

# **UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**

## **FACULTAD DE MEDICINA**

### **CARRERA DE TECNOLOGÍA**

### **MÉDICA**

“Fibrosis hepática, comportamiento de la matriz extracelular y efectos de la aplicación de membrana amniótica humana. Una revisión narrativa”.

Seminario de Grado  
presentado en conformidad a los requisitos para obtener  
el Grado Académico de

“Licenciado en Tecnología Médica con  
mención en  
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”

**Belén Alejandra Vargas Tardón**

Profesor Guía: Sebastián San Martín Henríquez.  
Profesor Co Guía: Ivo Carrasco Wong.

2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer profundamente a Dios, a la Madre Naturaleza y a la Vida, por brindarme esta oportunidad.

A mis profesores guías Sebastián e Ivo, por su orientación, compromiso y por creer en mí.

Finalmente, a todos mis seres amados, por estar en los momentos difíciles y por ser un apoyo incondicional.

## DEDICATORIA

A mi “Lagertha”.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                |                                                                                                                            |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><math>\alpha</math>-SMA</b> | Actina de músculo liso-alfa ( <i>Alpha-smooth muscle actin</i> )                                                           |
| <b>ADAM</b>                    | Desintegrina y metaloproteinasa ( <i>A desintegrin and metalloproteinase</i> )                                             |
| <b>ADSC</b>                    | Células madre mesenquimales de tejido adiposo ( <i>Adipose tissue-derived stem cells</i> )                                 |
| <b>ALK</b>                     | Quinasa similar a receptor de activina ( <i>Activin receptor-like kinase</i> )                                             |
| <b>BDL</b>                     | Ligadura de ducto biliar ( <i>Bile duct ligation</i> )                                                                     |
| <b>bFGF</b>                    | Factor de crecimiento básico de fibroblastos ( <i>Basic fibroblast growth factor</i> )                                     |
| <b>BM-MSC</b>                  | Células madre mesenquimales de médula ósea ( <i>Bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i> )                           |
| <b>BMP</b>                     | Proteína morfogenética ósea ( <i>Bone morphogenetic protein</i> )                                                          |
| <b>CCl<sub>4</sub></b>         | Tetracloruro de carbono.                                                                                                   |
| <b>COMP</b>                    | Proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa ( <i>Cartilage oligomeric matrix protein</i> )                             |
| <b>CTGF</b>                    | Factor de crecimiento de tejido conectivo ( <i>Connective tissue growth factor</i> )                                       |
| <b>DAMP</b>                    | Patrón molecular asociado a daño ( <i>Damage-associated molecular pattern</i> )                                            |
| <b>EGF</b>                     | Factor de crecimiento epidérmico ( <i>Epidermal growth factor</i> )                                                        |
| <b>EMT</b>                     | Transición epitelial-mesenquimal ( <i>Epithelial-mesenchymal transition</i> )                                              |
| <b>ERK1/2</b>                  | Quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares ( <i>Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2</i> ).     |
| <b>GAG</b>                     | Glicosaminoglicanos.                                                                                                       |
| <b>hAECs</b>                   | Células epiteliales amnióticas humanas ( <i>Human amniotic epithelial cells</i> )                                          |
| <b>hAEC-CM</b>                 | Medio condicionado de células epiteliales amnióticas humanas ( <i>Human amniotic epithelial cells-conditioned medium</i> ) |

|                                |                                                                                                                                                  |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>hAEC-EV</b>                 | Vesículas extracelulares de células epiteliales amnióticas humanas ( <i>Human amniotic epithelial cells-extracellular vesicles</i> )             |
| <b>hAM</b>                     | Membrana amniótica humana ( <i>Human amniotic membrane</i> )                                                                                     |
| <b>hAMSCs</b>                  | Células mesenquimales estromales amnióticas humanas ( <i>Human amniotic mesenchymal stromal cells</i> )                                          |
| <b>hAMSC-CM</b>                | Medio condicionado de células mesenquimales estromales amnióticas humanas ( <i>Human amniotic mesenchymal stromal cells-conditioned medium</i> ) |
| <b>HBV</b>                     | Virus de hepatitis B                                                                                                                             |
| <b>HCC</b>                     | Carcinoma hepatocelular ( <i>Hepatocellular carcinoma</i> )                                                                                      |
| <b>HCV</b>                     | Virus de hepatitis C                                                                                                                             |
| <b>HGF</b>                     | Factor de crecimiento de hepatocitos ( <i>Hepatocyte growth factor</i> )                                                                         |
| <b>HLA-G</b>                   | Antígeno leucocitario humano G ( <i>Human leukocyte antigen-G</i> )                                                                              |
| <b>HSC</b>                     | Células estelares hepáticas ( <i>Hepatic stellate cells</i> )                                                                                    |
| <b>HPC</b>                     | Células progenitoras hepáticas ( <i>Hepatic progenitor cells</i> )                                                                               |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | Interferón-gamma                                                                                                                                 |
| <b>IGF-1</b>                   | Factor de crecimiento insulínico 1 ( <i>Insulin growth factor-1</i> )                                                                            |
| <b>IL</b>                      | Interleuquina ( <i>Interleukin</i> )                                                                                                             |
| <b>JNK</b>                     | Quinasas c-Jun N-terminal ( <i>Jun N-Terminal Kinase</i> )                                                                                       |
| <b>LAP</b>                     | Proteína asociada a latencia ( <i>Latency-associated protein</i> )                                                                               |
| <b>LLC</b>                     | Complejo latente grande ( <i>Large latent complex</i> )                                                                                          |
| <b>LOX</b>                     | Lisil oxidasa ( <i>Lysyl oxidase</i> )                                                                                                           |
| <b>LOXL</b>                    | Homóloga de lisil oxidasa ( <i>lysyl oxidase-like</i> )                                                                                          |
| <b>LSECs</b>                   | Células endoteliales sinusoidales hepáticas ( <i>Liver sinusoidal endothelial cells</i> )                                                        |
| <b>LTBP</b>                    | Proteína de unión a TGF- $\beta$ latente ( <i>Latent TGF-<math>\beta</math>-binding protein</i> )                                                |
| <b>LTC</b>                     | Complejo TGF- $\beta$ latente ( <i>Latent TGF-<math>\beta</math> complex</i> )                                                                   |
| <b>MAPK</b>                    | Proteína quinasa activada por mitógenos ( <i>Mitogen-activated protein kinase</i> )                                                              |
| <b>MEC</b>                     | Matriz extracelular.                                                                                                                             |

|                 |                                                                                                                           |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>MMP</b>      | Metaloproteinasa de matriz ( <i>Matrix metalloproteinase</i> )                                                            |
| <b>MSC</b>      | Células madre mesenquimales ( <i>Mesenchymal stem cells</i> )                                                             |
| <b>NAFLD</b>    | Enfermedad hepática grasa no alcohólica ( <i>Non-alcoholic fatty liver disease</i> )                                      |
| <b>NASH</b>     | Esteatohepatitis no alcohólica ( <i>Non-alcoholic steatohepatitis</i> )                                                   |
| <b>NK</b>       | Célula asesina natural ( <i>Natural killer</i> )                                                                          |
| <b>NLRP3</b>    | Inflamasoma NLRP3 ( <i>NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3 inflammasome</i> )                                |
| <b>NOX</b>      | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa ( <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i> ). |
| <b>OCT</b>      | Factor de transcripción de unión a octámero ( <i>Octamer-binding transcription factor</i> )                               |
| <b>PAMP</b>     | Patrón molecular asociado a patógenos ( <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> )                                   |
| <b>PDGF</b>     | Factor de crecimiento derivado de plaquetas ( <i>Platelet-derived growth factor</i> )                                     |
| <b>PGE2</b>     | Prostaglandina E2.                                                                                                        |
| <b>PI3K/AKT</b> | Fosfatidilinositol 3 quinasa/Proteína quinasa B ( <i>phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B</i> )                 |
| <b>ROS</b>      | Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive oxygen species</i> )                                                          |
| <b>SLRP</b>     | Proteoglicano pequeño rico en leucina ( <i>Small leucine-rich proteoglycan</i> )                                          |
| <b>SMAD</b>     | Proteína SMAD ( <i>Suppressor of mothers against decapentaplegic protein</i> )                                            |
| <b>SSEA</b>     | Antígenos embrionarios específicos de etapa ( <i>Stage specific embryonic antigen</i> )                                   |
| <b>TAA</b>      | Tioacetamida                                                                                                              |
| <b>TβR</b>      | Receptor de TGF-β                                                                                                         |
| <b>TERT</b>     | Telomerasa transcriptasa inversa ( <i>Telomerase reverse transcriptase</i> )                                              |
| <b>TGF-β</b>    | Factor de crecimiento transformante-beta ( <i>Transforming growth factor-beta</i> )                                       |

|                                |                                                                                         |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Th</b>                      | Células T helper.                                                                       |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Factor de necrosis tumoral-alfa ( <i>Tumor necrosis factor-alpha</i> )                  |
| <b>TRA</b>                     | Antígeno de rechazo tumoral ( <i>Tumor reject antigen</i> )                             |
| <b>T reg</b>                   | Células T reguladoras.                                                                  |
| <b>VEGF</b>                    | Factor de crecimiento vascular endotelial ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> ) |

## RESUMEN

El hígado es un órgano crucial para la vida y, a la vez, vulnerable a diversas injurias patológicas. Sea cual sea la causa, las hepatopatías presentan inflamación y la subsecuente acumulación crónica de matriz extracelular (MEC), denominada fibrosis hepática. La falta de terapias antifibróticas efectivas que impidan el desarrollo de la cirrosis avanzada, más las dificultades asociadas al trasplante hepático y la disponibilidad de donantes, han orientado hacia la investigación del uso de células madre en medicina regenerativa, para restablecer órganos dañados. Así, la membrana amniótica humana (hAM) surge como una atractiva fuente de células madre y propiedades regenerativas, la cual, en los últimos años, ha sido intensamente estudiada como un posible tratamiento para la fibrosis hepática. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es sintetizar, mediante una revisión narrativa, la información disponible en la literatura vigente sobre la fibrosis hepática, el comportamiento de la MEC del hígado y los efectos de la aplicación de hAM en hígados con fibrosis.

