidos por las MSCs en la modulación del perfil de expresión de los macrófagos hepáticos.** Confirmación a nivel proteico de la expresión de IL-6 en el sobrenadante (A), TNF- $\alpha$  en extracto citoplasmático (B) e IL-10 en sobrenadante de macrófagos pre-incubados durante 18 hpras con DMEM (barras blanca), snAdGFP-MSCs (barra gris) o snAdIGF-I-MSCs (barra negra). \* $\sigma$ p<0.05; \*\* $\sigma$ p<0.01; \* vs. Macrófagos/DMEM;  $\sigma$  vs. Macrófagos/AdGFP-MSCs.

### 3.15 Producción de factores de crecimientos de los macrófagos hepáticos modulados por las MSCs

Por otro lado, ha sido reportado que los macrófagos restaurativos involucrados en la resolución de la fibrosis hepática expresarían altos niveles de factores de crecimiento promoviendo la regeneración del tejido hepático (Ramachandran and Iredale, 2012). Por lo tanto, nos preguntamos si la aplicación de MSCs podría resultar en cambios en la expresión génica de factores de crecimiento pro-regenerativos, tales como IGF-I y HGF, por parte de macrófagos hepáticos en el contexto de la fibrosis hepática establecida. Se aislaron los macrófagos a partir de muestras de hígado al día de tratamiento experimental y se encontró que aquellos provenientes de ratones tratados con AdGFP-MSCs expresaron mayores niveles de IGF-I que aquellos tratados con vehículo (**Figura 34A**). Este efecto fue aún más significativo en los macrófagos aislados a partir de animales tratados con AdIGF-I-MSCs (**Figura 34A**).

Notablemente, los niveles de ARNm de HGF aumentaron solamente en los macrófagos provenientes de ratones tratados con las AdIGF-I-MSCs (**Figura 34A**). En concordancia con este resultado, al exponer *in vitro* macrófagos aislados a partir de hígados con fibrosis establecida al medio condicionado de las MSCs se observó una modulación similar a la detectada en el experimento *in vivo* (**Figura 34B**). Estos resultados fueron confirmados analizando mediante ELISA en el sobrenadante de los macrófagos expuestos previamente al medio condicionado de las AdIGF-I-MSCs y AdGFP-MSCs, detectándose un aumento en los niveles de IGF-I respecto a las condiciones controles (**Figura 34C**). Por lo tanto podemos concluir, que la aplicación *in vivo* de AdGFP-MSCs en un modelo de fibrosis hepática establecida mediante inyección crónica de TAA resulta en una inducción en los niveles de expresión de IGF-I por parte de macrófagos hepáticos y que dicha inducción es significativamente mayor en el caso de tratamiento con AdIGF-I-MSCs. Además este último tratamiento, resulta en la sobre-expresión de HGF por parte de macrófagos en comparación con las otras condiciones control. Estos efectos estarían mediados, al menos en parte, por factores solubles producidos por las MSCs.

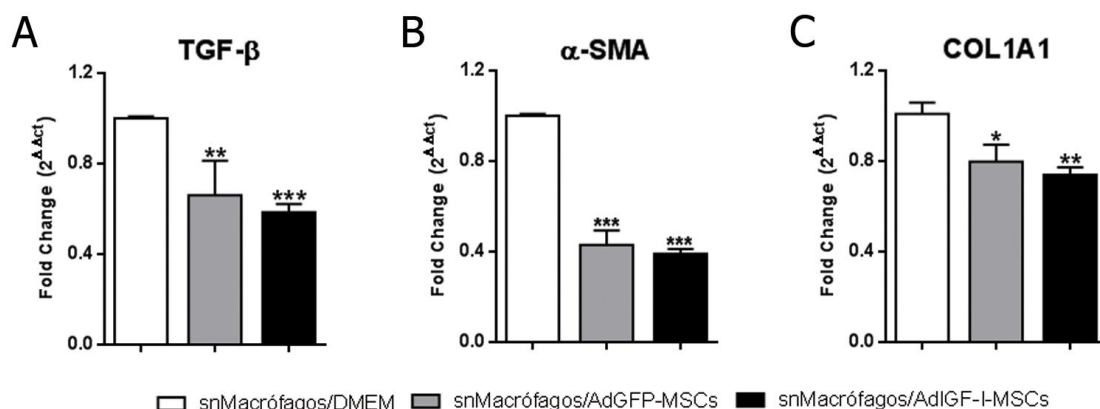


**Figura 34. Inducción en la expresión de factores pro-regenerativos en macrófagos hepáticos por el tratamiento con MSCs. (A)** Análisis de la expresión de ARN mensajero de IGF-1 y HGF en macrófagos hepáticos aislados el día posterior al tratamiento con solución salina (barra blanca), AdGFP-MSCs (barra gris) o AdIGF-I-MSCs (barra negra) de ratones con fibrosis hepática establecida. **(B)** Expresión génica de IGF-1 y HGF en macrófagos pre-incubados *in vitro* con el sobrenadante de las AdGFP-MSCs (barra gris) o AdIGF-I-MSCs en relación al control incubado con DMEM (barra blanca). **(C)** Confirmación a nivel proteico de la producción de IGF-1 en el sobrenadante de macrófagos pre-tratados *in vitro*. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. salino/DMEM;  $\sigma$  vs. AdGFP-MSCs/snAdGFP-MSCs.

### 3.16 Efecto de los macrófagos hepáticos pre-condicionados con sobrenadantes de MSCs transducidas con adenovirus sobre CEHs

Teniendo en cuenta que factores liberados por las MSCs modifican, en parte, el perfil de secreción de citoquinas y mediadores inflamatorios como el NO por parte de macrófagos hepáticos, decidimos evaluar el efecto sobre las CEHs de dicha modulación ejercida sobre los macrófagos. Para esto, células CFSC-2G fueron incubadas durante 18 horas con el sobrenadante de cultivo de los macrófagos pre-tratados con DMEM (snMacrófagos/DMEM) o con los medios condicionados de las AdIGF-I-MSCs (snMacrófagos/AdIGF-I-MSCs) o AdGFP-MSCs (snMacrófagos/

AdGFP-MSCs) y se evaluó la expresión génica de TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA y COL1A2. Como se observa en la **Figura 35A**, los niveles de ARNm de los tres genes evaluados disminuyeron en las células tratadas con snMacrófagos/AdIGF-I-MSCs y snMacrófagos/AdGFP-MSCs en comparación con el control (sdMacrófagos/DMEM). Si bien el efecto del snMacrófagos/AdIGF-I-MSCs sobre las CEHs demuestra una disminución mayor que el snMacrófagos/AdGFP-MSCs, no se detectaron diferencias significativas entre estos dos tratamientos en la expresión de TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA y COL1A2 (**Figura 35B-C**). Por lo tanto, a partir de estos resultados podemos concluir que factores solubles producidos por los macrófagos pretratados con sobrenadante de MSCs resultaron en un perfil de expresión de CEHs compatible con una menor actividad celular pro-fibrogénica.

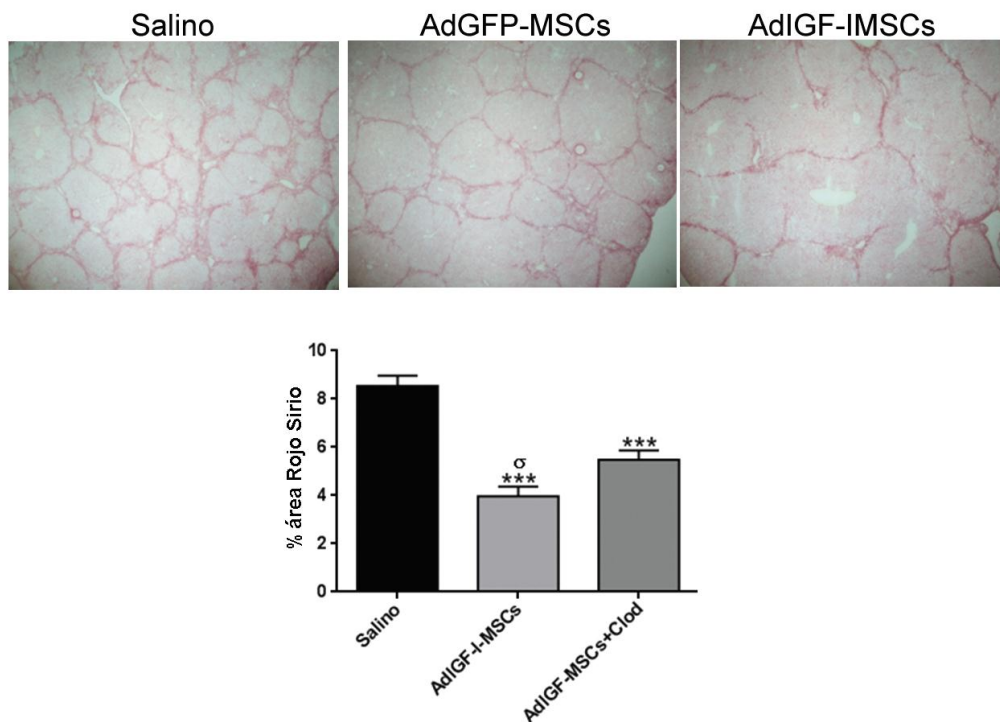


**Figura 35. Efecto sobre las CEHs de los macrófagos hepáticos modulados por las MSCs.** Análisis de los niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1 (A),  $\alpha$ -SMA (B) y COL1A2 (C) en células CFSC-2G incubadas durante 18 horas con el sobrenadante de los macrófagos modulados por las MSCs. Macrófagos/DMEM (barras blanca), snMacrófagos/AdGFP-MSCs (barra gris) o snMacrófagos/AdIGF-I-MSCs (barra negra). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* vs. Macrófagos/DMEM.

### 3.17 Efecto de la depleción de macrófagos sobre la acción terapéutica de las AdIGF-I-MSCs

En conjunto, los resultados anteriores permiten concluir que las MSCs modularían la actividad biológica de los macrófagos hepáticos induciéndolos hacia un

perfil restaurativo en el contexto de la fibrosis hepática establecida. Nos preguntamos entonces si dicha modulación de la actividad macrofágica podría mediar al menos en parte el efecto terapéutico de las AdIGF-I-MSCs sobre la cirrosis hepática. Con este fin, se evaluó el efecto terapéutico de las AdIGF-I-MSCs en el modelo de fibrosis hepática inducido por TAA en ratones que fueron previamente depletados de macrófagos hepáticos, mediante administración de clodronato encapsulado en liposomas (LipClod). Como se observa en la **Figura 36**, el resultado del análisis comparativo densitométrico de acúmulos de colágeno fibrilar (marca de Rojo Sirio) permite concluir que la depleción de macrófagos en el grupo de animales tratados con AdIGF-I-MSCs reduciría significativamente su eficiencia terapéutica.



**Figura 36. Efecto de la depleción de macrófagos hepáticos sobre el terapéutico de las AdIGF-I-MSCs.** Cuantificación realizada por morfometría de Rojo Sirio a partir de muestras de hígado provenientes de ratones con fibrosis establecida tratados con solución salina (vehículo), AdIGF-I-MSCs o AdIGF-I-MSCs + LipClod.  $\sigma < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ ; \*vs Salino,  $\sigma$  vs AdIGF-I-MSCs+LipClod



### 3.18 Mecanismos involucrados en la regeneración hepática inducida por el tratamiento con las MSCs

Los resultados anteriores sugieren algunos de los mecanismos involucrados en la resolución de la fibrosis hepática establecida inducidos por la aplicación sistémica de AdIGF-I-MSCs. Entre ellos se mostraron evidencias de que las MSCs, y factores producidos por ellas, modularían la actividad biológica de macrófagos, adoptando un perfil restaurativo y del tipo pro-regenerativo. Asimismo, se analizó el efecto de factores solubles producidos por las MSCs sobre la actividad de las CEHs. Asimismo, nuestros estudios *in vivo* e *in vitro* nos permitieron demostrar que el tratamiento con las MSCs induce la producción de IGF-I, HGF y TWEAK en el tejido hepático a partir de las primeras horas posteriores a la administración celular y que ello se acompaña con una inducción de la regeneración hepática. Con el objetivo de analizar posibles mecanismos involucrados en la proliferación de hepatocitos luego del tratamiento con las MSCs, se evaluó la expresión de genes implicados en la división celular mediante un arreglo de PCR al día posterior a la administración de las AdIGF-I-MSCs, tiempo en el cuál se observó el máximo efecto regenerativo. Para esto, se mezclaron alícuotas de dos muestras de ARN provenientes de tejido hepático de ratones que recibieron solución salina por vía intravenosa (control) o AdIGF-I-MSCs y se realizó la síntesis de ADNc. El tratamiento con AdIGF-I-MSCs moduló notablemente la expresión de genes implicados en diferentes funciones del ciclo celular (**Figura 37**). Indujo la expresión de genes involucrados en el control de calidad de la síntesis y reparación del daño del ADN, como *Brca2* (*Breast cáncer 2*), *Myb* (*Myeloblastosis oncogene*), *Abl1* (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) y *Gpr132* (*G protein-coupled receptor 132*) (*fold change*: 14; 4,7; 4,3 y 2 respectivamente) (Davies et al., 2001; Patel et al., 1998; Shaul and Ben-Yehoyada, 2005; Weng et al., 1998; Werwein et al., 2012). Asimismo, el tratamiento indujo la expresión de genes implicados en la regulación del progreso

del ciclo celular como *Ccna1* (Ciclina A1), *E2f2* (Efr transcription factor 2), *Rbl2* (*Retinoblastoma-like proteín 2*) además de *Gpr132* (*fold change*; 4; 2,4; 2 y 2 respectivamente) (Delgado et al., 2011; Garriga et al., 1998; Huynh, 2004). Además, es importante destacar que algunos de estos genes, como *Myb* y *Rbl2*, además de *Cdkn2a* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*; *fold change*: 2) actúan como supresores tumorales (Harashima et al., 2013).

Además, el tratamiento con AdIGF-I-MSCs resultó en una disminución en los niveles de ARNm del gen *Gadd45 $\alpha$*  (*Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha*; *fold change*: 2,9 vs. solución salina), relacionado con estrés celular, daño del ADN y arresto de la división celular (Gramantieri et al., 2005; Shan et al., 2012). Por otro lado, la administración de las AdIGF-I-MSCs indujo la sobre-expresión de *Notch2* (*fold change*: 5), un receptor de membrana involucrado en la proliferación celular de hepatoblastos. (Ortica et al., 2014).

Estos resultados fueron validados mediante qPCR, comparando los niveles de expresión en el hígado de los genes más modulados en las distintas condiciones experimentales (salino, AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs) al día de tratamiento. Como se puede observar en la **Figura 38**, las qPCR de los genes analizados permitieron confirmar un aumento en la expresión de *Brca2*, *Myb*, *Notch2* y *Ccna1*, y una reducción en la expresión de *Gadd45 $\alpha$*  como consecuencia del tratamiento con AdIGF-I-MSCs. Consistentemente con los resultados de los estudios *in vivo* que no muestran cambios significativos en la proliferación de hepatocitos al día de administración de AdGFP-MSCs (**Figura 29**), este tratamiento sólo indujo un leve aumento en la expresión de *Myb*.