Se consultaron 6 bases de datos (Medline, Ebsco, Scopus, Cochrane, Scielo y LILACS), utilizando los términos en lenguaje natural *liver fibrosis*, *extracellular matrix*, *human amniotic membrane* y *regenerative medicine*. De acuerdo con los criterios establecidos se seleccionaron 245 artículos, incluyendo además 1 tesis doctoral y extractos de 7 libros, sumando un total de 253 referencias para esta revisión.

La fibrosis hepática es una patología compleja, donde la MEC es un agente activo e interactúa bidireccionalmente con las células hepáticas. En el curso de la enfermedad, la MEC experimenta cambios en su composición y cantidad mediante diversos eventos celulares y moleculares, alterando la estructura hepática de forma progresiva. En la última década se han descubierto numerosas propiedades regenerativas para la hAM y sus células. Tras la infusión de células amnióticas (hAECs y hAMSCs) y la aplicación de parches de hAM intacta en modelos experimentales de fibrosis hepática, se han demostrado potentes efectos antifibróticos en el hígado dañado, como la reducción de un 50% de la fibrosis hepática.

En conclusión, la aplicación experimental de hAM y sus células otorga resultados alentadores, avalando su uso como terapia antifibrótica y regenerativa en fibrosis hepática.

**Palabras clave (lenguaje natural):** Fibrosis hepática, matriz extracelular, membrana amniótica humana, medicina regenerativa.

# ÍNDICE

|                                                                             |      |
|-----------------------------------------------------------------------------|------|
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN                                                    | (12) |
| CAPÍTULO 2: OBJETIVOS                                                       | (15) |
| CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA                                                     | (16) |
| CAPÍTULO 4: RESULTADOS                                                      | (18) |
| 4.1. Estructura del hígado.                                                 | (18) |
| 4.2. Fibrosis hepática: patogenia y principales aspectos.                   | (21) |
| 4.2.1. Injuria crónica: inflamación y microambiente pre-fibrótico.          | (21) |
| 4.2.2. Reparación hepática: ¿Regeneración o fibrosis?                       | (24) |
| 4.2.3. Depósito de matriz extracelular (MEC).                               | (26) |
| 4.2.3.1. Dinámica y características de la MEC hepática.                     | (27) |
| 4.2.3.2. Células productoras de MEC.                                        | (31) |
| 4.2.3.3. Eventos moleculares asociados.                                     | (36) |
| 4.2.4. Patrones de Fibrosis hepática.                                       | (40) |
| 4.2.5. Rol de las células hepáticas no parenquimatosas.                     | (42) |
| 4.2.6. Complicaciones asociadas a Fibrosis hepática.                        | (44) |
| 4.2.7. Tratamiento de Fibrosis hepática: actualidad y futuras perspectivas. | (46) |
| 4.2.8. Mecanismos de regresión de Fibrosis hepática.                        | (48) |
| 4.3. Terapia celular emergente en Fibrosis Hepática.                        | (51) |
| 4.4. Membrana amniótica humana (hAM).                                       | (53) |
| 4.4.1 Embriología y desarrollo de la hAM.                                   | (55) |
| 4.4.2. Estructura e histología de la hAM.                                   | (56) |
| 4.4.3. La hAM como fuente de células madre.                                 | (59) |
| 4.4.3.1. Células epiteliales amnióticas humanas (hAECs).                    | (60) |
| 4.4.3.2. Células mesenquimales estromales amnióticas humanas (hAMSCs).      | (62) |
| 4.4.4. Propiedades y beneficios de la hAM.                                  | (63) |
| 4.4.4.1. Propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias.                 | (64) |
| 4.4.4.2. Propiedades angiogénicas y antiangiogénicas.                       | (65) |

|                                                   |      |
|---------------------------------------------------|------|
| 4.4.4.3. Propiedades reepitelizantes.             | (66) |
| 4.4.4.4. Propiedades antitumorales.               | (66) |
| 4.4.4.5. Propiedades antibacterianas.             | (67) |
| 4.4.4.6. Propiedades antifibróticas.              | (68) |
| 4.5. Efectos del uso de hAM en Fibrosis hepática. | (69) |
| 4.5.1. Trasplante de células amnióticas.          | (69) |
| 4.5.1.1. Efectos del trasplante de hAECs.         | (70) |
| 4.5.1.2. Efectos del trasplante de hAMSCs.        | (73) |
| 4.5.2. Aplicación de fragmentos de hAM.           | (77) |
| CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES                          | (84) |
| BIBLIOGRAFÍA                                      | (87) |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>3.1.</b> Algoritmo de búsqueda y selección de artículos.                                                                                                                                                        | (17) |
| <b>4.1.</b> Esquema de un sector del lobulillo hepático.                                                                                                                                                           | (18) |
| <b>4.2.</b> Microfotografía de un espacio portal típico, con sus tres estructuras fundamentales.                                                                                                                   | (19) |
| <b>4.3.</b> Esquema de las diversas etiologías gatillantes de fibrosis hepática.                                                                                                                                   | (22) |
| <b>4.4.</b> Proceso de fibrogénesis hepática.                                                                                                                                                                      | (27) |
| <b>4.5.</b> Características principales de las HSC activadas/miofibroblastos, con sus principales mediadores moleculares.                                                                                          | (34) |
| <b>4.6.</b> Patrones de fibrosis hepática según su etiología.                                                                                                                                                      | (42) |
| <b>4.7.</b> Mecanismos asociados a la reversión o regresión de la fibrosis hepática.                                                                                                                               | (50) |
| <b>4.8.</b> Tejidos perinatales humanos: placenta, membranas fetales y cordón umbilical.                                                                                                                           | (54) |
| <b>4.9.</b> Origen embriológico del epitelio amniótico humano a partir del epiblasto.                                                                                                                              | (55) |
| <b>4.10.</b> Placenta humana a término de la gestación.                                                                                                                                                            | (57) |
| <b>4.11.</b> Capas de la membrana amniótica humana (hAM).                                                                                                                                                          | (58) |
| <b>4.12.</b> Esquema ilustrativo de los marcadores expresados por las células epiteliales amnióticas humanas (hAECs) y las células estromales mesenquimales amnióticas humanas (hAMSCs).                           | (60) |
| <b>4.13.</b> Moléculas secretadas por las hAECs.                                                                                                                                                                   | (61) |
| <b>4.14.</b> Principales propiedades de la membrana amniótica humana (hAM) descritas hasta la fecha, con sus respectivos fundamentos.                                                                              | (69) |
| <b>4.15.</b> Esquema ilustrativo de los principales efectos antifibróticos del trasplante de células epiteliales amnióticas humanas (hAECs), observados en modelos preclínicos de fibrosis hepática.               | (73) |
| <b>4.16.</b> Esquema ilustrativo de los principales efectos antifibróticos del trasplante de células mesenquimales estromales amnióticas humanas (hAMSCs), observados en modelos preclínicos de fibrosis hepática. | (75) |
| <b>4.17.</b> Esquema ilustrativo de los principales efectos antifibróticos de la aplicación de fragmentos o parches de membrana amniótica humana (hAM), observados en modelos preclínicos de fibrosis hepática.    | (82) |

## ÍNDICE DE TABLAS

- 4.1.** Cambios en los componentes de la MEC del hígado, en fibrosis hepática moderada y severa. (31)
- 4.2.** Conjunto de estudios preclínicos que han recurrido al uso y trasplante de células amnióticas humanas y sus derivados para el tratamiento de fibrosis hepática en la última década. (76)
- 4.3.** Caracterización de los métodos más comunes de preservación de amnios humano a largo plazo, utilizados en ámbitos experimentales y clínicos. (79)
- 4.4.** Conjunto de estudios preclínicos que han recurrido a la aplicación de parches de membrana amniótica humana (hAM) para el tratamiento de fibrosis hepática en la última década. (83)

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

El hígado es la glándula más grande del cuerpo humano, llegando a pesar normalmente entre 1.400 y 1.600 gramos en un individuo adulto (1). Es un órgano fundamental para la vida, puesto que cumple la función de mantener la homeostasis corporal a través del metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, lípidos y vitaminas adquiridos en la alimentación, de la síntesis de proteínas séricas, y de la detoxificación y excreción de productos de desecho en la bilis (2).

Al estar involucrado en tantas funciones cruciales para el organismo, el hígado es vulnerable a una gran variedad de injurias metabólicas, toxicológicas, bacterianas, circulatorias y neoplásicas, conformando un grupo de enfermedades denominadas hepatopatías (1,3). Las hepatopatías crónicas son un problema de actualidad y un tema preocupante para la salud pública, debido a que causan más de 44.000 muertes en EEUU y casi 2 millones de muertes en todo el mundo cada año (4).

Independientemente de la etiología, ya sea por infección viral, alcoholismo, exceso de grasas, autoinmunidad, trastornos metabólicos o defectos congénitos, las hepatopatías crónicas comparten un elemento en común que se origina a partir de la respuesta inflamatoria, el cual consiste en un excesivo depósito de tejido cicatricial conformado por matriz extracelular (MEC), conocido como fibrosis hepática (5,6). Durante una injuria aguda, o de corta duración, la fibrosis es balanceada adecuadamente a través de mecanismos antifibróticos que permiten la resolución de la cicatriz, mientras que en una injuria crónica se produce un desbalance entre mecanismos antifibróticos y pro-fibrogénicos que genera depósitos de matriz extracelular en exceso, destruyendo la arquitectura del hígado, comprometiendo la función hepática y aumentando el riesgo de desarrollar cirrosis o, en el peor de los casos, carcinoma hepatocelular, el que causa aproximadamente 790.000 mil muertes alrededor del mundo (3,4).