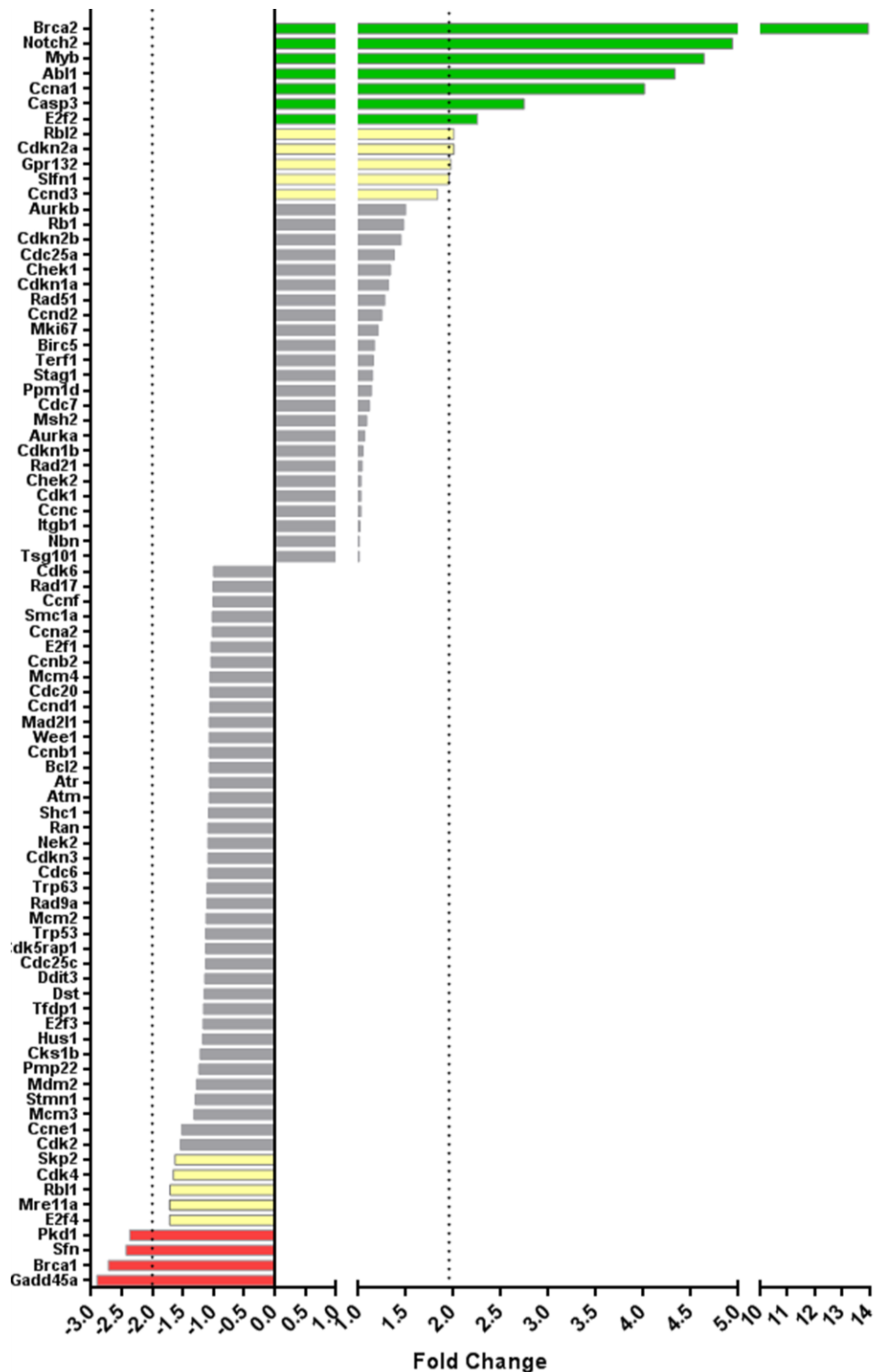
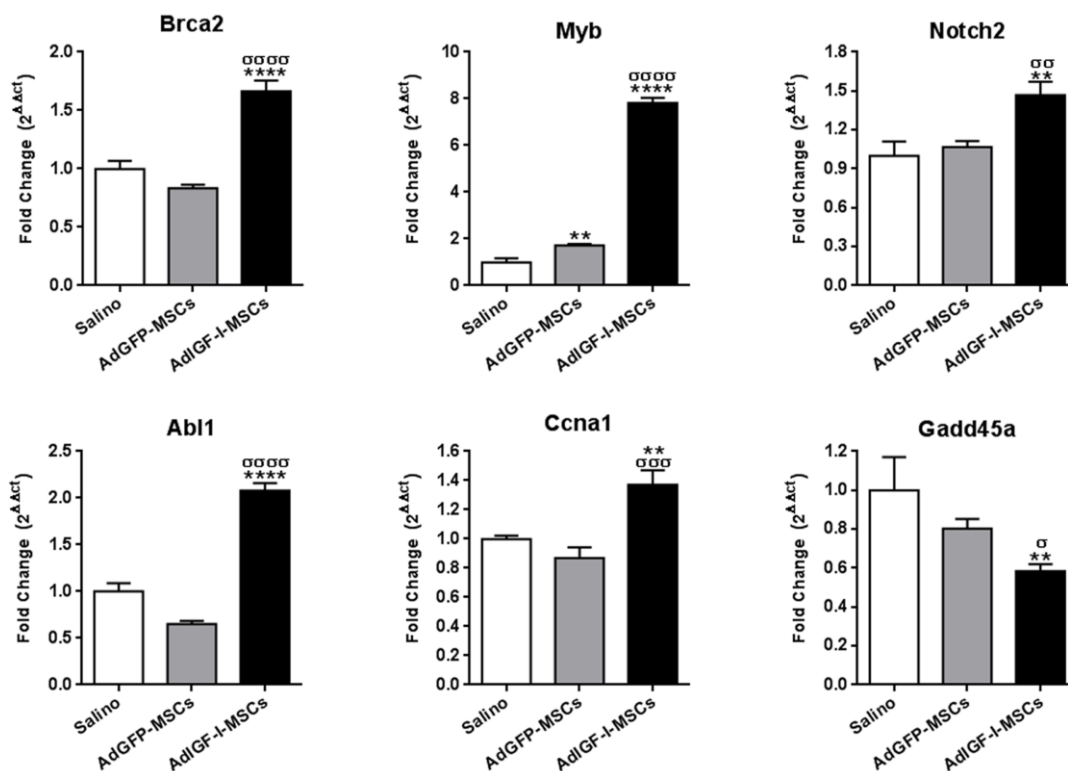


Figura 37: Regulación de genes implicados en la división celular inducida por el tratamiento con AdIGF-I-MSCs. Gráfico de barras donde se muestra las variaciones en la expresión de genes involucrados en vías de protección, reparación y proliferación celular controlada en respuesta al daño del ADN. Se analizó mediante un arreglo de PCR en muestras de hígado de ratones que recibieron solución salina (control) o AdIGF-I-MSCs. La línea punteada representa el punto de corte a partir del cual se consideró expresión diferencial de los genes. Genes inducidos se muestran en verde y genes reprimidos en rojo.



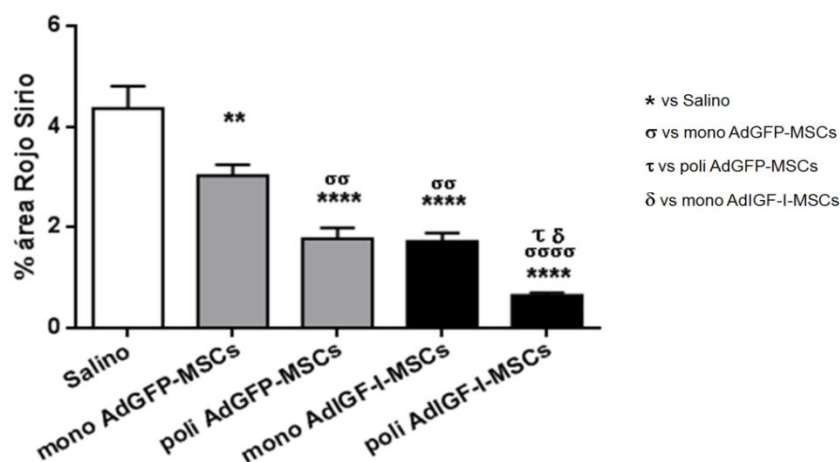
**Figura 38: Confirmación de genes expresados diferencialmente en el arreglo de PCR inducido por la administración de las AdIGF-I-MSCs.** Análisis de los niveles de ARNm en muestras individuales de hígado de ratones tratados con solución salina, AdGFP-MSCs o AdIGF-I-MSCs tomadas al día posterior del tratamiento. \*°p<0.05; \*\*°°p<0.01; \*\*\*°°°p<0.001; \*\*\*\*°°°°p<0.0001 \*vs. Salino; °vs. AdGFP-MSCs.

Estos resultados sugieren que la aplicación de AdIGF-I-MSCs en el modelo de fibrosis hepática inducida por aplicación crónica de TAA induciría rápidamente mecanismos de protección y reparación del daño del ADN, al mismo tiempo que regularía genes implicados en el control del ciclo celular, lo que facilitaría la regeneración hepática.

### 3.19 Efecto terapéutico de la aplicación de múltiples dosis MSCs

Finalmente, con el objetivo de una potencial aplicación clínica futura de esta estrategia experimental y teniendo en cuenta que la utilización de MSCs como vehículo de terapia génica, mediante la infección con adenovirus, no indujo cambios en sus propiedades inmunológicas y que la aplicación de dosis repetidas de estas células no indujo inmunogenicidad en estas células, se evaluó el efecto terapéutico sobre la

fibrosis hepática de la administración de múltiples dosis de AdIGF-I-MSCs y AdGFP-MSCs. Para esto, al diseño experimental ya descrito (**Figura 12**) se le sumaron dos nuevos grupos experimentales en los que los ratones recibieron 3 dosis de  $5 \times 10^5$  AdGFP-MSCs o AdIGF-I-MSCs en la semana 6, 8 y 10 de inducción de fibrosis y a la semana 12 se sacrificaron los animales para tomar muestras y analizar por tinción y morfometría de Rojo Sirio. Para el espaciado de las dosis se tuvo en cuenta la cinética de los cambios en la expresión de los genes analizados y de proliferación de hepatocitos. Como se puede observar en la **Figura 39**, todas las condiciones en que se aplicaron MSCs resultaron en una disminución en el grado de fibrosis respecto al grupo control sin tratamiento. De forma similar, se observó una reducción en la acumulación de colágeno en los animales que recibieron dosis múltiples de AdGFP-MSCs en comparación con aquellos tratados con una sola dosis del mismo tratamiento. Asimismo, se obtuvo una disminución significativamente mayor cuando los ratones recibieron múltiples dosis de las AdGFP-I-MSCs en comparación con una única dosis de las mismas células.



**Figura 39. Efecto terapéutico de múltiples dosis de AdIGF-I-MSCs.** Cuantificación realizada por morfometría a partir de cortes de muestras de hígado teñidas con Rojo Sirio, provenientes de ratones tratados con solución salina (vehículo), AdGFP-MSCs (1 y 3 dosis) y AdIGF-I-MSCs (1 y 3 dosis). A semana 12 se evaluó el efecto terapéutico en todos los grupos. \*σ τ δ  $p < 0.05$ , \*\*σσ  $p < 0.01$ , \*\*\*σσσ  $p < 0.001$ , \*\*\*\*σσσσ  $p < 0.0001$

## ***Discusión***

---

## 4 Discusión

En este trabajo de tesis se demostró que la aplicación sistémica de células madres/estromales mesenquimales derivadas de médula ósea de ratón modificadas genéticamente para sobreexpresar IGF-I (AdIGF-I-MSCs) resultó en la reducción de la fibrosis hepática avanzada. Además, se observó que la administración bajo condiciones experimentales similares, de tres dosis repetidas de AdIGF-I-MSCs, con lapsos entre las aplicaciones celulares de 2 semanas, tuvo un efecto significativo superior en comparación con una sola dosis. Además, se comprobó que la inoculación sistémica de múltiples dosis de MSCs transducidas o no con adenovirus en ratones inmunocompetentes no indujo una respuesta inmunitaria contra las células o antígenos virales. Estos datos demuestran el potencial que presentan las MSCs como herramienta terapéutica para el tratamiento de la fibrosis hepática establecida, ya que la aplicación de múltiples dosis de estas células sobreexpresando IGF-I permitiría reducir y/o revertir el daño que se produce durante esta patología, según el grado de evolución de la misma.

Actualmente, el uso de las MSCs como herramienta terapéutica está en continuo estudio. Las MSCs tienen algunas características particulares que despierta un gran interés por la comunidad médica/científica para su utilización en distintas estrategias terapéuticas. Por un lado, las MSCs tienen la capacidad de migrar selectivamente a sitios de lesión e injuria, atraídas por diversos estímulos (Aquino et al., 2010). Particularmente, se ha visto en pacientes con cirrosis hepática que células con capacidad de generar cultivos *in vitro* de MSCs pueden mobilizarse por el torrente sanguíneo desde la médula ósea hacia el hígado en mayor frecuencia que en pacientes sanos (Lorenzini et al., 2008). Además, en estudios realizados por nuestro grupo de investigación, se observó que las MSCs al ser administradas por vía

sistémica a ratones con fibrosis hepática establecida por TAA, son reclutadas en mayor número al hígado fibrótico en relación con animales sanos (Garcia et al., 2011). Si bien no están totalmente demostrados los mecanismos por los que las MSCs migran al hígado con fibrosis, durante el proceso fibrogénico se liberan un gran número de citoquinas que pueden atraerlas, como VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ 1, MCP-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6, SDF-1 (Bayo et al., 2014). Asimismo, dado que la fibrosis se genera por ciclos repetidos de lesión-inflamación-cicatrización, la capacidad inmunomoduladora de las MSCs es otra característica de gran interés que permitiría atenuar y modular el proceso inflamatorio de esta patología. Luego del daño hepático, diversos estímulos activan a las CEHs y a las células de Kupffer, las que a su vez producen factores quimiotácticos que atraen células de la respuesta inmune innata y adaptativa. Al reclutarse, estas células contribuyen con diversos estímulos fibrogénicos que perpetúan la activación de las CEHs y, en consecuencia, promueven la fibrogénesis. Por otro lado, las MSCs producen factores de crecimiento que contribuyen a la regeneración de los tejidos dañados. Estas propiedades, en adición con la posibilidad de manipularlas en condiciones *in vitro*, ha llevado a su utilización en estudios pre-clínicos y clínicos de injuria hepática aguda y crónica (cirrosis) (Ren et al., 2012). De este modo, se ha comprobado en modelos experimentales que las MSCs disminuyen la fibrosis hepática, a través de una reducción en los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 y colágeno y de una menor activación de CEHs (Fiore et al., 2015). Asimismo, la utilización de MSCs en estudios clínicos en pacientes reveló mejoras relativas en la funcionalidad hepática y estado inflamatorio (Berardis et al., 2015).