Por su parte, la MEC corresponde al medio circundante que actúa como red de sustento e inclusión de células, participando además en procesos de comunicación, señalización y migración celular. Por lo tanto, la MEC tiene un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis hepática, ya que su comportamiento define la dinámica y evolución de esta condición (7).

Debido al carácter progresivo de la fibrosis hepática, resulta de suma urgencia encontrar alternativas terapéuticas. Si bien es sabido que el trasplante hepático es una estrategia muy eficiente, la poca cantidad de donadores sanos, disponibles y compatibles, más las mortales listas de espera, las tasas de rechazo al injerto y los altos costos quirúrgicos, representan un obstáculo de gran magnitud. Y según las estadísticas, las hepatopatías crónicas están entre las diez principales causas de muerte a nivel mundial (8), lo que empeora aún más el contexto para los pacientes.

La evidente falta de una terapia antifibrótica para la fibrosis hepática ha hecho que la investigación se enfoque en el uso de células madre, consideradas como un elemento muy prometedor en el área de Medicina regenerativa. Pese a que el hígado tiene la capacidad de regenerarse por sí mismo, cuando el daño va mucho más allá del reparo las consecuencias pueden ser fatales. Entonces, el uso de células madre surge como una buena alternativa para restaurar el hígado dañado (8).

La Medicina regenerativa se puede definir como un área interdisciplinaria que aplica principios y métodos de ingeniería, biología y medicina en el reemplazo o regeneración de células, tejidos u órganos humanos para restablecer la función normal. Y uno de sus principales enfoques metodológicos es la terapia basada en el uso de células madre (9).

Las células madre corresponden a células inmaduras, indiferenciadas, con la capacidad de autorrenovarse y la habilidad de generar diferentes tipos celulares. Existen principalmente células madre de tipo embrionarias, adultas y mesenquimales, las que se pueden encontrar en tejidos fetales, médula ósea y tejido adiposo, respectivamente (10). Muchos estudios han demostrado que diversos tipos de células madre son candidatas prometedoras para reemplazo y regeneración celular del hígado (8), particularmente las células de tejidos perinatales humanos, como la placenta y las membranas fetales. Estos tejidos se han convertido en una de las fuentes más atractivas debido a la falta de problemas éticos y a sus características inmunológicas beneficiosas, especialmente la membrana amniótica, ubicada en la zona más interna de la placenta (11).

Por muchos años, la membrana amniótica humana ha sido considerada como desecho médico junto a la placenta luego del parto, sin embargo, la situación cambió gracias al descubrimiento de sus propiedades y ventajas clínicas (11). Su uso como trasplante fue descrito por primera vez en el año 1910 en enfermedades de la piel, pero más tarde se

extendió al área de Oftalmología, donde ha sido hasta la actualidad un método efectivo para tratar daño epitelial en la superficie ocular (9,12,13). En cuanto al área de Dermatología, la membrana amniótica hoy en día es utilizada para tratar quemaduras, úlceras crónicas, epidermólisis, entre otras patologías (9). Estos hechos abrieron paso a la investigación de las propiedades de la membrana amniótica humana y sus células, entre los que se encuentran la baja inmunogenicidad y nulo rechazo del huésped, la promoción de epitelización, propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras, angiogénicas y antiangiogénicas, antifibróticas, antimicrobianas, antitumorales y la ausencia de problemas éticos (9,11–14). Gracias a estas características, la membrana amniótica humana se convirtió en un elemento ventajoso, prometedor y atractivo para los investigadores, especialmente para el tratamiento de fibrosis hepática en el área de Hepatología.

Por lo tanto, en la última década se han realizado diversos ensayos preclínicos para poner a prueba los efectos de la membrana amniótica humana y sus células en hígados con fibrosis, donde se han obtenido resultados alentadores que apoyan los efectos positivos de su aplicación terapéutica en el futuro (11,15). En este contexto, es de suma importancia recopilar la mayor cantidad posible de resultados, obtenidos en la última década, en cuanto al uso de membrana amniótica humana en modelos de fibrosis hepática y al comportamiento de la MEC del hígado fibrótico, durante el curso de la patología y bajo la aplicación de este tejido perinatal y sus células. Esto permitirá ampliar perspectivas, abrir puertas a nuevas investigaciones, resolver interrogantes y, en lo posible, avanzar hacia la realización de ensayos en pacientes, puesto que la polémica situación actual de las terapias antifibróticas lo amerita.

## **CAPÍTULO 2: OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Sintetizar la información disponible en la literatura científica sobre los fenómenos celulares y moleculares que ocurren en la matriz extracelular en un cuadro de fibrosis hepática, y además los efectos de la aplicación terapéutica de membrana amniótica humana.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Explicar las características de la fibrosis hepática como enfermedad, señalando con detención los mecanismos fisiopatológicos, celulares y moleculares involucrados.
- Describir las características de la matriz extracelular hepática, a fin de identificar los componentes cruciales que participan en la patogénesis de la fibrosis.
- Detallar las características de la membrana amniótica humana, a fin de identificar sus propiedades regenerativas.
- Analizar los efectos de la membrana amniótica humana al ser aplicada sobre modelos de fibrosis hepática.

## CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

Esta investigación constituye una revisión bibliográfica, cuya realización se basó en la búsqueda y recopilación de artículos científicos relacionados a la temática de estudio, utilizando los conceptos clave, en lenguaje natural, “*liver fibrosis*”, “*extracellular matrix*”, “*human amniotic membrane*” y “*regenerative medicine*” en seis bases de datos: Medline, Ebsco, Scopus, Cochrane, Scielo y LILACS, a través de búsqueda simple y búsqueda avanzada. Tanto para búsqueda simple como avanzada se emplearon combinaciones entre los conceptos clave junto al operador booleano *and*, sin embargo, para la búsqueda avanzada se añadieron además las opciones *title* y *title/abstract*. Finalmente, las combinaciones entre los conceptos clave, en lenguaje natural, para ambas búsquedas resultaron ser las siguientes: *liver fibrosis AND extracellular matrix*, *human amniotic membrane AND regenerative medicine* y *liver fibrosis AND human amniotic membrane*.

Como primer filtro, se aplicaron las opciones de texto completo, fecha de publicación desde el año 2010 al 2020 y los idiomas inglés y español. Como segundo filtro, se seleccionaron todos aquellos artículos relacionados con fibrosis hepática y eventos tanto celulares como moleculares que ocurren en la matriz extracelular del hígado en presencia de esta patología. También se seleccionaron artículos relacionados con las propiedades y beneficios de la membrana amniótica humana en medicina regenerativa, y con los efectos de la membrana amniótica humana en fibrosis hepática.

Dentro de este segundo filtro, se aplicaron además los siguientes criterios de inclusión:

- Artículos basados en estudios experimentales y revisiones de la literatura.
- Estudios hechos en modelos animales y, en caso de existir, también en tejidos humanos de cualquier rango etario.
- Estudios realizados en biopsias, necropsias (estudios *in situ*) y cultivos celulares (estudios *in vitro*).

Cabe mencionar que se excluyeron todos los artículos relacionados con fibrosis no hepática, con aplicación de membrana amniótica humana en otros tejidos y también aquellos con idiomas diferentes al inglés y español. A partir de estos filtros en las seis bases de datos

consultadas, se obtuvo un total de 622 artículos, cuya cantidad disminuyó a 344 con la eliminación de artículos duplicados.

Para llevar a cabo una selección de artículos más estructurada, los 344 artículos previamente seleccionados fueron sometidos a un sistema de tablas de análisis de título y resumen, cuya utilidad fue organizar y clasificar los artículos de modo que estos fuesen acordes a la metodología de búsqueda y a las temáticas principales. Se descartaron 99 artículos en base al análisis de su resumen, finalmente quedando la cantidad de 245 artículos. Además, para esta revisión se incorporó una tesis doctoral y extractos de 3 libros de Histología, 2 libros de Patología y 2 libros de Embriología, como complemento bibliográfico y respaldo teórico.

Finalmente, se obtuvo un total de 253 referencias para realizar la revisión y la posterior redacción de este proyecto, cuyo algoritmo de búsqueda se muestra a continuación en la figura 3.1.

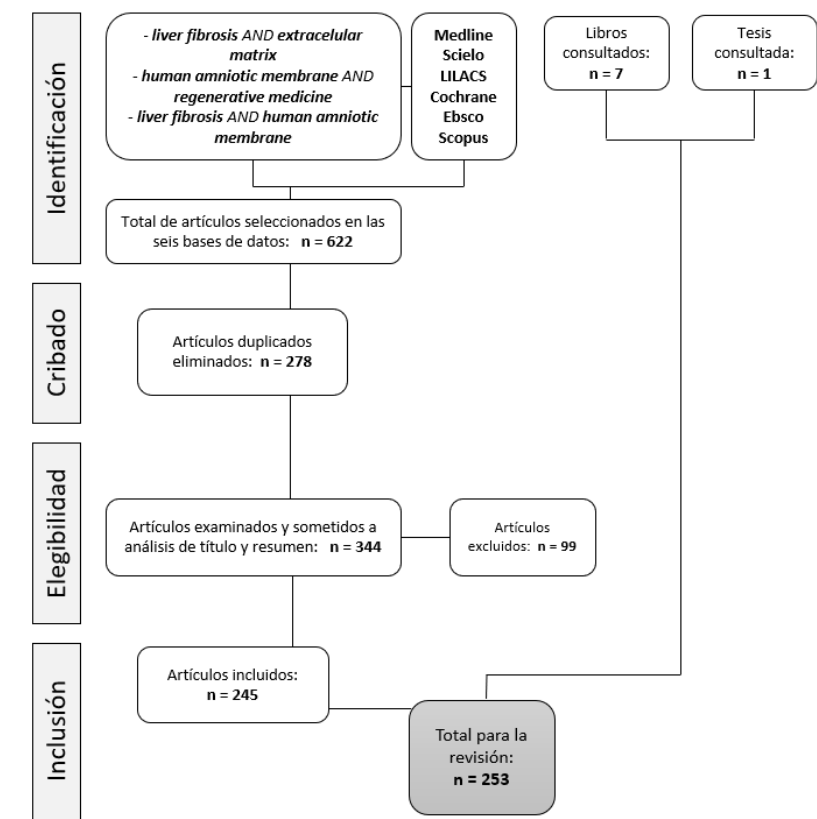


**FIGURA 3.1.** Algoritmo de búsqueda y selección de artículos. n: número de artículos.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

### 4.1. ESTRUCTURA DEL HÍGADO.

El hígado es el órgano glandular de mayor tamaño, con aproximadamente un 2,5% del peso corporal de un adulto, y se encuentra envuelto en una cápsula de tejido conectivo fibroso denominada cápsula de Glisson, la cual se continúa con el estroma de tejido conectivo hepático (16).