Por las características descriptas, resulta promisorio la posibilidad de utilizar MSCs como vehículo de genes terapéuticos para el tratamiento de la cirrosis hepática. Desde los inicios de la terapia génica, los grandes desafíos de los investigadores han sido lograr mejorar la baja eficiencia de transducción así como disminuir los efectos



tóxicos debido a la baja selectividad por los tejidos blanco. Con el desarrollo de los vectores virales se han logrado mantener la expresión de los genes de interés por tiempos más prolongados y dirigir la expresión utilizando promotores específicos logrando una notable disminución en los posibles efectos secundarios por toxicidad. (Hareendran et al., 2013). Sin embargo, nuevos problemas surgieron debido a la inducción de inmunidad antiviral para algunos vectores virales (revisado por (Thomas et al., 2003)), ya que la aplicación de dosis repetidas del virus genera un respuesta por parte de la memoria inmunológica, limitando la eficiencia de la expresión del gen de interés. En este contexto, se han reportado resultados positivos del uso de MSCs como vehículo genes en modelos experimentales de fibrosis hepática (Ishikawa et al., 2012; Lan et al., 2008; Seo et al., 2014; Sun et al., 2008). Como punto de partida de este trabajo de tesis, se puso a punto un protocolo de aislamiento de MSCs y las mismas fueron caracterizadas según los requisitos mínimos establecidos por la ISCT (Dominici et al., 2006). Se comprobó su adhesividad al plástico, su perfil fenotípico de MSCs murinas (Sca-1+, CD105+, CD11b-, CD45-) y su capacidad de diferenciación en adipoblastos, condroblastos y osteoblastos. Posteriormente, se establecieron las condiciones óptimas de infección de las MSCs para la aplicación en nuestro modelo experimental. A partir de estos resultados, se pudo contar con MSCs que tenían la capacidad de producir altos niveles de IGF-I, según se comprobó en cultivos primarios. Esta producción fue específica y tuvo un pico a los 8 días posteriores a la infección, decreciendo la misma gradualmente a partir de entonces. Este comportamiento es el esperable ya que el tipo de vector utilizado (adenoviral) no integra su material genético en el genoma y, por lo tanto, los niveles de expresión del trasgen se reducen progresivamente con las sucesivas divisiones celulares. Asimismo, se pudo constatar que la infección con el AdIGF-I indujo la expresión de IGF-I y de HGF en las MSCs. Es importante destacar este resultado, ya que otros autores han comprobado a través de distintas estrategias que HGF tiene efecto anti-fibrótico (Ueki et al., 1999; Xue et al.,

2003). Más aún, aparte de los resultados que incluye este trabajo de tesis, en los otros dos únicos artículos originales en los que se reportó empleo de MSCs como vehículo de genes terapéuticos en la fibrosis hepática establecida se ha expresado exógenamente en las mismas HGF.

En la caracterización de genes cuya expresión pudiera estar afectada por la modificación genética de las MSCs pudimos también analizar la actividad de TWEAK. De esta manera, pudimos constatar por primera vez que este gen se expresa en las MSCs, aunque su actividad no se modifica significativamente luego de las infecciones. Este es un dato relevante ya que ha sido reportado que TWEAK tiene un efecto inductor de la proliferación de células progenitoras hepáticas (Jakubowski et al., 2005). Cabría, entonces, la posibilidad de que la aplicación de MSCs contribuyera también a regeneración del tejido hepático mediante activación de células ovas o progenitoras hepáticas, en condiciones tales como en casos de hepatectomía severa.

Por otro lado, considerando que para sobre-expresar IGF-I en este estudio se utilizó un adenovirus (Treacy et al., 2012), procedimos a analizar la posibilidad de que la infección modificara las propiedades inmunológicas de las MSCs. Se encontró que la infección con el AdIGF-I no modificó el perfil fenotípico de las MSCs en relación con marcadores moleculares relevantes, y principalmente, que no indujo una mayor expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (HLA-II) ni de moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86). Consistentemente, su co-cultivo con esplenocitos alogénicos, provenientes de ratones C57/Bl6J, no indujo reactividad de los mismos. Asimismo, la aplicación por vía sistémica de múltiples dosis de MSCs infectadas con adenovirus en ratones inmunocompetentes no indujo la producción de anticuerpos neutralizantes contra el adenovirus. Estos datos concuerdan con los resultados publicados por Treacy y col. (Treacy et al., 2012). En dicho estudio, los autores demuestran que la infección con adenovirus no estimuló la expresión de

moléculas HLA-I, HLA-II, CD80 y CD86, ni causó cambios significativos en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas, receptores de quimiocinas y TLRs. En consistencia con esos resultados, tampoco se vio afectada la capacidad de las MSCs de suprimir *in vitro* la proliferación de linfocitos T e *in vivo* ni se modificó la frecuencia en sangre y tejidos de diferentes células del sistema inmunológico (Treacy et al., 2012). Esta propiedad de las MSCs de no modificar sus propiedades inmunológicas al ser transducidas por virus es otra característica ventajosa de este tipo de células con vistas a su potencial empleo como vehículo de genes terapéuticos.

La combinación de terapia celular con MSCs y terapia génica, que consiste en sobre-expresar exógenamente genes específicos antifibróticos a través de la transducción/transfección de estas células, permitiría aprovechar la capacidad de las MSCs para ser reclutadas en el tejido dañado y de contribuir en la reparación tisular mediada por los factores que ellas producen y mejorar su eficiencia terapéutica. Por ejemplo, se han utilizado MSCs para sobre-expresar HGF mediante un plásmido, observándose un efecto superior al de las MSCs sin transfectar, pero logran mantener la expresión por un corto lapso de tiempo (Ishikawa et al., 2012). Una mayor reducción en el grado de desarrollo de la fibrosis hepática y mejora de la funcionalidad del hígado fueron reportadas tras la aplicación de transducidas con un adenovirus codificante para HGF en el modelo de CCl4 (Seo et al., 2014); no obstante, dicho resultado fue obtenido luego de la aplicación de cuatro dosis celulares sucesivas y no se demuestran mecanismos posibles para este efecto terapéutico. Asimismo, otras estrategias similares fueron publicadas utilizando MSCs diferenciadas a células progenitoras hepáticas transducidas con adenovirus codificantes para uroquinasa (Sun et al., 2008) e IL-10 (Lan et al., 2008). En ambos casos el efecto de las MSCs modificadas genéticamente fue superior al de las células sin infectar, resultando en la reducción de los depósitos de colágeno y la expresión de factores pro-fibrogénicos

(TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA, colágeno I y III) y la estimulación de la regeneración hepática. Si bien el uso de las MSCs como vehículo de genes terapéuticos ha sido evaluado en diversas patologías, en fibrosis hepática solo se han reportado estos estudios. En este contexto, con el fin de encontrar nuevas herramientas terapéuticas, el presente trabajo de tesis se evaluó el efecto terapéutico de las MSCs modificadas genéticamente para sobre-expresar IGF-I (AdIGF-I-MSCs) en un modelo de fibrosis hepática establecido por aplicación crónica de TAA. En nuestro caso, la aplicación intravenosa de una dosis de  $5 \times 10^5$  AdIGF-I-MSCs en ratones con fibrosis establecida resultó en una mayor reducción de los depósitos de colágeno respecto a la administración a las MSCs infectadas con el adenovirus control (AdGFP-MSCs) luego de dos semanas de dicho tratamiento.

Uno de los mecanismos que explican parcialmente estos resultados luego del tratamiento con una dosis de las MSCs es la reducción en la activación de las CEHs, la que pudo ser constatada por la inhibición en la expresión de  $\alpha$ -SMA. Los animales que recibieron las AdGFP-MSCs mostraron una reducción en los niveles de  $\alpha$ -SMA en el tejido hepático en comparación con los tratados con vehículo. Un resultado similar fue obtenido en ensayos *in vitro* sobre una línea celular de CEHs tratadas con el sobrenadante de cultivo de las AdGFP-MSCs. Interesantemente, estos resultados se vieron significativamente aumentados cuando fueron utilizadas las AdIGF-I-MSCs o su sobrenadante, en los mismos experimentos. Estos datos son consistentes con los cambios encontrados en los patrones de expresión de TGF- $\beta$ 1, molécula clave involucrada en la activación de las CEHs y en el procesos fibrogénico (Friedman, 2008), y COL1A2. La incubación de células CFSC-2G en el sobrenadante de las AdIGF-I-MSCs redujo sus niveles de expresión del ARNm de TGF- $\beta$ 1 luego de 18 horas de cultivo, en comparación con los controles; sin embargo, no se vio modificada la expresión de  $\alpha$ -SMA y COL1A2. No obstante ello, cuando las CEHs fueron

---

incubadas durante un tiempo más prolongado con el sobrenadante de las AdIGF-I- MSCs los niveles de expresión de  $\alpha$ -SMA y COL1A2 decrecieron, en comparación con los controles. Estos resultados sugieren una regulación por parte de TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión de  $\alpha$ -SMA y COL1A2. Entre los mecanismos a través de los cuales las MSCs ejercen su efecto sobre las CEHs, se han reportado estudios donde demuestran que este efecto puede ser mediado por factores solubles liberados por las MSCs, como IL-10 y TNF $\alpha$  que reducen la proliferación y producción de colágeno o HGF que induce apoptosis en las CEHs (Parekkadan et al., 2007); o bien por el contacto célula-célula que puede inducir apoptosis por la vía de TLR4/NF- $\kappa$ B (Wang et al., 2012) o inhibir la proliferación posiblemente por medio de Notch1 (Chen et al., 2011). A partir de nuestros resultados, obtenidos principalmente a través de ensayos *in vitro*, podemos confirmar que, al menos parcialmente, el efecto de las MSCs sobre las CEHs estaría mediado por factores solubles presentes liberados por ellas hacia en el entorno fibrótico a las pocas horas de su aplicación. Asimismo, el tratamiento con AdIGF-I- MSCs tuvo un efecto mayor sobre la inhibición de la activación de CEHs lo cual se podría relacionar también con el aumento de la expresión de HGF inducido en las MSCs, en los hepatocitos y en los macrófagos.

Si bien son numerosos los trabajos en los que MSCs fueron utilizadas para tratar la fibrosis hepática experimental, en los mismos se ha intentado explicar los mecanismos involucrados en su efecto terapéutico analizando distintas propiedades a las 2 a 6 semanas de la aplicación de estas células (Berardis et al., 2015). Los mismos incluyen efectos sobre las CEHs y factores producidos por las MSCs que interferirían en el proceso fibrogénico (Berardis et al., 2015). Sin embargo, no se consideró la posibilidad de que varias de estas características puedan tratarse más de efectos del tratamiento que de mecanismos inducidos directamente por las MSCs. En este trabajo, se hizo hincapié en mecanismos tempranos que pudieran tener lugar en el

microambiente del hígado fibrótico luego de la aplicación de las MSCs. Con el objetivo de estudiar detalladamente dichos mecanismos se evaluaron los eventos que se desencadenan durante el 1er y 3er día posteriores a la administración de las células. En consonancia con los resultados de los ensayos *in vitro* sobre las CEHs, los niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1 y  $\alpha$ -SMA disminuyeron luego de tres días del tratamiento con AdIGF-I-MSCs. El hecho de que los niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1 disminuyan en el hígado fibrótico al tercer día posterior al transplante sugiere que este efecto podría ser secundario a eventos más tempranos inducidos por las MSCs.

En trabajos previos se ha reportado la influencia de los factores tróficos IGF-I y HGF sobre la vía de señalización de TGF- $\beta$ 1 (Inagaki et al., 2008; Song et al., 2003) y la fibrosis hepática. Song y colaboradores demostraron que IGF-I inhibe vía PI3K la señalización de Smad3, proteína que modula la transcripción de TGF- $\beta$ 1 y genes inducidos por TGF- $\beta$ 1 como CTGF, también involucrado en la fibrogenesis (Song et al., 2003). En este sentido, Inagaki y colaboradores, demostraron que HGF estimula la interacción entre Smad3 y galectina-7, acelerando la exportación nuclear de este factor y por consecuencia inhibiendo la señalización de TGF- $\beta$ 1 (Inagaki et al., 2008). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se consideró la posibilidad de que hubiera cambios tempranos en la expresión hepática de estos factores lo que resultaría en la inhibición más tardía en la expresión de TGF- $\beta$ 1 y posteriormente en la de  $\alpha$ -SMA y COL1A2. En efecto, al día post-tratamiento con las AdGFP-MSCs se detectó en muestras de tejido hepático un aumento de los niveles del ARNm de IGF-I y HGF en comparación con el grupo control, el cual fue aún superior cuando los animales recibieron las AdIGF-I-MSCs. A la misma sobrevida y en los animales tratados con las AdIGF-I-MSCs se indujo también un aumento en la expresión del ARNm de TWEAK: esto podría estar relacionado con un mayor reclutamiento de MSCs en el hígado y podría ejercer eventualmente un efecto sobre la expansión de las células

progenitoras hepáticas (Thomas et al., 2011). Sin embargo, este mecanismo se debe continuar estudiando en mayor profundidad. Los niveles de expresión de IGF-I y HGF se mantuvieron elevados, en relación con el control, al 3° día posterior a la administración de MSCs en comparación con el grupo tratado con vehículo. , aunque en niveles más bajos que al 1° día post-tratamiento.

Tanto las células parenquimatosas como no parenquimatosas del hígado expresan factores tróficos (Lee et al., 2015b). En este sentido, para evaluar si el aumento en la expresión de IGF-I y HGF en el tejido hepático al 1er y 3er día del tratamiento podría deberse también a la inducción de la expresión de estos factores en los hepatocitos por efecto inductivo de las MSCs, se realizaron estudios *in vitro* sobre cultivos primarios de hepatocitos expuestos al medio condicionado de las AdGFP-MSCs y AdIGF-I-MSCs. Interesantemente, factores liberados por las AdIGF-I-MSCs fueron capaces de inducir la expresión de IGF-I y HGF en los hepatocitos. Este hallazgo explicaría, al menos en parte, el aumento de la expresión de IGF-I endógeno y de HGF observados en el hígado fibrótico luego de administración de las MSCs. En condiciones normales, IGF-I es sintetizada en el hígado en respuesta a la hormona de crecimiento; sin embargo, en el suero y en el hígado de pacientes cirróticos se ha observado una disminución significativa en la expresión de este factor. En trabajos previos se ha reportado el efecto anti-fibrótico y hepatoprotector de IGF-I aplicado ya sea como proteína recombinante o por procedimientos de terapia génica. Sin embargo, se encontraban hasta el momento escasamente dilucidados los mecanismos a través de los cuales la aplicación de IGF-I podría ejercer su efecto. Ya sea directa o indirectamente, se ha encontrado que el aumento de los niveles de IGF-I en el tejido hepático coincide con la regulación de factores involucrados en la hepatoprotección como HGF, HNF4a (*Hepatocyte nuclear 4 alpha*), Egfr (*Epidermal growth factor receptor*), Hnf6 (*Hepatocyte nuclear factor 6*), Prlr (*Prolactin receptor*), o con la

fibrogénesis como TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA, PDGF, CTGF o TIMP1 y 2; entre otros (Bonefeld and Moller, 2011; Vera et al., 2007). Asimismo, la expresión de STAT3a, que actúa como un factor esencial en la protección frente al daño inflamatorio, se encuentra reducida en la fibrosis hepática y sus niveles se normalizan al sobre-expresarse IGF-I en el tejido hepático (Vera et al., 2007). Además, STAT3 es activada aguas abajo de la interacción de HGF con su receptor c-Met (Barrow-McGee and Kermorgant, 2014) y se ha demostrado que puede regular la expresión de IGF-I en células musculares (Frost et al., 2002). Por otro lado, si bien se cuestiona el efecto de IGF-I directamente sobre los hepatocitos ya que estos expresan bajos niveles de IGF-IR, se ha demostrado *in vitro* que IGF-I es importante en la protección de estas células contra la apoptosis (Mair et al., 2011). Considerando la baja expresión del receptor de IGF-I en hepatocitos, se postula que una de las células que produce mayor cantidad de HGF en el hígado son las CEHs (Skrtic et al., 1999). Se reportado que éstas células en condiciones fisiológicas producen HGF y que al activarse durante la fibrogénesis reducen dicha expresión (Maher, 1993). Además, IGF-I puede estimular la producción de HGF en las CEHs, lo que posteriormente media su apoptosis (Mair et al., 2011). Asimismo, otros autores demostraron que la inducción de IGF-I de la expresión de HGF está mediada por la vía de PI3K (Skrtic et al., 1999). En conjunto, estos antecedentes podrían explicar la inducción de IGF-I y HGF en los hepatocitos tratados *in vitro* con el sobrenadante de las AdIGF-I-MSCs. Por otra parte, la estimulación de IGF-I y HGF en el tejido hepático en las primeras horas posteriores al tratamiento con MSCs también podrían explicarse por estos datos. Sin embargo, en el contexto *in vivo* intervienen también otros tipos celulares, además de los hepatocitos, que sobre-expresarían estos factores y cumplirían así una función clave en la resolución de la fibrosis, gracias a efectos autócrinos y parácrinos mediados por los mismos.



Por otro lado, ha sido claramente evidenciado que la fibrogénesis hepática se caracteriza por ser un proceso complejo en el que intervienen diferentes componentes celulares y mediadores que promueven el progreso de la patología. Los hepatocitos y colangiocitos que son generalmente los blancos del daño hepatocelular. Las CEHs son las principales efectoras de la fibrogenesis hepática en modelos hepatotóxicos. Otra población menos considerada en relación con este proceso es la de los macrófagos hepáticos. Ellos están también involucrados tanto en el inicio y perpetuación del estímulo fibrogénico, como en la resolución de la fibrosis hepática al cesar la causa del daño. Los macrófagos hepáticos son una población mixta constituida por células de Kupffer (macrófagos residentes, reclutados en el hígado durante el desarrollo embrionario) y monocitos/macrófagos infiltrantes. En los últimos años se avanzó notablemente en el concepto de la reversión de la fibrosis hepática, que por muchos años fue considerada como un proceso irreversible. Desde entonces, se ha demostrado el papel fundamental de los macrófagos como mediadores del proceso resolutivo de la fibrosis. Ante la injuria hepática y consecuente apoptosis/necrosis de hepatocitos, las células de Kupffer se activan, producen TGF- $\beta$ 1 y otros mediadores pro-inflamatorios que estimulan las CEHs y atraen a otras células circulantes del sistema inmune. Si bien aún no es claro el origen de los macrófagos restaurativos, se considera que éstos podrían derivar de monocitos/macrófagos reclutados por las señales producidas por las CEHs y células de Kupffer (Ramachandran and Iredale, 2012). Estos macrófagos restaurativos se caracterizan por producir metaloproteasas, que degradan la MEC, y factores de crecimiento y por expresar bajos niveles de citoquinas pro-inflamatorias. Teniendo en cuenta que al día siguiente al de la administración de MSCs se detectó en el tejido hepático un aumento en la expresión de factores pro-regenerativos y la reducción posterior de la expresión de TGF- $\beta$ 1, citoquina que activa también a las células de Kupffer, estudiamos la incidencia de

macrófagos y su perfil de expresión y actividad biológica en el contexto de la resolución de fibrosis hepática mediada por el tratamiento con las MSCs. Notablemente, la incidencia de macrófagos en el tejido hepático aumentó significativamente al día posterior a la administración de estas células. Además, el análisis del fenotipo de macrófagos hepáticos aislados al día siguiente del tratamiento con MSCs permitió concluir que los mismos cambiaron su perfil de expresión génica según el tipo de tratamiento celular realizado. Por un lado, en macrófagos obtenidos de muestras hepáticas de animales tratados con AdIGF-I-MSCs el nivel de expresión de Arginasa-1 aumentó y el de iNOS disminuyó significativamente con respecto a los controles (salino y AdGFP-MSCs): estos cambios sugerirían una menor producción local de NO y por ende una reducción en el estímulo pro-inflamatorio y daño hepatocelular. Consistente con ello, en esos mismos macrófagos se redujeron también los niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1b, IL-12 y TNF- $\alpha$ . Por otro lado, se encontró una menor expresión génica de TGF- $\beta$ 1 en estos macrófagos lo que muy probablemente estaría involucrado en la reducción en la activación de las CEHs. Consistentemente con los resultados *in vivo*, el nivel de expresión de Arginasa-1 aumentó luego del tratamiento con sobrenadante de AdIGF-I-MSCs y el de iNOS disminuyó luego de la incubación con los sobrenadantes de MSCs. Asimismo, la expresión génica de IL-6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 disminuyeron significativamente en los macrófagos tratados con el sobrenadante de las MSCs respecto al control con DMEM, mientras que los niveles de expresión de IL-10 no se modificaron. Además, se pudo confirmar a nivel proteico una disminución de la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  por parte de los macrófagos hepáticos luego de la incubación de los mismos con el sobrenadante de cultivo de las AdIGF-I-MSCs, en comparación con aquellos tratados con el sobrenadante de las AdGFP-MSCs. Asimismo, los niveles de IL-10 en el sobrenadante de los macrófagos pre-tratados con

los medios condicionados de las MSCs fueron superiores a los detectados en el control (DMEM). En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que factores solubles producidos por las MSCs explicarían al menos parcialmente el efecto de modulación de la expresión génica de los macrófagos encontrado *in vivo*. Se han reportado estudios que, en consistencia con nuestros resultados, muestran evidencias *in vitro* de un efecto inmunomodulador de las MSCs sobre macrófagos induciendo el cambio desde un perfil pro-inflamatorio M1 a uno anti-inflamatorio M2. Además, a partir de ensayos de bloqueos o inhibición han podido ser detectados factores que mediarían este efecto, tales como IL-10, prostaglandina E2 (PGE2) e IL-6 (Dayan et al., 2011; Furuhashi et al., 2013; Maggini et al., 2010). Por otro lado, a diferencia de los hepatocitos, los macrófagos expresan niveles elevados del IGF-1R (Higashi et al., 2011). Además, se ha reportado que tanto IGF-I por la vía de PI3K/Akt (Barrett et al., 2015) y HGF por medio de la inducción de IL-10 por la vía de ERK1/2 (Chen et al., 2014), están involucrados en el cambio de fenotipo M1/M2 de los macrófagos. En base a estos antecedentes, podría explicarse al menos parcialmente el efecto inmunomodulador de las MSCs sobre la actividad biológica de los macrófagos hepáticos.

Se ha reportado que los macrófagos involucrados en la resolución de la fibrosis hepática, además de promover la degradación de la MEC, mediante la liberación de metaloproteasas, producirían factores de crecimiento que participarían en la inducción de la regeneración hepática (Pellicoro et al., 2012; Ramachandran et al., 2012; Thomas et al., 2011). De acuerdo con esas evidencias, en nuestros estudios además del efecto sobre la modulación de citoquinas y mediadores de la producción de NO, pudimos comprobar *in vivo* que la aplicación de AdGFP-MSCs resultó en un aumento en los niveles de expresión de IGF-I por parte de los macrófagos y que este efecto fue significativamente mayor luego del tratamiento con AdIGF-I-MSCs. Además, solo este

último tratamiento resultó en la sobre-expresión de HGF por parte de macrófagos en comparación con las otras condiciones control. Asimismo, mediante experimentos *in vitro* pudimos demostrar que estos efectos estarían mediados, al menos parcialmente, por factores solubles producidos por las MSCs. Los resultados anteriores nos permiten entonces concluir que el tratamiento con las MSCs induce un perfil funcional de macrófagos resolutivos, efecto que se ve potenciado al aplicarse el tratamiento con las AdIGF-I-MSCs.

Por otro lado, y como se comentó previamente, el proceso fibrogénico involucra también la comunicación entre las CEHs y los macrófagos hepáticos (Weiskirchen and Tacke, 2014). Interesantemente, la incubación de las CEHs con el sobrenadante de cultivo de los macrófagos hepáticos que fueron pretratados a su vez con el sobrenadante de las MSCs sobre, resultó en una reducción en sus niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA y COL1A2. Estos datos sugieren que los factores secretados por los macrófagos modulados por las MSCs podrían inhibir la activación de las CEHs. Considerando que las MSCs indujeron un cambio en el patrón de expresión de citoquinas y un aumento en los niveles de expresión de IGF-I y HGF en los macrófagos hepáticos, son estos factores los que podrían estar mediando también este último efecto.

Finalmente, con el objeto de comprobar que el efecto terapéutico de la aplicación de AdIGF-I-MSCs en ratones con fibrosis hepática avanzada podría deberse al menos en parte a la modulación de la actividad biológica se procedió a depletar el hígado de macrófagos previamente a la aplicación de AdIGF-I-MSCs. Esto resultó en un menor efecto terapéutico de ese tratamiento celular. En consistencia con esos resultados, previamente se ha evidenciado una función moduladora de las MSCs sobre macrófagos en diversas patologías y la importancia de dicha función en su efecto terapéutico; sin embargo, esto no había sido aún demostrado en el contexto de

la fibrosis hepática ni se realizó empleando MSCs genéticamente modificadas. Por ejemplo, en un modelo experimental de infarto agudo de miocardio se ha reportado que las MSCs modulan la actividad biológica de los macrófagos que infiltran el tejido, induciendo un perfil M2 (Dayan et al., 2011). Asimismo, se ha descrito una capacidad inmunomoduladora por parte de las MSCs sobre los macrófagos residentes en modelos de asma alérgica y de autoinmunidad renal (Furuhashi et al., 2013; Mathias et al., 2013). Recientemente, Lee KC y colaboradores (Lee et al., 2015a) utilizando un modelo de daño hepático agudo inducido por Concanavalina A mostraron evidencias de que las MSCs protegerían a los hepatocitos de una muerte celular programada al menos en parte por su capacidad inmunomoduladora sobre los macrófagos. Los autores, aunque reportan haber observado que las MSCs permanecerían atrapadas en los pulmones, muestran que las MSCs fueron capaces de inducir en los macrófagos alveolares un perfil M2, con producción de altos niveles IL-10 y un efecto hepatoprotector. En conjunto, estos datos nos permite concluir que los macrófagos hepáticos cumplen un papel importante en el efecto terapéutico de las AdIGF-I-MSCs; y dicho efecto estaría mediado, al menos parcialmente, por la modulación de la actividad biológica de los macrófagos hepáticos hacia un perfil de tipo “restaurativo” y antifibrótico con función en la resolución de la fibrosis.

En distintos trabajos, otros autores han demostrado que IGF-I y HGF están involucrados tanto en la supervivencia y proliferación de hepatocitos (Burr et al., 1998; Koch et al., 1982), como en la regeneración hepática (Conchillo et al., 2007; Sobrevals et al., 2010; Ueki et al., 1999; Xue et al., 2003). Considerando que desde las primeras horas posteriores al tratamiento los niveles de IGF-I y HGF en el tejido hepático se encuentran elevados, ya sea por el aporte que puedan estar haciendo las AdIGF-I-MSCs, los hepatocitos o los macrófagos hepáticos “restaurativos”; otro mecanismo posible que explica el efecto terapéutico de las MSCs sería la inducción de la

proliferación de células hepáticas o regeneración hepática. El “antígeno nuclear de células en proliferación” (PCNA) es una proteína nuclear que actúa como cofactor de la ADN polimerasa durante la división celular y es ampliamente utilizado como marcador de proliferación. En nuestros estudios de cambios tempranos en el perfil de expresión de marcadores moleculares relevantes en el tejido hepático pudimos constatar un aumento significativo en los niveles de expresión del ARNm de PCNA luego de 1 y 3 días del tratamiento con las AdIGF-I-MSCs, en comparación con los controles. Al analizar la expresión proteica de PCNA por inmunodetección en las diferentes sobrevividas, se observó un aumento en la expresión de PCNA en el grupo tratado con AdIGF-I-MSCs con respecto a las otras dos condiciones. Además, mientras el pico de expresión de PCNA en el tratamiento con AdIGF-I-MSCs tuvo lugar al día de su aplicación, en el caso de los animales tratados con AdGFP-MSCs dicha expresión aumentó gradualmente llegando a ser significativa, con respecto al grupo salino al día 14 post-tratamiento. Este efecto pro-regenerativo de las MSCs ha sido demostrado en diferentes modelos de daño hepático agudo y crónico (Eom et al., 2015; Kaibori et al., 2012; Volarevic et al., 2014). Mientras que la regeneración hepática ante un daño crónico suele producirse a partir de la proliferación de hepatocitos que entran en división celular, luego de un daño agudo importante, por ejemplo por inducción con un hepatotóxico o por ablación parcial del hígado, suele también estimularse la proliferación y diferenciación de las células progenitoras hepáticas (Takase et al., 2013) (Esrefoglu, 2013). Consistentemente, en nuestro caso la evidencia sugiere que el efecto pro-regenerativo de las AdIGF-I-MSCs tendría lugar fundamentalmente a través de la división celular de hepatocitos.

En conjunto, los estudios de la presente tesis nos permitieron dilucidar algunos de los mecanismos involucrados en la mejora terapéutica producida por la aplicación de AdIGF-I-MSCs sobre la fibrosis hepática establecida. Entre ellos, se encontraron

evidencias de que las MSCs, y factores producidos por ellas, modularían la actividad biológica de macrófagos, adoptando éstos un perfil restaurativo y del tipo pro-regenerativo. Asimismo, se demostró que factores solubles producidos por las MSCs y los macrófagos modulados por las MSCs redujeron la activación de las CEHs. Asimismo, nuestros estudios *in vivo* e *in vitro* nos permitieron demostrar que el tratamiento con las MSCs induce la producción de IGF-I, HGF y TWEAK en el tejido hepático a partir de las primeras horas posteriores a la administración celular y que ello se acompaña con una inducción de la regeneración hepática. Con el objetivo de analizar posibles mecanismos involucrados en la proliferación de hepatocitos que pudieran tener lugar al día siguiente al del tratamiento con las MSCs, se analizaron cambios en la expresión del ARNm de diversos marcadores moleculares característicos de la división celular. De esta forma, se pudo constatar que las AdIGF-I-MSCs indujeron la expresión de Brca2, Myb, Abl1 y Gpr132, relacionados con el control de calidad de la síntesis y reparación del ADN (Davies et al., 2001; Patel et al., 1998; Shaul and Ben-Yehoyada, 2005; Weng et al., 1998; Werwein et al., 2012). También, ese mismo tratamiento indujo la expresión de genes implicados en la regulación del progreso del ciclo celular como Ccna1, E2f2, Rbl2 además de Gpr132 (Delgado et al., 2011; Garriga et al., 1998; Huynh, 2004). Por el contrario, la aplicación de AdIGF-I-MSCs resultó en una reducción en los niveles de ARNm del gen Gadd45 $\alpha$ , relacionado con estrés celular, daño del ADN y arresto de la división celular (Gramantieri et al., 2005; Shan et al., 2012). Aparte de las funciones descritas, es importante destacar que algunos de estos genes, como Myb, Cdkn2a y Rbl2, actúan como supresores tumorales (Harashima et al., 2013). Por otro lado, la administración de las AdIGF-I-MSCs indujo la sobre-expresión de Notch2, involucrado en la proliferación celular de hepatoblastos (Morell and Strazzabosco, 2014; Ortica et al., 2014). Al validar la modulación de esos genes, mediante qPCR, incluyendo también

mediciones de muestras hepáticas obtenidas de ratones tratados con AdGFP-MSCs, se pudo confirmar que sólo la administración de AdIGF-I-MSCs, y no de AdGFP-MSCs, indujo un incremento en la expresión de *Brca2*, *Myb*, *Notch2* y *Ccna1*, y una reducción en la expresión de *Gadd45 $\alpha$* . Estos resultados son consistentes con los de los estudios *in vivo* que no muestran cambios significativos en la proliferación de hepatocitos al día de administración de AdGFP-MSCs. Sólo se encontró un leve aumento en la expresión de *Myb*, en dicho grupo experimental. Por lo anterior podemos concluir que el tratamiento con las AdIGF-I-MSCs en un modelo de fibrosis hepática basado en la aplicación crónica de TAA induciría rápidamente mecanismos de protección y reparación del daño del ADN, al mismo tiempo que regularía genes implicados en el control del ciclo celular, lo que promovería la regeneración hepática.