Internamente, el parénquima se encuentra organizado en lobulillos hepáticos, conformados a su vez por cordones o trabéculas de hepatocitos bien organizados, que normalmente tienen una sola célula de espesor, y que convergen en una vena centrolobulillar (16). Entre los cordones de hepatocitos, se encuentran los capilares sinusoidales conformados por células endoteliales, también llamados sinusoides hepáticos. Y, a su vez, entre los sinusoides y las filas de hepatocitos, se encuentra el espacio perisinusoidal o espacio de Disse, que contiene microvellosidades hepatocitarias, fibras reticulares, fibroblastos y células estrelladas hepáticas, también conocidas como células de Ito (Fig. 4.1) (16–18).

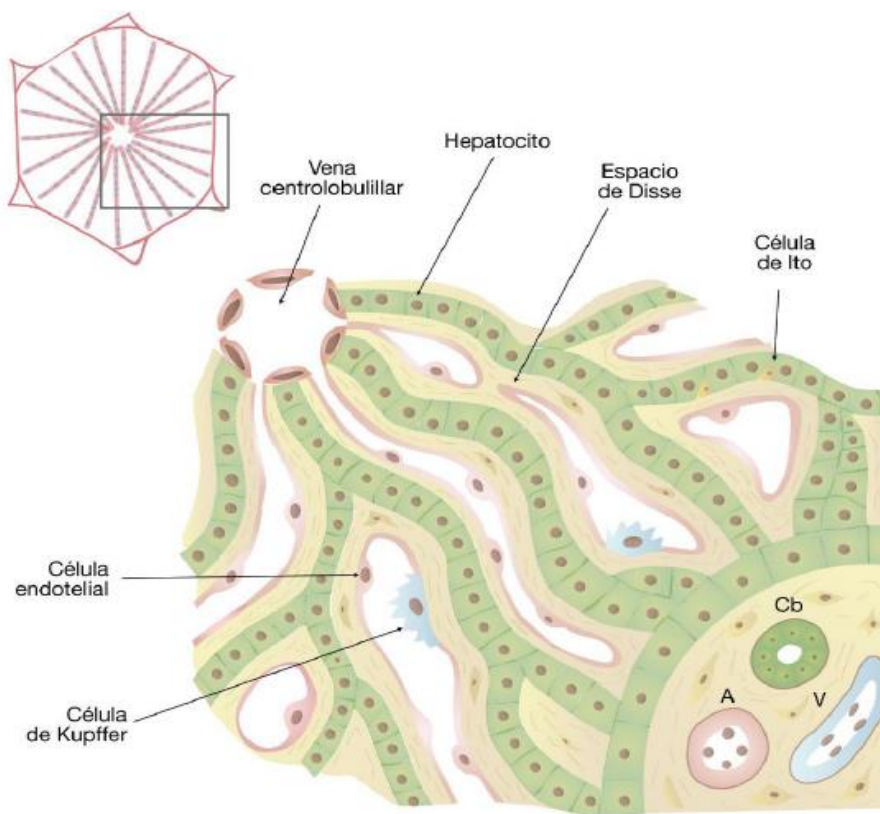


**FIGURA 4.1.** *Esquema de un sector del lobulillo hepático.* En él se observan cordones de hepatocitos convergiendo hacia la vena centrolobulillar y separados por los sinusoides hepáticos. Abajo a la derecha, se observa un espacio portal con sus elementos clásicos: conductillo biliar (Cb), arteriola hepática (A) y vénula porta hepática (V). Extraído y modificado de la referencia (18).

El flujo sanguíneo de los sinusoides hepáticos procede de las ramas terminales de la vena porta hepática y de la arteria hepática (17), las cuales circulan por el parénquima del hígado a través de una red de tejido conectivo que conforma a los denominados espacios portales (Fig. 4.2). Estos espacios también contienen conductillos biliares que llevan la bilis en sentido opuesto a la irrigación sanguínea (16,17). Al estar rodeados por los hepatocitos más periféricos del lobulillo hepático, los espacios portales actúan como límites de separación entre cada lobulillo. Además, en los bordes de cada espacio portal, entre el tejido conectivo del estroma y los hepatocitos, existe una pequeña zona llamada espacio periportal o espacio de Mall, en el cual se cree que se origina el líquido linfático del hígado (16).

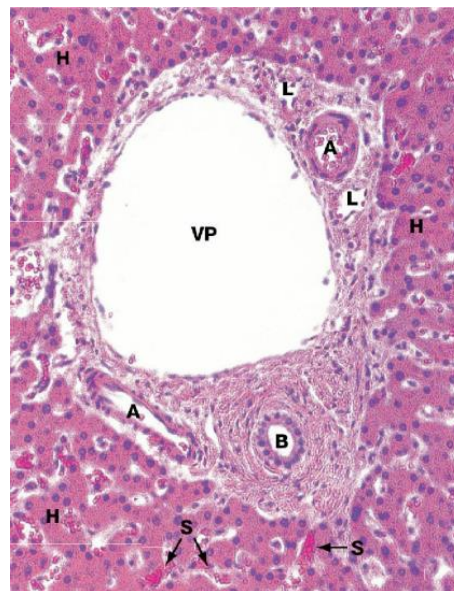


**FIGURA 4.2.** *Microfotografía de un espacio portal típico, con sus tres estructuras fundamentales.* (VP: vénula porta terminal; A: arteriola hepática y B: conductillo biliar).

También es posible visualizar pequeñas vías linfáticas (L), trabéculas de hepatocitos periféricos (H) y sinusoides hepáticos (S) entremedio. Tinción H-E. Extraído y modificado de la referencia (17).

En el hígado sano, la MEC se encuentra en muy pocas cantidades y en forma de tejido conectivo laxo, compuesto de sustancia amorfa, agua, iones, fibras de colágeno, fibras reticulares y fibras elásticas, y se concentra principalmente en los espacios portales y, en menor medida, en el espacio perisinusoidal de Disse (16).

Junto al espacio de Disse, se encuentran los sinusoides hepáticos revestidos por un endotelio discontinuo, es decir, con espacios libres entre las células que los componen, conocidas como células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC). Sin embargo, también forman parte de la pared del sinusoides las denominadas células de Kupffer, que actúan como macrófagos hepáticos y sin la necesidad de estar unidos a las LSECs (18).

Las células estrelladas hepáticas (HSC), por su lado, son células mesenquimales ubicadas en el espacio de Disse, cuyas microproyecciones citoplasmáticas abrazan a las células endoteliales de los sinusoides por un lado y, por el otro, se contactan con el cuerpo celular de los hepatocitos. A pesar de representar tan solo un 10% aproximado del total de células hepáticas, las HSC en estado quiescente, o de reposo, son capaces de almacenar hasta el 80% de la vitamina A corporal en forma de retinol, distribuida en gotas lipídicas citoplasmáticas y periféricas (16,17).

Si bien los hepatocitos son las principales células funcionales del hígado, las HSC ejercen un rol protagónico en el proceso de fibrogenesis hepática (16), el cual revisaremos en las siguientes secciones.

El árbol biliar del hígado, por otro lado, también es un componente estructural importante. Es un sistema tridimensional de conductos tapizados por células epiteliales llamadas colangiocitos, cuya forma cúbica se convierte en forma cilíndrica a medida que el diámetro de los conductos aumenta (16). Los canalículos biliares son las ramas más pequeñas del árbol biliar y se ubican alrededor de la superficie de los hepatocitos, cubriendo sus cuatro caras. Los hepatocitos vierten la bilis en ellos y ésta circula desde la región centrolobulillar hasta los espacios portales, donde los conductillos biliares finalmente la recolectan y la conducen por el resto de la vía biliar hasta la vesícula (16).

Cerca del espacio portal, pero todavía dentro del lobulillo hepático, los canalículos biliares se transforman en canales de Hering, cuyo revestimiento se conforma por hepatocitos y colangiocitos. Además de poseer una actividad contráctil que contribuye al paso de la bilis hacia el espacio portal, los canales de Hering actúan como un reservorio de células

progenitoras hepáticas. Lo anterior se corroboró con la aparición de precursores de células hepáticas en esta zona, durante el transcurso de injurias caracterizadas por daños importantes en los hepatocitos (16–18).

## **4.2. FIBROSIS HEPÁTICA: PATOGENIA Y PRINCIPALES ASPECTOS.**

La fibrosis hepática se puede definir como un proceso biológico dinámico coordinado por diversas acciones celulares y cascadas moleculares, que consiste en la acumulación de componentes de MEC en el espacio de Disse y en los tractos portales ubicados en la periferia de los lobulillos hepáticos (3,19). Esta acumulación ocurre de manera excesiva y genera tejido cicatricial que distorsiona la arquitectura hepática, debido a la pérdida del equilibrio existente entre mecanismos profibrogénicos y antifibróticos propios de un hígado sano (19).

### **4.2.1. Injuria crónica: inflamación y microambiente pre-fibrótico.**

El hígado es el sitio de activación de respuestas inmunes, donde diversas toxinas, como alcohol, grasas y productos bacterianos, son absorbidos desde el intestino y transportados a través de la vena porta (20). Esta ubicación estratégica entre el tracto intestinal permite que el hígado, particularmente los sinusoides hepáticos, actúen como barrera bioquímica crítica ante un estímulo (21). Las células de Kupffer, las HSC y las LSEC están en contacto con la circulación portal y son capaces de detectar cualquier estímulo inflamatorio y producir citoquinas y quimioquinas inflamatorias, de este modo reclutando a otras células inflamatorias desde la circulación sistémica. Estas interacciones celulares amplifican la respuesta inflamatoria hacia el parénquima hepático, causando la muerte de los hepatocitos en caso de un estímulo persistente (20).

La muerte hepatocitaria es el evento inicial de todas las diversas etiologías de enfermedades hepáticas (3). Si bien la apoptosis es el mecanismo de muerte celular más común, también pueden ocurrir necrosis y necroptosis, un tipo de necrosis regulada y controlada, de acuerdo al tipo de injuria (22).

Cada hepatopatía crónica, ya sea hepatitis por virus de hepatitis C (HCV) o virus de hepatitis B (HBV), enfermedad hepática alcohólica, hepatopatía autoinmune, hepatopatía grasa no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que son las más frecuentes, representa a un tipo de injuria en particular que conlleva a una respuesta inflamatoria con un amplio panel de señales moleculares que activan el fenotipo fibrogénico de las HSC (Fig. 4.3) (6,23,24).

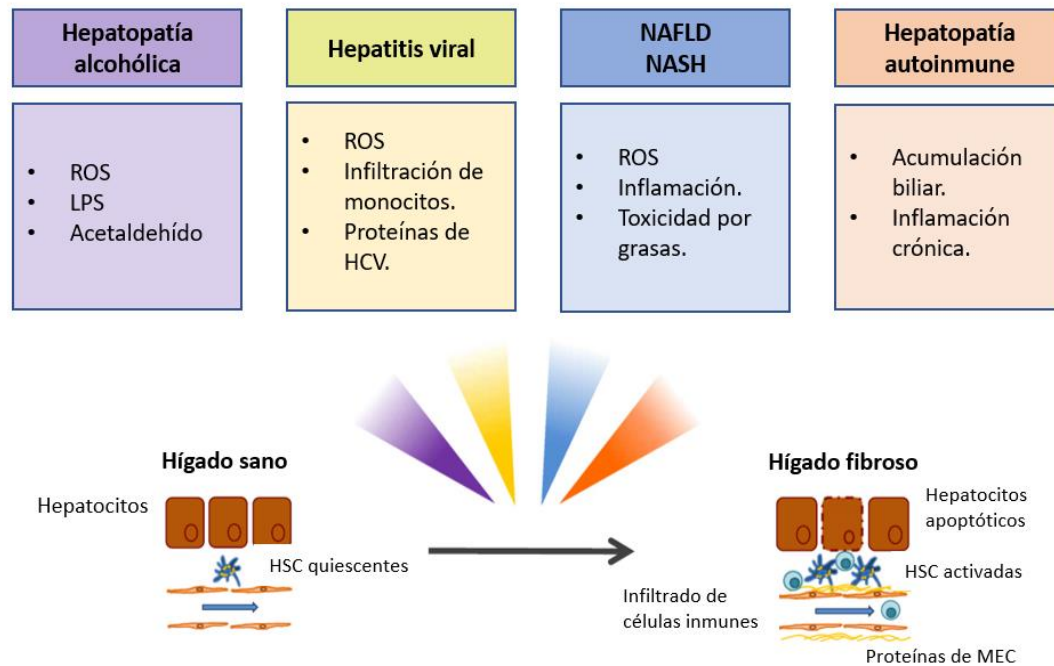


**FIGURA 4.3.** Esquema de las diversas etiologías gatillantes de fibrosis hepática. ROS: especies reactivas de oxígeno; LPS: lipopolisacáridos; HCV: virus de hepatitis C; NAFLD: hepatopatía grasa no alcohólica; NASH: esteatohepatitis no alcohólica. Extraído y modificado de la referencia (24).

HBV y HCV son virus que no producen la muerte en células infectadas, sin embargo la injuria hepática es producida y mediada por el mismo sistema inmune del huésped tratando de eliminar el virus, causando infección e inflamación crónicas. Algunas proteínas no estructurales del HCV, como NS3 y NS5, son capaces de estimular la activación de las propiedades proinflamatorias y profibrogénicas de las HSC, contribuyendo directamente al desarrollo de fibrosis (25). Por otro lado, casi un 90% del alcohol ingerido es metabolizado

en el citosol de los hepatocitos, donde es oxidado a acetaldehído, una toxina que produce daño hepatocelular directo mediante apoptosis de los hepatocitos. El acetaldehído también es capaz de estimular directamente la activación de las HSC e inducir las a producir colágeno tipo I (26,27).

En hepatopatías grasas, como NAFLD y NASH, el exceso de ácidos grasos libres provoca la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), estrés oxidativo y la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , actuando como factores críticos para el desarrollo de fibrosis (24). Además de los lípidos, otro factor relevante en injurias hepáticas crónicas es el hierro, cuya sobrecarga afecta a hepatocitos y células de Kupffer, conduciéndoles a producir ROS y mediadores profibrogénicos que activan a las HSC (28).

Estas formas de daño hepatocelular convergen en la muerte de los hepatocitos, generando la liberación de fragmentos celulares y cuerpos apoptóticos que actúan como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que activan a las células de Kupffer y, a su vez, reclutan macrófagos derivados de monocitos (3,6,22). Los monocitos actúan como primeros emisores de señales inflamatorias, así que su infiltración en el hígado es otro detonante clave en la inflamación hepática crónica (29). Otras células infiltrantes relevantes son los linfocitos T, reclutados desde la circulación sanguínea por quimioquinas y citoquinas como la IL-33, la cual es clave para la activación de células linfoides innatas del hígado, las que, a su vez, producen IL-13 para la pronta activación de las HSC (3,30). Otras células T críticamente involucradas son las células Th9 y las células Th17, caracterizadas por la producción de las citoquinas profibróticas IL-9 e IL-17, respectivamente (31).

Si bien la inflamación crónica comienza con el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, prácticamente todas las células inmunes están involucradas en el proceso, incluyendo células T reguladoras (Treg), linfocitos B, eosinófilos y basófilos, las que junto a las células hepáticas residentes liberan un amplio rango de citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento, tales como TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  (32,33).

Otro evento importante en las injurias hepáticas crónicas corresponde al estrés oxidativo, un estado de desbalance entre moléculas prooxidantes y antioxidantes causado por el exceso de ROS, también llamados radicales libres (34). La abundancia de ROS induce apoptosis y necrosis de hepatocitos por disfunción mitocondrial, y también estimula la

producción de mediadores fibrogénicos por parte de las células de Kupffer (35–38). Una fuente de ROS es el complejo enzimático NADPH oxidasa (NOX), el cual cataliza reacciones desde el oxígeno molecular hasta la producción de radicales libres. En el hígado se ha reportado la expresión de varias isoformas de NOX, tales como NOX1, NOX2 y NOX4, particularmente en células de Kupffer, HSC, hepatocitos y leucocitos infiltrantes, las cuales favorecen el estrés oxidativo hepático (39–41).

Otro componente significativo es el inflamasoma NLRP3, un elemento del sistema inmune innato (42). El inflamasoma NLRP3 es un complejo multiproteico enzimático intracelular expresado por las células hepáticas y que responde a señales de daño celular, como DAMPs, PAMPs y ROS, desencadenando una nueva forma de muerte celular programada, llamada piroptosis (41). La piroptosis genera liberación del contenido citoplasmático, el cual se compone de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18, de este modo propagando la señalización desde el inflamasoma hacia las células hepáticas adyacentes (41,42).

Independientemente de la etiología, la injuria hepática y el proceso inflamatorio son escenarios complejos, compuestos por eventos celulares y moleculares que generan un microambiente tisular adecuado para el suceso más importante de la fibrosis hepática: la producción de componentes de la MEC por parte de las HSC activadas.

#### **4.2.2. Reparación hepática: ¿Regeneración o fibrosis?**

Si bien la respuesta reparativa es una característica intrínseca del hígado, es necesario mencionar hasta qué punto esta se considera normal, debido a que en muchas hepatopatías crónicas la línea de diferencia entre lo fisiológico y patológico es muy delgada (3). En ausencia de injuria, el epitelio hepático es mantenido mediante un lento intercambio de hepatocitos y/o colangiocitos dentro de sus propios compartimentos. En cambio, cuando existe alguna injuria, el epitelio se restablece a través de regeneración del tejido remanente (19).

La regeneración hepática es el proceso por el cual el hígado es capaz de restituir tanto arquitectura como función tisular normal y sin dejar una cicatriz, a través de una respuesta molecular y celular transitoria cuya resolución es vital para el restablecimiento de la homeostasis hepática (19,43). Este proceso es conducido por proliferación celular epitelial,

incluyendo hepatocitos y células progenitoras hepáticas (HPC), y es altamente controlado y regulado por una compleja red de señalizaciones entre dichas células epiteliales y las demás células no parenquimatosas, como células de Kupffer y HSC (43). Cuando los hepatocitos remanentes no son suficientes ni tampoco capaces de replicarse, se activa el nicho que contiene a las HPC como un mecanismo auxiliar para la regeneración de masa hepática funcional (44). Las HPC son células de carácter bipotencial, con la capacidad de diferenciarse hacia líneas celulares biliares o hepatocitarias, dependiendo del proceso de injuria, y están ubicadas en los canales de Hering. Por lo tanto, estos canales se activan cuando se necesitan células maduras (44).

Otro evento celular importante y paralelo al proceso de regeneración hepática es la reacción ductal, la cual consiste en la proliferación de los colangiocitos que tapizan los canalículos biliares del hígado. Esta reacción comparte el mismo nicho que las HPC, en el cual también existe producción de MEC para otorgar soporte y un microambiente tisular adecuado mientras dure el proceso regenerativo (45). La producción de componentes de MEC recae en las HSC, las que se activan gracias a mediadores inflamatorios y fibrogénicos que se liberan tras la injuria (19).