Otro hallazgo de este trabajo de tesis es el de la localización y análisis de la biodistribución de las MSCs en el hígado luego de su aplicación sistémica. Solamente gracias a que se logró comprobar la presencia de un número significativo de células en el parénquima hepático, en cercanía con los espacios porta y los de Disse, es que es posible postular un efecto terapéutico basado en un efecto parácrino y, tal vez, de contacto célula-a-célula. Sin embargo, existen evidencias en algunos trabajos que sugieren que dicho efecto podría ser mediado por la diferenciación de MSCs a hepatocitos, los que no son aún concluyentes (Fiore et al., 2015). Además, en estudios *in vitro* se ha demostrado que la diferenciación a hepatocitos en este tipo celular sería sólo parcial (Fiore et al., 2015). Estos antecedentes y nuestros resultados refuerzan la teoría de que el efecto terapéutico de las MSCs sería mediado principalmente por factores secretados por ellas. En nuestros estudios, la evidencia sugiere que el reclutamiento de MSCs al hígado con fibrosis establecida sería máximo al día de su aplicación sistémica y que luego el número de células en este tejido decrece



gradualmente. Este resultado es consistente con el descubrimiento de los mecanismos tempranos que mediarían el efecto terapéutico de las AdIGF-I-MSCs.

Finalmente, con vistas a una potencial aplicación clínica de esta estrategia experimental y teniendo en cuenta que la utilización de MSCs como vehículo de terapia génica, mediante la infección con adenovirus, no induciría cambios en sus propiedades inmunológicas y que la aplicación de dosis repetidas de estas células no resultaría en una respuesta inmune de rechazo, evaluamos el efecto terapéutico sobre la fibrosis hepática de la administración de múltiples dosis de AdIGF-I-MSCs y AdGFP-MSCs. Notablemente, la administración de tres dosis repetidas de AdIGF-I-MSCs, separadas por 2 semanas entre sí, tuvo un efecto superior en comparación con el de una sola dosis. En conjunto, estos datos sugieren que las MSCs podrían ser empleadas como herramienta terapéutica para el tratamiento de la fibrosis hepática establecida, ya que la aplicación de múltiples dosis de estas células sobreexpresando IGF-I podría permitir reducir y revertir el daño que se produce durante la patología.

En la actualidad no existen tratamientos aprobados para la cirrosis hepática y la única alternativa posible es el trasplante hepático, para lo cual la escasez de donantes y la complejidad de la cirugía son limitantes. En este contexto, en los últimos años con el mayor conocimiento de la fisiopatología, se están analizando diversas terapias. Gran parte de ellas se basan en drogas que bloquean receptores en las CEHs para reducir su activación, o bien en inhibidores de la señalización de vías profibrogénicas fundamentales como TGF- $\beta$ 1 o CTGF. Asimismo, otras alternativas se basan en promover la resolución de la fibrosis; por ejemplo, induciendo la apoptosis de CEHs a través de drogas o por la actividad de células NK, aumentando la degradación de la MEC por macrófagos fibrolíticos o inhibiendo la actividad de las TIMPs (Lee et al., 2015b).

Considerando la complejidad del proceso fibrogénico, en el que intervienen las células parenquimatosas, CEHs, macrófagos, infiltrado inflamatorio y diversas citoquinas y factores pro-fibrogénico, la utilización de las AdIGF-I-MSCs para el tratamiento de la fibrosis hepática puede ser una herramienta terapéutica muy valiosa ya que tienen la capacidad de actuar a diversos niveles por lo que pueden intervenir en los diversos mecanismos que se desencadenan en esta patología. Ellos son: una reducción en el grado de activación de las CEHs, una modulación en la actividad biológica de los macrófagos hepáticos con generación de un perfil restaurativo en los mismos, una inducción de la proliferación de hepatocitos y una protección de los mismos frente al daño celular. De este modo, pensar en una terapia génica y celular combinadas utilizando las MSCs como vehículo de genes terapéuticos puede significar una alternativa posible si se continúa con el estudio de sus mecanismos y se realizan las adaptaciones requeridas para realizar ensayos clínicos siguiendo normas de buenas prácticas de producción (GMP). En este sentido, mientras se realizó este trabajo de tesis, pudimos poner a punto y evaluar, también en el modelo de fibrosis hepática inducida por TAA aunque en ratones atímicos, el efecto terapéutico MSCs humanas provenientes de médula ósea (hMSCs) o de cordón umbilical (células perivasculares de cordón umbilical humano; HUCPVCs) sobre-expresando IGF-I. Consistentemente con los resultados de las células de origen murino, observamos que ambos tipos celulares redujeron significativamente el grado de fibrosis hepática, en comparación con los grupos control (AdGFP-hMSCs, AdGFP-HUCPVCs y salino). Además, no encontramos diferencias entre los dos tipos celulares, por lo que las células provenientes de cordón umbilical pueden considerarse como una alternativa viable como herramienta terapéutica.

En resumen, en este trabajo de tesis han podido ser demostrados una serie de eventos moleculares dentro del hígado fibrótico que se disparan poco tiempo después

de la aplicación de las MSCs y resultan en el aumento de la expresión de IGF-I y HGF en el tejido hepático, una reducción de la activación de las CEHs, la modulación de la actividad de los macrófagos hepáticos y la estimulación de la proliferación hepatocelular, y por consiguiente en la reducción de la fibrosis hepática. Asimismo, se comprobó que todos estos efectos terapéuticos son mejorados cuando se emplean AdIGF-I-MSCs en lugar de AdGFP-MSCs. Finalmente, estos resultados indican que una combinación de terapia celular y génica y la aplicación de dosis múltiples de las MSCs genéticamente modificadas para sobreexpresar IGF-I podrían representar una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de la cirrosis hepática.

## ***Conclusiones***

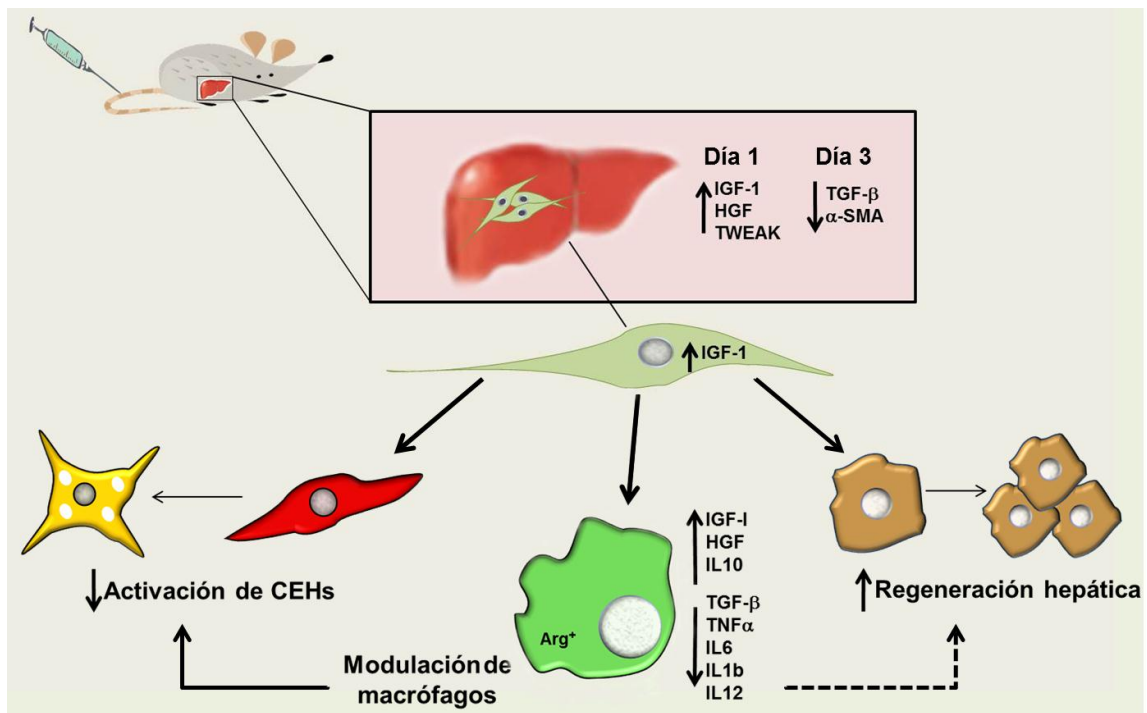
---

## 5 Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis podemos concluir:

- Se logró aislar y cultivar eficientemente células estromales mesenquimales de médula ósea de ratones BALB/c (MSCs) y se comprobaron los criterios de caracterización estipulados por la *International Society for Cellular Therapy*.
- Se consiguió transducir cultivos de MSCs con AdGFP y AdIGF-I, con una significativa expresión de los transgenes. Se comprobó que las AdIGF-I-MSCs expresan altos niveles de IGF-I en el sobrenadante de cultivo siendo máxima la producción a los 8 días posteriores a la infección.
- Se comprobó que la infección con los adenovirus no modificó las propiedades inmunológicas de las MSCs.
- Se demostró que la aplicación sistémica de células estromales mesenquimales derivadas de médula ósea modificadas genéticamente para sobreexpresar IGF-I (AdIGF-I-MSCs) resultó en la reducción de la fibrosis hepática avanzada y en una menor activación de las células estrelladas hepáticas (CEHs). Además, este efecto terapéutico fue superior al de las AdGFP-MSCs.
- Se confirmó el efecto terapéutico de las AdIGF-I-MSCs en el modelo de fibrosis hepática por ligadura del conducto colédoco.
- Se demostró que las MSCs tienen un pico de reclutamiento en el hígado fibrótico al día siguiente al de su administración y posteriormente su incidencia en ese tejido se reduce gradualmente.

- Se descubrieron algunos de los mecanismos por los que las AdIGF-I-MSCs ejercerían su efecto terapéutico en el contexto de la fibrosis hepática (**Figura 40**), que serían los siguientes:
  - Al día de haber aplicado las MSCs aumentan los niveles de IGF-I y HGF en el hígado. Estos factores pueden inducir la regeneración hepática, a partir de la estimulación de la proliferación celular y de la protección hepatocitaria frente al daño del ADN, e inhibir la activación de las CEHs.
  - Al tercer día posterior al tratamiento con MSCs se encontró una disminución de TGF- $\beta$ 1 y  $\alpha$ -SMA en el tejido hepático, lo que indicaría una menor activación de las CEHs a partir de dicho tiempo.
  - Se encontró una modulación temprana (al día de aplicación de las MSCs) del perfil de expresión y actividad biológica de los macrófagos hepáticos, cuya incidencia aumenta con los tratamientos con MSCs para la misma sobredosis, con la inducción en los mismos de un perfil restaurador.
  - Los macrófagos modulados por las MSCs tienen también la capacidad de reducir el grado de activación de las CEHs.
- Las AdIGF-I-MSCs ejercerían su efecto sobre las CEHs y sobre los hepatocitos y macrófagos hepáticos, al menos en parte, mediante la liberación de factores solubles.
- La aplicación de múltiples dosis de AdIGF-I-MSCs resulta en un efecto superior al obtenido por la aplicación de una sola dosis.



**Figura 40: Modelo propuesto de los mecanismos del efecto terapéutico de las AdIGF-I-MSCs.** Las MSCs se reclutan en el hígado con un pico de abundancia al primer día después de la administración sistémica. Inducen allí la sobre-expresión de factores pro-regenerativos/anti-fibrogénicos y modulan la actividad de los macrófagos hepáticos. A partir del tercer día de tratamiento se reduce el grado de activación de las CEHs, efecto puede ser secundario a la actividad directa de las MSCs y ser mediado por factores liberados por las MSCs, los hepatocitos y/o por los macrófagos cuyo perfil es modulado por el tratamiento.

En conjunto, estos datos demuestran el potencial que presentan las MSCs como herramienta terapéutica para el tratamiento de la fibrosis hepática establecida, ya que la aplicación de múltiples dosis de estas células sobreexpresando IGF-I podría permitir reducir y/o revertir el daño que se produce durante esta patología.

## ***Bibliografía***

---



## 6 Bibliografía

- Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815-1822.
- Alcolado, R., Arthur, M.J., and Iredale, J.P. (1997). Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci (Lond)* 92, 103-112.
- Ambrose, A.M., De, E.F., and Rather, L.J. (1949). Toxicity of thioacetamide in rats. *J Ind Hyg Toxicol* 31, 158-161.
- Anderson, W.F. (2000). Gene therapy scores against cancer. *Nat Med* 6, 862-863.
- Anthony, P.P., Ishak, K.G., Nayak, N.C., Poulsen, H.E., Scheuer, P.J., and Sobin, L.H. (1978). The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol* 31, 395-414.
- Aquino, J.B., Bolontrade, M.F., Garcia, M.G., Podhajcer, O.L., and Mazzolini, G. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutic tools and gene carriers in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Gene Ther* 17, 692-708.
- Arias, M., Sauer-Lehnen, S., Treptau, J., Janoschek, N., Theuerkauf, I., Buettner, R., Gressner, A.M., and Weiskirchen, R. (2003). Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterol* 3, 29.
- Arthur, M.J., Stanley, A., Iredale, J.P., Rafferty, J.A., Hembry, R.M., and Friedman, S.L. (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), 701-707.
- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., and Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 35, 1482-1490.
- Avital, I., Inderbitzin, D., Aoki, T., Tyan, D.B., Cohen, A.H., Ferrareso, C., Rozga, J., Arnaout, W.S., and Demetriou, A.A. (2001). Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 156-164.
- Bakondi, B., Shimada, I.S., Perry, A., Munoz, J.R., Ylostalo, J., Howard, A.B., Gregory, C.A., and Spees, J.L. (2009). CD133 identifies a human bone marrow stem/progenitor cell sub-population with a repertoire of secreted factors that protect against stroke. *Mol Ther* 17, 1938-1947.
- Balber, A.E. Concise review: aldehyde dehydrogenase bright stem and progenitor cell populations from normal tissues: characteristics, activities, and emerging uses in regenerative medicine. *Stem Cells* 29, 570-575.
- Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Osaki, M., Kawamata, M., Kato, T., Okochi, H., and Ochiya, T. (2008). IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells* 26, 2705-2712.
- Barnes, M.A., McMullen, M.R., Roychowdhury, S., Madhun, N.Z., Niese, K., Olman, M.A., Stavitsky, A.B., Bucala, R., and Nagy, L.E. (2015). Macrophage migration inhibitory factor is required for recruitment of scar-associated macrophages during liver fibrosis. *J Leukoc Biol* 97, 161-169.
- Barrett, J.P., Minogue, A.M., Falvey, A., and Lynch, M.A. (2015). Involvement of IGF-1 and Akt in M1/M2 activation state in bone marrow-derived macrophages. *Exp Cell Res* 335, 258-268.