Para finalizar el proceso de regeneración, los macrófagos hepáticos adquieren un fenotipo antifibrótico y secretan metaloproteinasas de matriz (MMPs) que degradan el exceso de componentes de MEC, para la resolución del tejido cicatricial (19). También participan células “natural killers” (NK), particularmente en la eliminación de las HSC activadas (46). En el proceso regenerativo normal, la activación temprana de las HSC produce un aumento de ácido retinoico y de RAE-1, un ligando que activa los receptores de las células NK y permite su interacción con las HSC, ejerciendo el efecto citotóxico sobre ellas y eliminándolas. Estos mecanismos son clave para mantener controlada la producción de MEC y la presencia de las HSC activadas una vez que ya se ha regenerado el área hepática afectada (46).

Ahora bien, ante una injuria crónica y con respuesta inflamatoria persistente, el microambiente tisular presenta elevados niveles de citoquinas inflamatorias y fibrogénicas, como TGF- $\beta$ , considerada la citoquina fibrótica más potente. Estos niveles son tan elevados que suprimen la función antifibrótica de las células NK contra las HSC activadas, inclinando la balanza a favor del desarrollo de fibrosis hepática (19,46).

Finalmente, tanto regeneración como fibrosis hepática comparten cascadas de eventos en común inducidos por una injuria y que bifurcan como resultado del daño crónico (19). Sin embargo, la naturaleza de este daño será un factor clave para la definición del destino del proceso reparativo del hígado.

#### **4.2.3. Depósito de matriz extracelular (MEC).**

Con el establecimiento de una injuria crónica, más la consecuente alteración en los mecanismos reparativos, comienza el proceso de fibrogénesis hepática, cuyas células protagonistas son las HSC activadas, en respuesta a mediadores derivados de hepatocitos dañados, como las citoquinas inflamatorias TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$  (47).

El espacio de Disse, donde se ubican las HSC, contiene una MEC similar a membrana basal de baja densidad con colágeno tipo IV y laminina, que es crucial para mantener la función diferenciada de los hepatocitos, y también lo suficientemente porosa como para permitir el intercambio metabólico entre el flujo sanguíneo y los hepatocitos del parénquima (Fig. 4.4) (21,48).

La MEC es un microambiente complejo, dinámico y constituido por una red de moléculas altamente organizada, incluyendo agua, proteínas, proteoglicanos y glicoproteínas, que permite el anclaje celular y otorga integridad funcional y estructural a los tejidos. Posee un balance precisamente regulado entre su síntesis y degradación, para brindar la homeostasis tisular necesaria. Sin embargo, durante una injuria hepática crónica, la producción de MEC excede a su degradación y se desarrolla fibrosis hepática como resultado de un progresivo depósito de componentes matriciales. Estos mismos cambios en la composición de la MEC, a su vez, estimularán directamente el proceso de fibrogénesis (48,49), ilustrado en la figura 4.4.

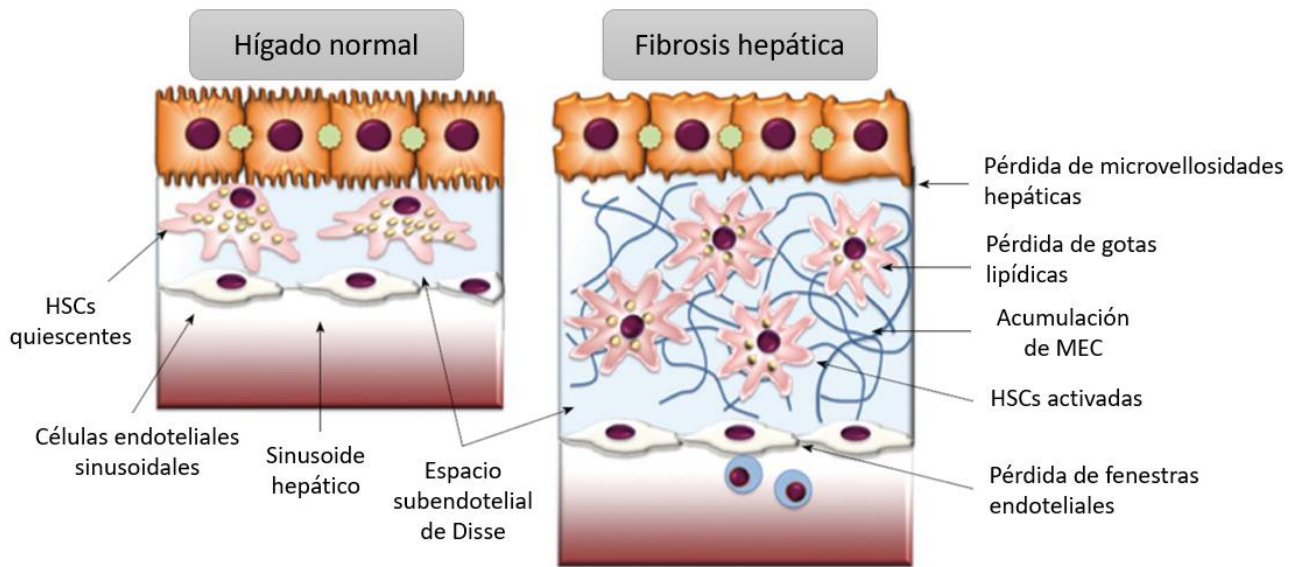


**FIGURA 4.4.** *Proceso de fibrogénesis hepática.* La activación de las HSC, y posterior acumulación de MEC, conduce a la pérdida de microvellosidades hepáticas y a la desaparición de las fenestras endoteliales, la cual se detalla en las próximas secciones. Estos cambios en la arquitectura hepática distorsionan el transporte de solutos entre los sinusoides y los hepatocitos, contribuyendo a la injuria celular hepática. MEC: matriz extracelular; HSCs: células estrelladas hepáticas. Extraída y modificada de la referencia (23).

#### 4.2.3.1. *Dinámica y características de la MEC hepática.*

Normalmente, la MEC hepática conforma menos del 3% en una sección de tejido y aproximadamente el 0,5% del peso del hígado. Se puede encontrar en la cápsula hepática, tractos portales, venas centrales y en el espacio perisinusoidal de Disse (48). Gracias a estudios previos de proteómica en hígado humano descellularizado, se han podido identificar más de 150 distintas proteínas de MEC que conforman el denominado matrisoma hepático sano. Entre ellas se pueden encontrar principalmente una gran variedad de colágenos (colágenos fibrilares, transmembrana, formadores de redes y asociados a fibras), glicoproteínas (fibrinógeno y fibronectina), proteoglicanos (biglycan, decorina, lumican y versican), proteínas asociadas a la formación de fibras elásticas, elastina, proteínas matricelulares (periostina y tenascina), entre otras (21,50).

Además de actuar como soporte estructural, la MEC también imparte propiedades mecano-elásticas y ofrece señales al microambiente que influyen función, proliferación, supervivencia, forma, migración y diferenciación celular, así modulando homeostasis, remodelación y regeneración tisular (50). La MEC juega un papel vital en el funcionamiento de las HPC a través de la presentación de señales de factores proliferativos y del depósito de un sustrato que permita su migración y diferenciación, para el proceso de repoblación hepática normal (51). En efecto, la correcta interacción entre los aspectos bioquímico y biomecánico de la MEC es un factor crucial para las HPC, debido a que esta interacción es la que finalmente define si el proceso reparativo del hígado es fisiológico o patológico (52).

La MEC puede controlar el fenotipo de las células a través de interacciones célula-MEC. Las células, a su vez, son capaces de unirse a los componentes de la MEC mediante receptores de superficie celular específicos, llamados integrinas, o mediante proteínas tales como cadherinas y selectinas (53). La adhesión intercelular mediada por integrinas es uno de los principales determinantes del comportamiento celular, puesto que actúan como mecano-receptores que detectan señales mecánicas desde la MEC y las convierten en señales intercelulares. En efecto, durante la fibrosis hepática ocurren cambios en los niveles de expresión de integrinas, encontrándose cantidades aberrantes de ellas. Esto indica que las integrinas se correlacionan positivamente con la actividad fibrogénica de la MEC, influyendo activamente en las interacciones célula-célula y célula-MEC del hígado (54). Entonces, este conjunto de componentes extracelulares, también conocido como matrisoma, trabaja bidireccionalmente con las células circundantes para crear un microambiente dinámico capaz de responder a estímulos. Si bien el matrisoma hepático puede modificarse durante una injuria aguda, éste se restaura una vez que el daño acaba. No así ante una injuria crónica, en la que el matrisoma transicional es progresivamente reemplazado por una cicatriz densa (21).

La MEC también actúa como un gran reservorio de moléculas señalizadoras, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas, y es capaz de regular el acceso de receptores a sus respectivos ligandos, modular la distribución espacial de factores de crecimiento, crear gradientes quimiotácticos y secuestrar moléculas señalizadoras mediante interacciones con glicosaminoglicanos (GAGs), hasta que sea necesaria su liberación (21,55).

La fibrosis en sí altera la estructura de la MEC y provoca la liberación de fragmentos señalizadores que son determinantes en el proceso fibrogénico. El componente más prominente de la MEC es el colágeno, cuyos fragmentos han demostrado tener importantes propiedades señalizadoras en diferenciación, migración y función celular. Con la remodelación de la MEC hay un aumento en la actividad proteolítica que produce la liberación de fragmentos bioactivos a partir de algunos tipos de colágeno localizados en la membrana basal del espacio de Disse, como por ejemplo el colágeno tipo XVIII, cuyo fragmento liberado es la endostatina, un péptido de potente señalización que puede interactuar con receptores de superficie celular. Algo similar ocurre con el colágeno tipo IV, cuyo fragmento bioactivo es la endotropina, que ha demostrado estimular la fibrosis regulando positivamente la expresión de otros constituyentes de la MEC (56,57).

La MEC influye notablemente el comportamiento y función de las células hepáticas. Los cambios cualitativos y cuantitativos que sufre la MEC durante la fibrogénesis conducen a la rigidez de la matriz, cuyas fuerzas mecánicas se transmiten a las células a través de mecano-transducción. Los hepatocitos, HSC, fibroblastos portales y LSEC son las principales células hepáticas detectoras de fuerzas provenientes de la MEC (58,59).

Respecto a su contenido durante el progreso de la fibrosis, se ha observado que la MEC hepática es capaz de aumentar su contenido hasta 7 veces más de lo normal. El proceso comienza en el espacio de Disse, donde la matriz similar a membrana basal compuesta de colágenos tipo IV y VI es reemplazada por una matriz más densa, conformada por colágenos fibrilares tipo I y III y fibronectina (60–62). El colágeno tipo IV, por su parte, se deposita progresivamente en la periferia de los sinusoides, tapizando a las LSEC y provocando un proceso denominado capilarización de los sinusoides, el que será visto en las próximas secciones. También aumenta el colágeno tipo V, el cual participa en el ensamblaje de los colágenos tipo I y III (61).

Otro componente importante de la MEC que también se ve afectado es la elastina, una proteína amorfa altamente resistente que conforma el núcleo de las fibras elásticas (63). La elastina forma fuertes complejos fibrilares y es activamente sintetizada por fibroblastos portales y HSC activadas durante el proceso de fibrogénesis, al igual que las fibras de colágeno tipo I y III. La elastina se acumula principalmente en los tabiques fibróticos internodulares y en los espacios portales, además de encontrarse entrelazada al colágeno tipo

I en etapas tardías de la fibrosis hepática. En efecto, la síntesis y el depósito abundante de elastina se observa comúnmente en la etapa de cirrosis hepática, otorgando mayor rigidez y resistencia a la degradación proteolítica (64).

Otro tipo de fibras relevantes que también se ven afectadas son las fibras reticulares, compuestas de colágeno tipo III asociado a colágeno tipo V, las cuales participan en demarcación y soporte de los hepatocitos. Con el proceso de fibrogénesis, se produce un colapso de la red reticular de los sinusoides hepáticos debido a degradación enzimática, afectando directamente el principal andamio de los hepatocitos (65).

Si bien las fibras son los principales elementos de la MEC, no son las únicas que aumentan durante la fibrosis. También lo hacen las proteínas matricelulares, como periostina, fibulina, agrecan, tenascina y decorina, las cuales son expresadas y secretadas dinámicamente hacia el ambiente extracelular, pero sin contribuir directamente a la principal estructura fibrilar de la MEC (57). Además de las proteínas matricelulares, también se ven afectados los proteoglicanos, cuya composición consiste en una proteína central unida covalentemente a una o más cadenas de GAGs (66). Por ejemplo, algunos proteoglicanos que muestran un aumento de cantidad son el perlecan, versican y lumican, siendo éste último un importante contribuyente a la mantención y estabilidad de las fibras de colágeno (67–69). También, se ve involucrada una glicoproteína conocida como proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa (COMP), la cual es producida por hepatocitos y ha demostrado contribución en la acumulación patológica de colágeno tipo I (70). Y con respecto a los GAGs, se ha demostrado que el dermatán sulfato y el heparán sulfato aumentan en grandes cantidades durante la fibrosis hepática (71).

La MEC hepática tiene un compartimento muy heterogéneo. Si bien todos sus componentes aumentan, a excepción de la reticulina que es degradada, cada uno tiene su propia bioactividad durante el curso de la fibrosis hepática y de acuerdo a las modificaciones de la MEC a medida que la enfermedad progresa (72). Estos cambios estructurales se muestran de forma generalizada y estimada en la Tabla 4.1, en base a la literatura reciente.

Independientemente de la etiología de la hepatopatía crónica, la MEC hepática representa un agente dinámico y partícipe del proceso de fibrogénesis, proporcionando señales moleculares e interactuando bidireccionalmente con las células hepáticas circundantes.

**TABLA 4.1.** *Cambios en los componentes de la MEC del hígado, en fibrosis hepática moderada y severa. Elaborada y modificada a partir de la referencia (57).*

| Componente de la MEC       |                   | Etapa de fibrosis hepática |                    |
|----------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------|
|                            |                   | Moderada                   | Severa a cirrótica |
| Fibrilar                   | Colágeno tipo I   | ++                         | +++                |
|                            | Colágeno tipo III | ++                         | ++                 |
|                            | Colágeno tipo V   | +                          | +++                |
|                            | Elastina          | +                          | ++                 |
|                            | Reticulina        | ++                         | -                  |
| No fibrilar                | Colágeno tipo IV  | +                          | ++                 |
| Glicoproteína              | Fibronectina      | +                          | ++                 |
| Proteoglicanos             | Perlecan          | +                          | ++                 |
|                            | Versican          | +                          | ++                 |
|                            | Lumican           | +                          | ++                 |
| Proteínas matricelulares   | Periostina        | +                          | ++                 |
|                            | Fibulina          | +                          | +++                |
|                            | Agrecan           | +                          | ++                 |
|                            | Tenascina         | +                          | ++                 |
|                            | Decorina          | +                          | ++                 |
| Glicosaminoglicanos (GAGs) | Dermatán sulfato  | +                          | ++                 |
|                            | Heparán sulfato   | +                          | ++                 |

#### 4.2.3.2. *Células productoras de MEC.*

Si bien las HSC activadas tienen un papel protagónico en el depósito de MEC, estas células no son las únicas participantes en el proceso fibrogénico. De hecho, las HSC activadas son parte de una población celular heterogénea encargada de producir componentes de la MEC, a la cual se les conoce como miofibroblastos hepáticos (73). Encontrándose ausentes en el hígado normal, estos miofibroblastos se caracterizan por tener forma estrellada o ahusada, por ser altamente contráctiles, proliferativos, migratorios y, además, por expresar

tanto matriz pericelular como genes fibróticos en forma abundante, tras un proceso de activación o transdiferenciación celular (74–76).

Los miofibroblastos hepáticos persistentemente activados actúan como células de interconexión capaces de integrar señales paracrinas y autocrinas que provienen desde el ambiente profibrogénico, como ROS, factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, adipoquinas y mediadores angiogénicos, producidos por células hepáticas y células inmunes infiltrantes involucradas en la progresión de la hepatopatía crónica (74).

En el hígado, existen dos potenciales fuentes de origen de miofibroblastos: células intrahepáticas y células extrahepáticas (77). La fuente intrahepática está dada principalmente por HSC y fibroblastos portales, aunque también se ha propuesto que los hepatocitos y colangiocitos de los ductos biliares experimentan un fenómeno de transición epitelio - mesénquima (EMT) que les otorga un fenotipo miofibroblástico (77–79).

Las HSC son células mesenquimales con largas prolongaciones citoplasmáticas que perciben señales quimiotácticas y generan fuerzas contráctiles que se expanden por el microambiente, partiendo por su lugar de residencia en el espacio de Disse, de este modo influenciando el comportamiento de las otras células hepáticas circundantes, como células de Kupffer y hepatocitos (80–85). Por lo tanto, al encontrarse en un espacio expuesto a presión microvascular proveniente de los sinusoides hepáticos y a la tensión mecánica ejercida por el contenido de la MEC, las HSC son propensas a sufrir cambios en su comportamiento celular, siendo el más importante de ellos la transdiferenciación a miofibroblastos en presencia de estímulos inflamatorios crónicos, cuya característica más distintiva es la inhibición del metabolismo de retinol (vitamina A) y la consiguiente pérdida de gotas lipídicas (86–88).

La transdiferenciación o activación de las HSC se puede definir como un proceso de transición hacia el fenotipo miofibroblástico que implica cambios morfológicos, secretores y metabólicos, además de la expresión de  $\alpha$ -SMA, colágenos tipo I y III, y de receptores para factores mitogénicos, quimiotácticos y fibrogénicos (89). Durante este proceso de activación, las HSC experimentan una sofisticada reprogramación genética y metabólica que es esencial para adquirir y mantener una rápida proliferación celular (90). Así, las HSC requieren un aumento de glicólisis para transdiferenciarse a miofibroblastos, ya que el proceso implica una alta necesidad energética (90,91). Otro evento metabólico involucrado en la activación

de las HSC es la autofagia, un proceso de degradación y reciclaje de elementos celulares, y a través del cual las HSC obtienen energía gracias a la auto-degradación de sus gotas lipídicas con contenido de vitamina A, retinoides y ácidos grasos (92–94).

En el proceso de activación o transdiferenciación de las HSC se pueden distinguir dos fases consecutivas, denominadas iniciación y perpetuación (95).

La fase de iniciación corresponde al conjunto de cambios primarios experimentados por las HSC, caracterizados por una reprogramación génica y metabólica en respuesta a la estimulación paracrina proveniente de señales proinflamatorias y profibrogénicas del microambiente y de las células hepáticas circundantes, conduciendo hacia un fenotipo celular miofibroblástico transitorio, potencialmente reversible (95,96). Ahora bien, ante una persistente exposición a estímulos paracrinicos, este fenotipo “activado” es inducido a seguir respondiendo a los factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias del microambiente, de este modo sosteniendo las respuestas profibrogénicas operadas por el fenotipo miofibroblástico (95). Esta etapa corresponde a la fase de perpetuación, la cual incluye señales de supervivencia y retención del fenotipo activado de las HSC mientras el estímulo dañino continúe. En esta fase, las HSC activadas también son capaces de ejercer efectos autocrinos, secretando mediadores, citoquinas y quimioquinas que estimulan su fenotipo fibrogénico (95,96).