- Barrow-McGee, R., and Kermorgant, S. (2014). Met endosomal signalling: in the right place, at the right time. *The international journal of biochemistry & cell biology* 49, 69-74.
- Bataller, R., and Brenner, D.A. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115, 209-218.
- Bayo, J., Marrodan, M., Aquino, J.B., Silva, M., Garcia, M.G., and Mazzolini, G. (2014). The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 34, 330-342.
- Beckermann, B.M., Kallifatidis, G., Groth, A., Frommhold, D., Apel, A., Mattern, J., Salnikov, A.V., Moldenhauer, G., Wagner, W., Diehlmann, A., et al. (2008). VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 99, 622-631.
- Bennett, J.H., Joyner, C.J., Triffitt, J.T., and Owen, M.E. (1991). Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 99 ( Pt 1), 131-139.
- Benyon, R.C., and Arthur, M.J. (2001). Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Seminars in liver disease* 21, 373-384.
- Benyon, R.C., Hovell, C.J., Da Gaca, M., Jones, E.H., Iredale, J.P., and Arthur, M.J. (1999). Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology* 30, 977-986.
- Berardis, S., Dwisthi Sattwika, P., Najimi, M., and Sokal, E.M. (2015). Use of mesenchymal stem cells to treat liver fibrosis: current situation and future prospects. *World J Gastroenterol* 21, 742-758.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., and Finberg, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320-1323.
- Bianco, P., Cao, X., Frenette, P.S., Mao, J.J., Robey, P.G., Simmons, P.J., and Wang, C.Y. (2013). The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature medicine* 19, 35-42.
- Bonacchi, A., Romagnani, P., Romanelli, R.G., Efsen, E., Annunziato, F., Lasagni, L., Francalanci, M., Serio, M., Laffi, G., Pinzani, M., et al. (2001). Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem* 276, 9945-9954.
- Bonefeld, K., and Moller, S. (2011). Insulin-like growth factor-I and the liver. *Liver Int* 31, 911-919.
- Bosselut, N., Housset, C., Marcelo, P., Rey, C., Burmester, T., Vinh, J., Vaubourdolle, M., Cadoret, A., and Baudin, B. (2010). Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. *Proteomics* 10, 1017-1028.
- Brigstock, D.R. (2003). The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol* 178, 169-175.
- Briken, V., and Mosser, D.M. (2011). Editorial: switching on arginase in M2 macrophages. *J Leukoc Biol* 90, 839-841.
- Brooke, G., Cook, M., Blair, C., Han, R., Heazlewood, C., Jones, B., Kambouris, M., Kollar, K., McTaggart, S., Pelekanos, R., et al. (2007). Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol* 18, 846-858.
- Broxmeyer, H.E., Srour, E., Orschell, C., Ingram, D.A., Cooper, S., Plett, P.A., Mead, L.E., and Yoder, M.C. (2006). Cord blood stem and progenitor cells. *Methods Enzymol* 419, 439-473.
- Burr, A.W., Toole, K., Chapman, C., Hines, J.E., and Burt, A.D. (1998). Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. *J Pathol* 185, 298-302.

- Canbay, A., Feldstein, A.E., Higuchi, H., Werneburg, N., Grambihler, A., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2003a). Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 38, 1188-1198.
- Canbay, A., Friedman, S., and Gores, G.J. (2004). Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 39, 273-278.
- Canbay, A., Taimr, P., Torok, N., Higuchi, H., Friedman, S., and Gores, G.J. (2003b). Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 83, 655-663.
- Canturk, N.Z., Canturk, Z., Ozden, M., Dalcik, H., Yardimoglu, M., and Tulubas, F. (2003). Protective effect of IGF-1 on experimental liver cirrhosis-induced common bile duct ligation. *Hepato-gastroenterology* 50, 2061-2066.
- Caregaro, L., Alberino, F., Angeli, P., and Gatta, A. (1998). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in liver cirrhosis: a marker of hepatocellular dysfunction? *Journal of hepatology* 29, 342.
- Casini, A., Ceni, E., Salzano, R., Biondi, P., Parola, M., Galli, A., Foschi, M., Caligiuri, A., Pinzani, M., and Surrenti, C. (1997). Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 25, 361-367.
- Castilla-Cortazar, I., Garcia, M., Mugerza, B., Quiroga, J., Perez, R., Santidrian, S., and Prieto, J. (1997). Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Gastroenterology* 113, 1682-1691.
- Castro, G.R., Coelho, J.C., Parolin, M.B., Matias, J.E., and de Freitas, A.C. (2013). Insulin-like growth factor I correlates with MELD and returns to normal level after liver transplantation. *Ann Transplant* 18, 57-62.
- Catalano, O.A., Singh, A.H., Uppot, R.N., Hahn, P.F., Ferrone, C.R., and Sahani, D.V. (2008). Vascular and biliary variants in the liver: implications for liver surgery. *Radiographics* 28, 359-378.
- Cohnheim, J. (1867). Ueber entzündung und eiterung. *Path Anat Physiol Klin Med* 40:, 1-90.
- Conchillo, M., de Knecht, R.J., Payeras, M., Quiroga, J., Sangro, B., Herrero, J.I., Castilla-Cortazar, I., Frystyk, J., Flyvbjerg, A., Yoshizawa, C., et al. (2005). Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: results of a pilot randomized controlled clinical trial. *Journal of hepatology* 43, 630-636.
- Conchillo, M., Prieto, J., and Quiroga, J. (2007). [Insulin-like growth factor I (IGF-I) and liver cirrhosis]. *Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva* 99, 156-164.
- Console, G.M., Herenu, C.B., Camihort, G.A., Luna, G.C., Bracamonte, M.I., Morel, G.R., and Goya, R.G. (2008). Insulin-like growth factor-I gene therapy reverses morphologic changes and reduces hyperprolactinemia in experimental rat prolactinomas. *Molecular cancer* 7, 13.
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V., et al. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107, 367-372.
- Corselli, M., Chin, C.J., Parekh, C., Sahaghian, A., Wang, W., Ge, S., Evseenko, D., Wang, X., Montelatici, E., Lazzari, L., et al. (2013). Perivascular support of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* 121, 2891-2901.
- Chapel, A., Bertho, J.M., Bensidhoum, M., Fouillard, L., Young, R.G., Frick, J., Demarquay, C., Cuvelier, F., Mathieu, E., Trompier, F., et al. (2003). Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med* 5, 1028-1038.

- Chen, P.M., Liu, K.J., Hsu, P.J., Wei, C.F., Bai, C.H., Ho, L.J., Sytwu, H.K., and Yen, B.L. (2014). Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. *J Leukoc Biol* 96, 295-303.
- Chen, S., Xu, L., Lin, N., Pan, W., Hu, K., and Xu, R. (2011). Activation of Notch1 signaling by marrow-derived mesenchymal stem cells through cell-cell contact inhibits proliferation of hepatic stellate cells. *Life Sci* 89, 975-981.
- Chu, A.S., Diaz, R., Hui, J.J., Yanger, K., Zong, Y., Alpini, G., Stanger, B.Z., and Wells, R.G. (2011). Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology* 53, 1685-1695.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119, 2204-2213.
- Daughaday, W.H., and Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine reviews* 10, 68-91.
- Davies, A.A., Masson, J.Y., Mcllwraith, M.J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A.R., and West, S.C. (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* 7, 273-282.
- Dayan, V., Yannarelli, G., Billia, F., Filomeno, P., Wang, X.H., Davies, J.E., and Keating, A. (2011). Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 106, 1299-1310.
- Delgado, I., Fresnedo, O., Iglesias, A., Rueda, Y., Syn, W.K., Zubiaga, A.M., and Ochoa, B. (2011). A role for transcription factor E2F2 in hepatocyte proliferation and timely liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301, G20-31.
- Dias, N., and Stein, C.A. (2002). Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 1, 347-355.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Dorshkind, K. (1990). Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol* 8, 111-137.
- Dranoff, J.A., and Wells, R.G. (2010). Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology* 51, 1438-1444.
- Dunning, S., Ur Rehman, A., Tiebosch, M.H., Hannivoort, R.A., Haijer, F.W., Woudenberg, J., van den Heuvel, F.A., Buist-Homan, M., Faber, K.N., and Moshage, H. (2013). Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. *Biochim Biophys Acta* 1832, 2027-2034.
- El-Serag, H.B., and Rudolph, K.L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132, 2557-2576.
- Elpek, G.O. (2014). Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol* 20, 7260-7276.
- Eom, Y.W., Shim, K.Y., and Baik, S.K. (2015). Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J Intern Med* 30, 580-589.
- Esrefoglu, M. (2013). Role of stem cells in repair of liver injury: experimental and clinical benefit of transferred stem cells on liver failure. *World J Gastroenterol* 19, 6757-6773.

- Fallowfield, J.A., Mizuno, M., Kendall, T.J., Constandinou, C.M., Benyon, R.C., Duffield, J.S., and Iredale, J.P. (2007). Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol* 178, 5288-5295.
- Fernandez, M., Simon, V., Herrera, G., Cao, C., Del Favero, H., and Minguell, J.J. (1997). Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 20, 265-271.
- Fiore, E.J., Mazzolini, G., and Aquino, J.B. (2015). Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Liver Fibrosis: Recent Findings, Old/New Caveats and Future Perspectives. *Stem Cell Rev* 11, 586-597.
- Foey, A.D. (2014). Macrophages — Masters of Immune Activation, Suppression and Deviation.
- Francois, S., Bensidhoum, M., Mouiseddine, M., Mazurier, C., Allenet, B., Semont, A., Frick, J., Sache, A., Bouchet, S., Thierry, D., et al. (2006). Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 24, 1020-1029.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4, 267-274.
- Friedman, S.L. (1993). Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 328, 1828-1835.
- Friedman, S.L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275, 2247-2250.
- Friedman, S.L. (2003). Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 38 Suppl 1, S38-53.
- Friedman, S.L. (2004). Stellate cells: a moving target in hepatic fibrogenesis. *Hepatology* 40, 1041-1043.
- Friedman, S.L. (2008). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134, 1655-1669.
- Frost, R.A., Nystrom, G.J., and Lang, C.H. (2002). Regulation of IGF-I mRNA and signal transducers and activators of transcription-3 and -5 (Stat-3 and -5) by GH in C2C12 myoblasts. *Endocrinology* 143, 492-503.
- Furuhashi, K., Tsuboi, N., Shimizu, A., Katsuno, T., Kim, H., Saka, Y., Ozaki, T., Sado, Y., Imai, E., Matsuo, S., et al. (2013). Serum-starved adipose-derived stromal cells ameliorate crescentic GN by promoting immunoregulatory macrophages. *J Am Soc Nephrol* 24, 587-603.
- Gao, R., and Brigstock, D.R. (2004). Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 279, 8848-8855.
- Garcia-Banuelos, J., Siller-Lopez, F., Miranda, A., Aguilar, L.K., Aguilar-Cordova, E., and Armendariz-Borunda, J. (2002). Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 9, 127-134.
- Garcia-Tsao, G., Friedman, S., Iredale, J., and Pinzani, M. (2010). Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology* 51, 1445-1449.
- Garcia, M.G., Bayo, J., Bolontrade, M.F., Sganga, L., Malvicini, M., Alaniz, L., Aquino, J.B., Fiore, E., Rizzo, M.M., Rodriguez, A., et al. (2011). Hepatocellular carcinoma cells and their fibrotic microenvironment modulate bone marrow-derived mesenchymal stromal cell migration in vitro and in vivo. *Mol Pharm* 8, 1538-1548.

- Garriga, J., Limon, A., Mayol, X., Rane, S.G., Albrecht, J.H., Reddy, E.P., Andres, V., and Grana, X. (1998). Differential regulation of the retinoblastoma family of proteins during cell proliferation and differentiation. *The Biochemical journal* 333 ( Pt 3), 645-654.
- Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21, 311-335.
- Gentilini, A., Feliars, D., Pinzani, M., Woodruff, K., and Abboud, S. (1998). Characterization and regulation of insulin-like growth factor binding proteins in human hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 174, 240-250.
- Gentilini, A., Marra, F., Gentilini, P., and Pinzani, M. (2000). Phosphatidylinositol-3 kinase and extracellular signal-regulated kinase mediate the chemotactic and mitogenic effects of insulin-like growth factor-I in human hepatic stellate cells. *Journal of hepatology* 32, 227-234.
- Ghatak, S., Biswas, A., Dhali, G.K., Chowdhury, A., Boyer, J.L., and Santra, A. (2011). Oxidative stress and hepatic stellate cell activation are key events in arsenic induced liver fibrosis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 251, 59-69.
- Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593-604.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Gramantieri, L., Chieco, P., Giovannini, C., Lacchini, M., Trere, D., Grazi, G.L., Venturi, A., and Bolondi, L. (2005). GADD45-alpha expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma: relationship with DNA repair and proliferation. *Hum Pathol* 36, 1154-1162.
- Gressner, A.M., and Weiskirchen, R. (2006). Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 10, 76-99.
- Grotendorst, G.R. (1997). Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine & growth factor reviews* 8, 171-179.
- Hall, K., Blair Zajdel, M.E., and Blair, G.E. (2010). Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. *Biochem J* 431, 321-336.
- Harashima, M., Seki, T., Ariga, T., and Niimi, S. (2013). Role of p16(INK4a) in the inhibition of DNA synthesis stimulated by HGF or EGF in primary cultured rat hepatocytes. *Biomedical research* 34, 269-273.
- Hareendran, S., Balakrishnan, B., Sen, D., Kumar, S., Srivastava, A., and Jayandharan, G.R. (2013). Adeno-associated virus (AAV) vectors in gene therapy: immune challenges and strategies to circumvent them. *Rev Med Virol* 23, 399-413.
- Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., and Jacobs, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 9, 12.
- Haynesworth, S.E., Baber, M.A., and Caplan, A.I. (1996). Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 166, 585-592.
- Heidelbaugh, J.J., and Bruderly, M. (2006). Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *Am Fam Physician* 74, 756-762.
- Hematti, P. (2008). Role of mesenchymal stromal cells in solid organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 22, 262-273.
- Henderson, N.C., and Iredale, J.P. (2007). Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)* 112, 265-280.

- Higashi, Y., Shai, S.Y., Sukhanov, S., Kim, C.D., and Delafontaine, P. (2011). Monocyte/Macrophage Specific Knockout of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Promotes Atherosclerosis and Induces an Unstable Plaque Phenotype. *Circulation* 124, A10717.
- Huebener, P., and Schwabe, R.F. (2013). Regulation of wound healing and organ fibrosis by toll-like receptors. *Biochim Biophys Acta* 1832, 1005-1017.
- Hunter, A.L., Holscher, M.A., and Neal, R.A. (1977). Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J Pharmacol Exp Ther* 200, 439-448.
- Huynh, H. (2004). Overexpression of tumour suppressor retinoblastoma 2 protein (pRb2/p130) in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 25, 1485-1494.
- In 't Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G.M., Claas, F.H., Fibbe, W.E., and Kanhai, H.H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22, 1338-1345.
- Inagaki, Y., Higashi, K., Kushida, M., Hong, Y.Y., Nakao, S., Higashiyama, R., Moro, T., Itoh, J., Mikami, T., Kimura, T., et al. (2008). Hepatocyte growth factor suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with galectin-7. *Gastroenterology* 134, 1180-1190.
- Ip, J.E., Wu, Y., Huang, J., Zhang, L., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. (2007). Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell* 18, 2873-2882.
- Iredale, J.P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29, 43-54.
- Iredale, J.P., Thompson, A., and Henderson, N.C. (2013). Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1832, 876-883.
- Ishikawa, H., Jo, J., and Tabata, Y. (2012). Liver Anti-Fibrosis Therapy with Mesenchymal Stem Cells Secreting Hepatocyte Growth Factor. *J Biomater Sci Polym Ed* 23, 2259-2272.
- Ishikawa, H., Jo, J.I., and Tabata, Y. (2011). Liver Anti-Fibrosis Therapy with Mesenchymal Stem Cells Secreting Hepatocyte Growth Factor. *J Biomater Sci Polym Ed*.
- Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M., Cong, M., Moore-Morris, T.J., Park, T.J., Liu, X., Xu, J., Wang, P., Paik, Y.H., et al. (2014). Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E3297-3305.
- Jakubowski, A., Ambrose, C., Parr, M., Lincecum, J.M., Wang, M.Z., Zheng, T.S., Browning, B., Michaelson, J.S., Baetscher, M., Wang, B., et al. (2005). TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J Clin Invest* 115, 2330-2340.
- Jung, J., Choi, J.H., Lee, Y., Park, J.W., Oh, I.H., Hwang, S.G., Kim, K.S., and Kim, G.J. (2013). Human placenta-derived mesenchymal stem cells promote hepatic regeneration in CCl<sub>4</sub> -injured rat liver model via increased autophagic mechanism. *Stem Cells* 31, 1584-1596.
- Kaibori, M., Adachi, Y., Shimo, T., Ishizaki, M., Matsui, K., Tanaka, Y., Ohishi, M., Araki, Y., Okumura, T., Nishizawa, M., et al. (2012). Stimulation of liver regeneration after hepatectomy in mice by injection of bone marrow mesenchymal stem cells via the portal vein. *Transplant Proc* 44, 1107-1109.
- Kalluri, R. (2009). EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 119, 1417-1419.
- Kang, S.K., Lee, D.H., Bae, Y.C., Kim, H.K., Baik, S.Y., and Jung, J.S. (2003). Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol* 183, 355-366.

- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G.G., Demiralp, D.O., Tukun, A., Uckan, D., and Can, A. (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 25, 319-331.
- Karlmarm, K.R., Weiskirchen, R., Zimmermann, H.W., Gassler, N., Ginhoux, F., Weber, C., Merad, M., Luedde, T., Trautwein, C., and Tacke, F. (2009). Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 50, 261-274.
- Karp, J.M., and Leng Teo, G.S. (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 4, 206-216.
- Kaukua, N., Shahidi, M.K., Konstantinidou, C., Dyachuk, V., Kaucka, M., Furlan, A., An, Z., Wang, L., Hultman, I., Ahrlund-Richter, L., et al. (2014). Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature* 513, 551-554.
- Kent, G., Gay, S., Inouye, T., Bahu, R., Minick, O.T., and Popper, H. (1976). Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3719-3722.
- Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J.L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, V.L., Weil, M., Andreeff, M., and Marini, F.C. (2009). Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* 27, 2614-2623.
- Kim, M.D., Kim, S.S., Cha, H.Y., Jang, S.H., Chang, D.Y., Kim, W., Suh-Kim, H., and Lee, J.H. (2014). Therapeutic effect of hepatocyte growth factor-secreting mesenchymal stem cells in a rat model of liver fibrosis. *Exp Mol Med* 46, e110.
- Kim, W.H., Matsumoto, K., Bessho, K., and Nakamura, T. (2005). Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *Am J Pathol* 166, 1017-1028.
- Kinnman, N., Hultcrantz, R., Barbu, V., Rey, C., Wendum, D., Poupon, R., and Housset, C. (2000). PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest* 80, 697-707.
- Kiss, J., Urban, V.S., Dudics, V., Vas, V., and Uher, F. (2008). [Mesenchymal stem cells and the immune system--immunosuppression without drugs?]. *Orv Hetil* 149, 339-346.
- Kisseleva, T., Cong, M., Paik, Y., Scholten, D., Jiang, C., Benner, C., Iwaisako, K., Moore-Morris, T., Scott, B., Tsukamoto, H., et al. (2012). Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9448-9453.
- Kisseleva, T., Uchinami, H., Feirt, N., Quintana-Bustamante, O., Segovia, J.C., Schwabe, R.F., and Brenner, D.A. (2006). Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol* 45, 429-438.
- Knodell, R.G., Ishak, K.G., Black, W.C., Chen, T.S., Craig, R., Kaplowitz, N., Kiernan, T.W., and Wollman, J. (1981). Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1, 431-435.
- Ko, I.K., Kean, T.J., and Dennis, J.E. (2009). Targeting mesenchymal stem cells to activated endothelial cells. *Biomaterials* 30, 3702-3710.
- Koch, K.S., Shapiro, P., Skelly, H., and Leffert, H.L. (1982). Rat hepatocyte proliferation is stimulated by insulin-like peptides in defined medium. *Biochem Biophys Res Commun* 109, 1054-1060.
- Krampera, M., Marconi, S., Pasini, A., Galie, M., Rigotti, G., Mosna, F., Tinelli, M., Lovato, L., Anghileri, E., Andreini, A., et al. (2007). Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone* 40, 382-390.



- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S.W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 134, 657-667.
- Kumar, V. (2013). NKT-cell subsets: promoters and protectors in inflammatory liver disease. *Journal of hepatology* 59, 618-620.
- Kuznetsov, S.A., Mankani, M.H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., and Robey, P.G. (2001). Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 153, 1133-1140.
- Lan, L., Chen, Y., Sun, C., Sun, Q., Hu, J., and Li, D. (2008). Transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells transduced with adenovirus-mediated IL-10 gene reverses liver fibrosis in rats. *Transpl Int* 21, 581-592.
- Le Blanc, K., and Ringden, O. (2007). Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 262, 509-525.
- Le Blanc, K., Samuelsson, H., Lonnie, L., Sundin, M., and Ringden, O. (2007). Generation of immunosuppressive mesenchymal stem cells in allogeneic human serum. *Transplantation* 84, 1055-1059.
- Ledley, F.D. (1995). Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* 6, 1129-1144.
- Lee, K.C., Lin, H.C., Huang, Y.H., and Hung, S.C. (2015a). Allo-transplantation of mesenchymal stem cells attenuates hepatic injury through IL1Ra dependent macrophage switch in a mouse model of liver disease. *Journal of hepatology* 63, 1405-1412.
- Lee, Y.A., Wallace, M.C., and Friedman, S.L. (2015b). Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* 64, 830-841.
- Lefton, H.B., Rosa, A., and Cohen, M. (2009). Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. *The Medical clinics of North America* 93, 787-799, vii.
- Lemoine, S., Cadoret, A., El Mourabit, H., Thabut, D., and Housset, C. (2013). Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1832, 948-954.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689.
- Li, D.L., He, X.H., Zhang, S.A., Fang, J., Chen, F.S., and Fan, J.J. (2013a). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote hepatic regeneration after partial hepatectomy in rats. *Pathobiology* 80, 228-234.
- Li, J., Zhang, L., Xin, J., Jiang, L., Zhang, T., Jin, L., Zhou, P., Hao, S., Cao, H., and Li, L. (2012). Immediate intraportal transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells prevents death from fulminant hepatic failure in pigs. *Hepatology* 56, 1044-1052.
- Li, M., and Ikehara, S. (2013). Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem Cells Int* 2013, 132642.
- Li, T., Zhu, J., Ma, K., Liu, N., Feng, K., Li, X., Wang, S., and Bie, P. (2013b). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes liver regeneration after portal vein embolization in cirrhotic rats. *J Surg Res* 184, 1161-1173.
- Li, X., Benjamin, I.S., and Alexander, B. (2002). Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol* 36, 488-493.
- Lieber, C.S. (2005). Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. *Rocz Akad Med Białymst* 50, 7-20.
- Lodder, J., Denaës, T., Chobert, M.-N., Wan, J., El-Benna, J., Pawlotsky, J.-M., Lotersztajn, S., and Teixeira-Clerc, F. (2015). Macrophage autophagy protects against liver fibrosis in mice. *Autophagy*, 00-00.

- Lorenzini, S., Isidori, A., Catani, L., Gramenzi, A., Talarico, S., Bonifazi, F., Giudice, V., Conte, R., Baccarani, M., Bernardi, M., et al. (2008). Stem cell mobilization and collection in patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 27, 932-939.
- Ma, X.R., Tang, Y.L., Xuan, M., Chang, Z., Wang, X.Y., and Liang, X.H. (2015). Transplantation of autologous mesenchymal stem cells for end-stage liver cirrhosis: a meta-analysis based on seven controlled trials. *Gastroenterol Res Pract* 2015, 908275.
- Maggini, J., Mirkin, G., Bognanni, I., Holmberg, J., Piazzon, I.M., Nepomnaschy, I., Costa, H., Canones, C., Raiden, S., Vermeulen, M., et al. (2010). Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One* 5, e9252.
- Maher, J.J. (1993). Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Upregulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. *J Clin Invest* 91, 2244-2252.
- Mair, M., Blaas, L., Osterreicher, C.H., Casanova, E., and Eferl, R. (2011). JAK-STAT signaling in hepatic fibrosis. *Frontiers in bioscience* 16, 2794-2811.
- Majore, I., Moretti, P., Stahl, F., Hass, R., and Kasper, C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Stem Cell Rev* 7, 17-31.
- Mallat, A., and Lotersztajn, S. (2008). Cannabinoid receptors as therapeutic targets in the management of liver diseases. *Drug news & perspectives* 21, 363-368.
- Mallat, A., and Lotersztajn, S. (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 5. Novel insights into liver fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 305, C789-799.
- Mansilla, E., Marin, G.H., Drago, H., Sturla, F., Salas, E., Gardiner, C., Bossi, S., Lamonega, R., Guzman, A., Nunez, A., et al. (2006). Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc* 38, 967-969.
- Marcus, A.J., Coyne, T.M., Rauch, J., Woodbury, D., and Black, I.B. (2008). Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation* 76, 130-144.
- Marra, F., Aleffi, S., Galastri, S., and Provenzano, A. (2009). Mononuclear cells in liver fibrosis. *Seminars in immunopathology* 31, 345-358.
- Marra, F., DeFranco, R., Grappone, C., Milani, S., Pastacaldi, S., Pinzani, M., Romanelli, R.G., Laffi, G., and Gentilini, P. (1998). Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 152, 423-430.
- Mathias, L.J., Khong, S.M., Spyroglou, L., Payne, N.L., Siatskas, C., Thorburn, A.N., Boyd, R.L., and Heng, T.S. (2013). Alveolar macrophages are critical for the inhibition of allergic asthma by mesenchymal stromal cells. *J Immunol* 191, 5914-5924.
- Matsubara, T., Tanaka, N., Sato, M., Kang, D.W., Krausz, K.W., Flanders, K.C., Ikeda, K., Luecke, H., Wakefield, L.M., and Gonzalez, F.J. (2012). TGF-beta-SMAD3 signaling mediates hepatic bile acid and phospholipid metabolism following lithocholic acid-induced liver injury. *J Lipid Res* 53, 2698-2707.
- Mazzolini, G., Ochoa, M.C., Morales-Kastresana, A., Sanmamed, M.F., and Melero, I. (2012). The liver, liver metastasis and liver cancer: a special case for immunotherapy with cytokines and immunostimulatory monoclonal antibodies. *Immunotherapy* 4, 1081-1085.
- Mehal, W., and Imaeda, A. (2010). Cell death and fibrogenesis. *Seminars in liver disease* 30, 226-231.

- Meirelles Lda, S., Fontes, A.M., Covas, D.T., and Caplan, A.I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews* 20, 419-427.
- Melhem, A., Muhanna, N., Bishara, A., Alvarez, C.E., Ilan, Y., Bishara, T., Horani, A., Nassar, M., Friedman, S.L., and Safadi, R. (2006). Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *Journal of hepatology* 45, 60-71.
- Minguell, J.J., Erices, A., and Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 507-520.
- Miranda-Diaz, A., Rincon, A.R., Salgado, S., Vera-Cruz, J., Galvez, J., Islas, M.C., Berumen, J., Aguilar-Cordova, E., and Armendariz-Borunda, J. (2004). Improved effects of viral gene delivery of human uPA plus biliodigestive anastomosis induce recovery from experimental biliary cirrhosis. *Mol Ther* 9, 30-37.
- Miyoshi, H., Rust, C., Roberts, P.J., Burgart, L.J., and Gores, G.J. (1999). Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology* 117, 669-677.
- Mohamadnejad, M., Alimoghaddam, K., Mohyeddin-Bonab, M., Bagheri, M., Bashtar, M., Ghanaati, H., Baharvand, H., Ghavamzadeh, A., and Malekzadeh, R. (2007). Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* 10, 459-466.
- Morell, C.M., and Strazzabosco, M. (2014). Notch signaling and new therapeutic options in liver disease. *Journal of hepatology* 60, 885-890.
- Morikawa, S., Mabuchi, Y., Niibe, K., Suzuki, S., Nagoshi, N., Sunabori, T., Shimmura, S., Nagai, Y., Nakagawa, T., Okano, H., et al. (2009). Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 1114-1119.
- Muller, A., Machnik, F., Zimmermann, T., and Schubert, H. (1988). Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats--usefulness and reliability of this animal model. *Exp Pathol* 34, 229-236.
- Neal, R.A., and Halpert, J. (1982). Toxicology of thiono-sulfur compounds. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22, 321-339.
- Nieto, N., Dominguez-Rosales, J.A., Fontana, L., Salazar, A., Armendariz-Borunda, J., Greenwel, P., and Rojkind, M. (2001). Rat hepatic stellate cells contribute to the acute-phase response with increased expression of alpha1(I) and alpha1(IV) collagens, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and matrix-metalloproteinase-2 messenger RNAs. *Hepatology* 33, 597-607.
- Novo, E., Cannito, S., Paternostro, C., Bocca, C., Miglietta, A., and Parola, M. (2014). Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics* 548, 20-37.
- Novo, E., Marra, F., Zamara, E., Valfre di Bonzo, L., Caligiuri, A., Cannito, S., Antonaci, C., Colombatto, S., Pinzani, M., and Parola, M. (2006). Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut* 55, 90-97.
- Oren, R., Dotan, I., Papa, M., Marravi, Y., Aeed, H., Barg, J., Zeidel, L., Bruck, R., and Halpern, Z. (1996). Inhibition of experimentally induced cirrhosis in rats by hypothyroidism. *Hepatology* 24, 419-423.
- Ortica, S., Tarantino, N., Aulner, N., Israel, A., and Gupta-Rossi, N. (2014). The 4 Notch receptors play distinct and antagonistic roles in the proliferation and hepatocytic differentiation of liver progenitors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28, 603-614.

- Ortiz, L.A., Dutreil, M., Fattman, C., Pandey, A.C., Torres, G., Go, K., and Phinney, D.G. (2007). Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11002-11007.
- Owen, M., and Friedenstein, A.J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136, 42-60.
- Palmeira, C.M., and Rolo, A.P. (2004). Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicology* 203, 1-15.
- Pan, R.L., Wang, P., Xiang, L.X., and Shao, J.Z. Delta-like 1 serves as a new target and contributor to liver fibrosis down-regulated by mesenchymal stem cell transplantation. *J Biol Chem* 286, 12340-12348.
- Parekkadan, B., van Poll, D., Megeed, Z., Kobayashi, N., Tilles, A.W., Berthiaume, F., and Yarmush, M.L. (2007). Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 247-252.
- Patel, K.J., Yu, V.P., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F.C., Evans, M.J., Colledge, W.H., Friedman, L.S., Ponder, B.A., and Venkitaraman, A.R. (1998). Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell* 1, 347-357.
- Pellicoro, A., Aucott, R.L., Ramachandran, P., Robson, A.J., Fallowfield, J.A., Snowden, V.K., Hartland, S.N., Vernon, M., Duffield, J.S., Benyon, R.C., et al. (2012). Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. *Hepatology* 55, 1965-1975.
- Phanish, M.K., Wahab, N.A., Colville-Nash, P., Hendry, B.M., and Dockrell, M.E. (2006). The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGFbeta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells. *The Biochemical journal* 393, 601-607.
- Pinzani, M., and Rombouts, K. (2004). Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 36, 231-242.
- Pinzani, M., Rosselli, M., and Zuckermann, M. (2011). Liver cirrhosis. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 25, 281-290.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Poli, G. (2000). Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 21, 49-98.
- Ponte, A.L., Marais, E., Gallay, N., Langonne, A., Delorme, B., Herault, O., Charbord, P., and Domenech, J. (2007). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25, 1737-1745.
- Porth, ed. (2009). *Fisiopatología. Salud-enfermedad: un enfoque conceptual*. , 7 edición edn (Editorial Panamericana).
- Prieto, J., Qian, C., Hernandez-Alcoceba, R., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Mazzolini, G., Sangro, B., and Kramer, M.G. (2004). Gene therapy of liver diseases. *Expert opinion on biological therapy* 4, 1073-1091.
- Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74.
- Prockop, D.J., and Oh, J.Y. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther* 20, 14-20.
- Radaeva, S., Sun, R., Jaruga, B., Nguyen, V.T., Tian, Z., and Gao, B. (2006). Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 130, 435-452.

- Raffaghella, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello, L., and Pistoia, V. (2008). Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 26, 151-162.
- Ramachandran, P., and Iredale, J.P. (2012). Macrophages: central regulators of hepatic fibrogenesis and fibrosis resolution. *Journal of hepatology* 56, 1417-1419.
- Ramachandran, P., Pellicoro, A., Vernon, M.A., Boulter, L., Aucott, R.L., Ali, A., Hartland, S.N., Snowden, V.K., Cappon, A., Gordon-Walker, T.T., et al. (2012). Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E3186-3195.
- Ren, G., Chen, X., Dong, F., Li, W., Ren, X., Zhang, Y., and Shi, Y. (2012). Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem cells translational medicine* 1, 51-58.
- Reynaert, H., Thompson, M.G., Thomas, T., and Geerts, A. (2002). Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 50, 571-581.
- Riedemann, J., and Macaulay, V.M. (2006). IGF1R signalling and its inhibition. *Endocrine-related cancer* 13 Suppl 1, S33-43.
- Ruster, B., Gottig, S., Ludwig, R.J., Bistrrian, R., Muller, S., Seifried, E., Gille, J., and Henschler, R. (2006). Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 108, 3938-3944.
- Salazar-Montes, A.M., Hernandez-Ortega, L.D., Lucano-Landeros, M.S., and Armendariz-Borunda, J. (2015). New gene therapy strategies for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 21, 3813-3825.
- Sanz, S., Pucilowska, J.B., Liu, S., Rodriguez-Ortigosa, C.M., Lund, P.K., Brenner, D.A., Fuller, C.R., Simmons, J.G., Pardo, A., Martinez-Chantar, M.L., et al. (2005). Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury. *Gut* 54, 134-141.
- Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., Sato, T., Miyanishi, K., Takayama, T., Takahashi, M., et al. (2005). Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 106, 756-763.
- Scharf, J.G., Schmitz, F., Frystyk, J., Skjaerbaek, C., Moesus, H., Blum, W.F., Ramadori, G., and Hartmann, H. (1996). Insulin-like growth factor-I serum concentrations and patterns of insulin-like growth factor binding proteins in patients with chronic liver disease. *Journal of hepatology* 25, 689-699.
- Schiedner, G., Morral, N., Parks, R.J., Wu, Y., Koopmans, S.C., Langston, C., Graham, F.L., Beaudet, A.L., and Kochanek, S. (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 18, 180-183.
- Scholten, D., Reichart, D., Paik, Y.H., Lindert, J., Bhattacharya, J., Glass, C.K., Brenner, D.A., and Kisseleva, T. (2011). Migration of fibrocytes in fibrogenic liver injury. *Am J Pathol* 179, 189-198.
- Schuppan, D., and Kim, Y.O. (2013). Evolving therapies for liver fibrosis. *J Clin Invest* 123, 1887-1901.
- Schwabe, R.F., Bataller, R., and Brenner, D.A. (2003). Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G949-958.
- Segers, V.F., Van Riet, I., Andries, L.J., Lemmens, K., Demolder, M.J., De Becker, A.J., Kockx, M.M., and De Keulenaer, G.W. (2006). Mesenchymal stem cell

- adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H1370-1377.
- Senties-Gomez, M.D., Galvez-Gastelum, F.J., Meza-Garcia, E., and Armendariz-Borunda, J. (2005). [Hepatic fibrosis: role of matrix metalloproteases and TGFbeta]. *Gac Med Mex* 141, 315-322.
- Seo, K.W., Sohn, S.Y., Bhang, D.H., Nam, M.J., Lee, H.W., and Youn, H.Y. (2014). Therapeutic effects of hepatocyte growth factor-overexpressing human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on liver fibrosis in rats. *Cell Biol Int* 38, 106-116.
- Sepp-Lorenzino, L. (1998). Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast cancer research and treatment* 47, 235-253.
- Shan, Z., Li, G., Zhan, Q., and Li, D. (2012). Gadd45a inhibits cell migration and invasion by altering the global RNA expression. *Cancer biology & therapy* 13, 1112-1122.
- Shaul, Y., and Ben-Yehoyada, M. (2005). Role of c-Abl in the DNA damage stress response. *Cell research* 15, 33-35.
- Shim, M.S., and Kwon, Y.J. (2010). Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *FEBS J* 277, 4814-4827.
- Silva, G.V., Litovsky, S., Assad, J.A., Sousa, A.L., Martin, B.J., Vela, D., Coulter, S.C., Lin, J., Ober, J., Vaughn, W.K., et al. (2005). Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 111, 150-156.
- Siller-Lopez, F., Sandoval, A., Salgado, S., Salazar, A., Bueno, M., Garcia, J., Vera, J., Galvez, J., Hernandez, I., Ramos, M., et al. (2004). Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology* 126, 1122-1133; discussion 1949.
- Skrtic, S., Wallenius, K., Gressner, A.M., and Jansson, J.O. (1999). Insulin-like growth factor signaling pathways in rat hepatic stellate cells: importance for deoxyribonucleic acid synthesis and hepatocyte growth factor production. *Endocrinology* 140, 5729-5735.
- Smith, H., Whittall, C., Weksler, B., and Middleton, J. Chemokines stimulate bidirectional migration of human mesenchymal stem cells across bone marrow endothelial cells. *Stem Cells Dev* 21, 476-486.
- Sobrevals, L., Rodriguez, C., Romero-Trevejo, J.L., Gondi, G., Monreal, I., Paneda, A., Juanarena, N., Arcelus, S., Razquin, N., Guembe, L., et al. (2010). Insulin-like growth factor I gene transfer to cirrhotic liver induces fibrolysis and reduces fibrogenesis leading to cirrhosis reversion in rats. *Hepatology* 51, 912-921.
- Sokol, R.J., Winklhofer-Roob, B.M., Devereaux, M.W., and McKim, J.M., Jr. (1995). Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* 109, 1249-1256.
- Song, K., Cornelius, S.C., Reiss, M., and Danielpour, D. (2003). Insulin-like growth factor-I inhibits transcriptional responses of transforming growth factor-beta by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent suppression of the activation of Smad3 but not Smad2. *J Biol Chem* 278, 38342-38351.
- Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M., and Marini, F. (2008). Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 15, 730-738.
- Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111, 1327-1333.

- Steingen, C., Brenig, F., Baumgartner, L., Schmidt, J., Schmidt, A., and Bloch, W. (2008). Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 44, 1072-1084.
- Sun, C., Li, D.G., Chen, Y.W., Chen, Y.W., Wang, B.C., Sun, Q.L., and Lu, H.M. (2008). Transplantation of urokinase-type plasminogen activator gene-modified bone marrow-derived liver stem cells reduces liver fibrosis in rats. *The journal of gene medicine* 10, 855-866.
- Sutton, M.T., and Bonfield, T.L. (2014). Stem cells: innovations in clinical applications. *Stem Cells Int* 2014, 516278.
- Tacke, F., and Zimmermann, H.W. (2014). Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of hepatology* 60, 1090-1096.
- Takase, H.M., Itoh, T., Ino, S., Wang, T., Koji, T., Akira, S., Takikawa, Y., and Miyajima, A. (2013). FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes & development* 27, 169-181.
- Takashima, Y., Era, T., Nakao, K., Kondo, S., Kasuga, M., Smith, A.G., and Nishikawa, S. (2007). Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 129, 1377-1388.
- Taura, K., Miura, K., Iwaisako, K., Osterreicher, C.H., Kodama, Y., Penz-Osterreicher, M., and Brenner, D.A. (2010). Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 51, 1027-1036.
- Teixeira-Clerc, F., Julien, B., Grenard, P., Tran Van Nhieu, J., Deveaux, V., Li, L., Serriere-Lanneau, V., Ledent, C., Mallat, A., and Lotersztajn, S. (2006). CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 12, 671-676.
- Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., and Crawford, J.M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30, 1425-1433.
- Theret, N., Lehti, K., Musso, O., and Clement, B. (1999). MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 30, 462-468.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A., and Kay, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature reviews Genetics* 4, 346-358.
- Thomas, J.A., Pope, C., Wojtacha, D., Robson, A.J., Gordon-Walker, T.T., Hartland, S., Ramachandran, P., Van Deemter, M., Hume, D.A., Iredale, J.P., et al. (2011). Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function. *Hepatology* 53, 2003-2015.
- Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., Mortier, C., Bron, D., and Lagneaux, L. (2005). Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 23, 1105-1112.
- Tondreau, T., Meuleman, N., Stamatopoulos, B., De Bruyn, C., Delforge, A., Dejeneffe, M., Martiat, P., Bron, D., and Lagneaux, L. (2009). In vitro study of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase production by mesenchymal stromal cells in response to inflammatory cytokines: the role of their migration in injured tissues. *Cytotherapy* 11, 559-569.
- Tortora, G.J., and Derrickson, B. (2013). *Principios de Anatomía y Fisiología*, 13 edn (Editorial Medica Panamericana).
- Treacy, O., Ryan, A.E., Heinzl, T., O'Flynn, L., Cregg, M., Wilk, M., Odoardi, F., Lohan, P., O'Brien, T., Nosov, M., et al. (2012). Adenoviral transduction of mesenchymal stem cells: in vitro responses and in vivo immune responses after cell transplantation. *PLoS One* 7, e42662.

- Tsai, P.C., Fu, T.W., Chen, Y.M., Ko, T.L., Chen, T.H., Shih, Y.H., Hung, S.C., and Fu, Y.S. (2009). The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis. *Liver Transpl* 15, 484-495.
- Ueki, T., Kaneda, Y., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Sawa, Y., Morishita, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., Takahashi, H., Okamoto, E., et al. (1999). Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nature medicine* 5, 226-230.
- van Poll, D., Parekkadan, B., Cho, C.H., Berthiaume, F., Nahmias, Y., Tilles, A.W., and Yarmush, M.L. (2008). Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology* 47, 1634-1643.
- Van Rooijen, N., and Sanders, A. (1994). Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *Journal of immunological methods* 174, 83-93.
- van Rooijen, N., and van Kesteren-Hendrikx, E. (2003). "In vivo" depletion of macrophages by liposome-mediated "suicide". *Methods in enzymology* 373, 3-16.
- Vera, M., Sobrevals, L., Zaratiegui, M., Martinez, L., Palencia, B., Rodriguez, C.M., Prieto, J., and Fortes, P. (2007). Liver transduction with a simian virus 40 vector encoding insulin-like growth factor I reduces hepatic damage and the development of liver cirrhosis. *Gene Ther* 14, 203-210.
- Verma, I.M., and Somia, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239-242.
- Vinas, O., Bataller, R., Sancho-Bru, P., Gines, P., Berenguer, C., Enrich, C., Nicolas, J.M., Ercilla, G., Gallart, T., Vives, J., et al. (2003). Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 38, 919-929.
- Volarevic, V., Nurkovic, J., Arsenijevic, N., and Stojkovic, M. (2014). Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis. *Stem Cells* 32, 2818-2823.
- Volpers, C., and Kochanek, S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *The journal of gene medicine* 6 Suppl 1, S164-171.
- Vyas, S.K., Leyland, H., Gentry, J., and Arthur, M.J. (1995). Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture. *Gastroenterology* 109, 889-898.
- Waehler, R., Russell, S.J., and Curiel, D.T. (2007). Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nature reviews Genetics* 8, 573-587.
- Wallace, K., Burt, A.D., and Wright, M.C. (2008). Liver fibrosis. *Biochem J* 411, 1-18.
- Wan, C., He, Q., and Li, G. (2006). Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model. *J Orthop Res* 24, 610-618.
- Wang, C.H., Cheng, W.J., Yang, N.I., Kuo, L.T., Hsu, C.M., Yeh, H.I., Lan, Y.J., Yeh, C.H., and Stanford, W.L. (2008). Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 54-60.
- Wang, L., Li, J., Liu, H., Li, Y., Fu, J., Sun, Y., Xu, R., Lin, H., Wang, S., Lv, S., et al. (2013). Pilot study of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transfusion in patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 28 Suppl 1, 85-92.
- Wang, P.P., Xie, D.Y., Liang, X.J., Peng, L., Zhang, G.L., Ye, Y.N., Xie, C., and Gao, Z.L. (2012). HGF and direct mesenchymal stem cells contact synergize to inhibit hepatic stellate cells activation through TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. *PLoS One* 7, e43408.



- Weiskirchen, R., and Tacke, F. (2014). Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary surgery and nutrition* 3, 344-363.
- Weng, Z., Fluckiger, A.C., Nisitani, S., Wahl, M.I., Le, L.Q., Hunter, C.A., Fernal, A.A., Le Beau, M.M., and Witte, O.N. (1998). A DNA damage and stress inducible G protein-coupled receptor blocks cells in G2/M. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12334-12339.
- Werwein, E., Schmedt, T., Hoffmann, H., Usadel, C., Obermann, N., Singer, J.D., and Klemmner, K.H. (2012). B-Myb promotes S-phase independently of its sequence-specific DNA binding activity and interacts with polymerase delta-interacting protein 1 (Pdi1). *Cell cycle* 11, 4047-4058.
- Winwood, P.J., Schuppan, D., Iredale, J.P., Kawser, C.A., Docherty, A.J., and Arthur, M.J. (1995). Kupffer cell-derived 95-kd type IV collagenase/gelatinase B: characterization and expression in cultured cells. *Hepatology* 22, 304-315.
- Wislet-Gendebien, S., Laudet, E., Neirinckx, V., Alix, P., Leprince, P., Glejzer, A., Poulet, C., Hennuy, B., Sommer, L., Shakhova, O., et al. (2012). Mesenchymal stem cells and neural crest stem cells from adult bone marrow: characterization of their surprising similarities and differences. *Cell Mol Life Sci* 69, 2593-2608.
- Wolff, D., Steiner, B., Hildebrandt, G., Edinger, M., and Holler, E. (2009). Pharmaceutical and cellular strategies in prophylaxis and treatment of graft-versus-host disease. *Curr Pharm Des* 15, 1974-1997.
- Wu, C.S., Piao, X.X., Piao, D.M., Jin, Y.R., and Li, C.H. (2005). Treatment of pig serum-induced rat liver fibrosis with *Boschniackia rossica*, oxymatrine and interferon-alpha. *World J Gastroenterol* 11, 122-126.
- Xu, G.F., Li, P.T., Wang, X.Y., Jia, X., Tian, D.L., Jiang, L.D., and Yang, J.X. (2004). Dynamic changes in the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMPs, during hepatic fibrosis induced by alcohol in rats. *World J Gastroenterol* 10, 3621-3627.
- Xu, L., Gong, Y., Wang, B., Shi, K., Hou, Y., Wang, L., Lin, Z., Han, Y., Lu, L., Chen, D., et al. (2014). Randomized trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for hepatitis B virus cirrhosis: regulation of Treg/Th17 cells. *J Gastroenterol Hepatol* 29, 1620-1628.
- Xue, F., Takahara, T., Yata, Y., Kuwabara, Y., Shinno, E., Nonome, K., Minemura, M., Takahara, S., Li, X., Yamato, E., et al. (2003). Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy. *Gut* 52, 694-700.
- Yang, C., Zeisberg, M., Mosterman, B., Sudhakar, A., Yerramalla, U., Holthaus, K., Xu, L., Eng, F., Afdhal, N., and Kalluri, R. (2003). Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 124, 147-159.
- Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E., and Wilson, J.M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4407-4411.
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Nakatani, T., Tsujinoue, H., Yanase, K., Namisaki, T., Imazu, H., et al. (2002). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 36, 850-860.
- Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., et al. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106, 1755-1761.
- Zhang, S., Chen, L., Liu, T., Zhang, B., Xiang, D., Wang, Z., and Wang, Y. (2012). Human umbilical cord matrix stem cells efficiently rescue acute liver failure

through paracrine effects rather than hepatic differentiation. *Tissue Eng Part A* 18, 1352-1364.

Zhang, W.W. (1999). Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 6, 113-138.