Se ha establecido que la fase de perpetuación incluye siete principales cambios en el comportamiento de las HSC ya transdiferenciadas hacia miofibroblastos, y que sostienen el proceso de fibrosis hepática (97): 1) Proliferación, gatillada por el aumento de mediadores mitogénicos, como PDGF, VEGF y trombina. 2) Migración, mediada por quimioquinas que conducen a las HSC activadas al sitio de lesión. 3) Pérdida de retinoides, el cambio más distintivo de las HSC activadas, el cual gatilla un cambio morfológico por modificación del citoesqueleto. 4) Contractilidad, caracterizada por un aumento de filamentos contráctiles, incluyendo  $\alpha$ -SMA y miosina. 5) Liberación de citoquinas y factores solubles, cuyo aumento permite la sostenibilidad del proceso fibrogénico. 6) Remodelación de la MEC, por el aumento de la producción de MMPs que degradan componentes colágenos y no colágenos, incitando al elevado recambio de matriz durante el proceso fibrogénico. Y, 7) Fibrogénesis, evento en el cual las HSC activadas producen componentes de la MEC en cantidades abundantes, principalmente colágenos fibrilares de tipo I y III y elastina, gracias a la potente

acción fibrogénica de TGF- $\beta$  derivado de fuentes paracrinas (23,97–99). Estos eventos se ilustran a continuación, en la Figura 4.5.

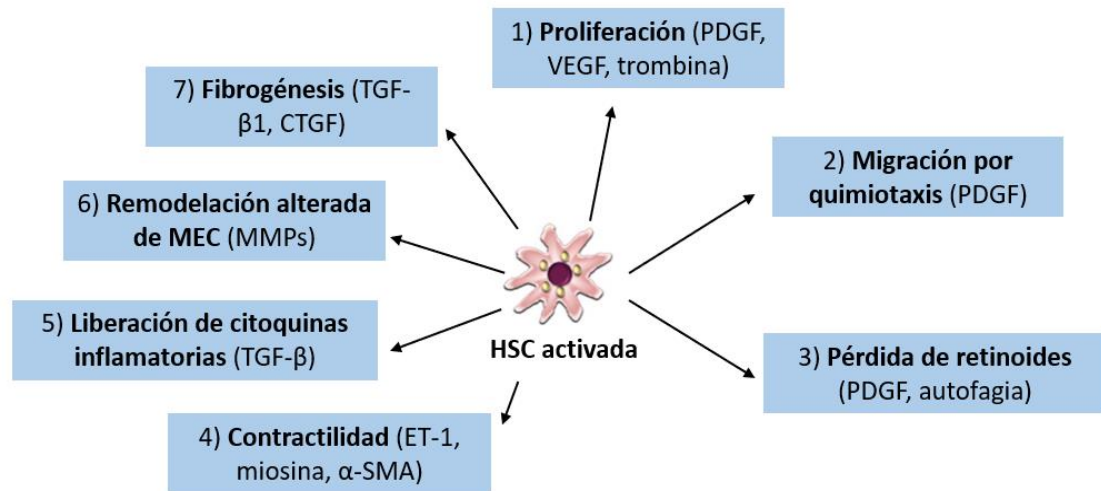


**FIGURA 4.5.** Características principales de las HSC activadas/miofibroblastos, con sus principales mediadores moleculares. PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; ET-1: endotelina-1;  $\alpha$ -SMA: actina de músculo liso-alfa; TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante-beta; MMPs: metaloproteinasas de matriz; CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo. Elaborado en base a la referencia (23).

Las HSC y su fenotipo miofibroblástico son complejos. Una característica importante de estas células es la producción de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), en particular TIMP-1, el cual impide la degradación de componentes de la MEC y a su vez protege, a las HSC activadas de la apoptosis, permitiendo que la fibrosis hepática progrese (99). También, se descubrió que la proteína  $\alpha$ -SMA presente en las HSC activadas no solo está vinculada a su contractilidad celular, sino que también transmite señales mecánicas al núcleo para regular la expresión de genes de componentes de la MEC, como el colágeno tipo I, de esta forma sugiriendo un enlace molecular entre  $\alpha$ -SMA y las cascadas de señalizaciones fibrogénicas (100). Incluso, las HSC activadas producen vesículas extracelulares con

propiedades profibrogénicas, cuyo cargamento de proteínas, mRNAs, microRNAs y mediadores fibrogénicos promueve el fenotipo celular miofibroblástico (101).

Otra fuente intrahepática de miofibroblastos son los fibroblastos portales, ubicados en el tejido conectivo que rodea los espacios portales del hígado (78). Estas células normalmente participan en el recambio fisiológico de MEC, sin embargo, también experimentan un proceso de “activación” hacia un fenotipo miofibroblástico, en el que exhiben alta capacidad proliferativa, expresión de  $\alpha$ -SMA, de colágeno tipo I y fibronectina (102).

Además de las HSC y fibroblastos portales, recientemente se ha propuesto una posible tercera fuente intrahepática de miofibroblastos constituida por hepatocitos y colangiocitos, en la que estas células experimentan una transición epitelial-mesenquimal (EMT) hacia un fenotipo miofibroblástico, con la adquisición de funciones propias de células mesenquimales, como la producción de componentes de la MEC (103–107). La EMT puede ser eventualmente inducida por TGF- $\beta$ , una potente citoquina fibrogénica que se encuentra en el microambiente tisular hepático (105). Sin embargo, existen estudios que contradicen la existencia de la EMT en fibrosis hepática, por lo que se necesitan más estudios para resolver estos cuestionamientos (107,108).

Con respecto a las fuentes de miofibroblastos extrahepáticas, se ha establecido un papel potencial para algunas células derivadas de médula ósea, particularmente fibrocitos y células madre mesenquimales (109,110). La citoquina TGF- $\beta$  induce el rápido reclutamiento de células de médula ósea hacia el hígado dañado, donde proliferan y se diferencian hacia miofibroblastos productores de colágeno tipo I, conformando aproximadamente un 5% del total de células fibrogénicas hepáticas (110).

Los miofibroblastos hepáticos son una población bastante diversa, aunque con un objetivo en común. Su principal fuente de origen radica en las HSC, las que una vez diferenciadas hacia miofibroblastos producen la mayor parte del colágeno del tejido fibroso, junto a otros componentes de la MEC (111). Y en segundo lugar, se encuentran los fibroblastos portales, cuya proliferación destaca notoriamente en los tractos portales dilatados por la acumulación de MEC (112).

#### **4.2.3.3. Eventos moleculares asociados.**

Independientemente de su origen, los miofibroblastos hepáticos persistentemente activados ejercen su fenotipo proliferativo y fibrogénico a través de diferentes vías de señalización e interacciones moleculares (80).

Durante la progresión de la fibrosis hepática, los miofibroblastos pueden integrar y responder a señales de factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y adipoquinas, que son liberadas tanto de células hepáticas residentes, incluyendo hepatocitos, células de Kupffer, LSECs y colangiocitos, como de células inmunes adaptativas e innatas infiltrantes que son reclutadas hacia el hígado dañado. También, varias de estas señales fibrogénicas son liberadas por los mismos miofibroblastos, de este modo creando un bucle de señales paracrinas y autocrinas (80,113–115).

Respecto al fenotipo proliferativo de los miofibroblastos hepáticos, la principal molécula en promoverlo es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el cual ejerce los efectos de proliferación, diferenciación y migración miofibroblásticas más potentes, sobretodo en las HSC en proceso de activación (116,117). En condiciones saludables, PDGF es producido por plaquetas, mientras que durante una injuria hepática es expresado principalmente por células de Kupffer, LSECs y las mismas HSC activadas. La estimulación de los receptores de PDGF presentes en las HSC puede activar varias cascadas de señalización, como la vía de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K)/proteína quinasa B (Akt), para regular los niveles de expresión de genes profibróticos y favorecer tanto supervivencia como proliferación celular (3,114).

Por otra parte, el fenotipo fibrogénico de los miofibroblastos hepáticos es ejercido principalmente por el factor de crecimiento TGF- $\beta$ , conocido por ser la citoquina fibrogénica más potente e importante en el desarrollo de la fibrosis hepática (118,119).

TGF- $\beta$  promueve la fibrogénesis hepática a través de tres mecanismos. Primero, inhibe la degradación de la MEC mediante la expresión de TIMPs, cuya presencia impide la acción de las MMPs. Segundo, TGF- $\beta$  induce la formación de miofibroblastos, mediante el proceso de activación o transdiferenciación, anteriormente descrito, y tercero, induce la producción y depósito de componentes de la MEC, principalmente colágenos tipo I y III y fibronectina (120).

TGF- $\beta$  es sintetizado en forma de un precursor latente por una variedad de células hepáticas, como LSECs, células de Kupffer y hepatocitos. Esta forma inactiva se une a la proteína asociada a latencia (LAP) y conforman el complejo TGF- $\beta$  latente (LTC). Este complejo es liberado y depositado en la MEC circundante, mediante la asociación con la proteína de unión a TGF- $\beta$  latente (LTBP), finalmente formando el complejo latente grande (LLC) (121). El atrapamiento de TGF- $\beta$  en el complejo LLC asegura efectos locales una vez transcurrida la activación (122).

La liberación de TGF- $\beta$  activo desde el complejo LLC es iniciada a través de diversos factores físicos y bioquímicos, tales como pH, unión de proteasas específicas e interacción con integrinas, siendo esta última el principal mecanismo de activación de TGF- $\beta$ . Así, través de la unión de integrinas a ciertas moléculas de la MEC como colágeno, se aplican fuerzas de tracción que inducen un cambio conformacional en el complejo LLC, de este modo facilitando el acceso de proteasas que median la liberación de la forma activa de TGF- $\beta$ , quedando disponible para iniciar su mecanismo de señalización (121,122).

TGF- $\beta$  exhibe sus propiedades biológicas mediante la activación de vías de señalización dependientes de proteínas SMADs e independientes de ellas. Las proteínas SMADs actúan como factores de transcripción y mediadores de la señalización intracelular de TGF- $\beta$  (120).

La vía de señalización dependiente de SMADs, también conocida como vía canónica, comienza cuando TGF- $\beta$  activo se une al receptor TGF- $\beta$  tipo II (T- $\beta$ RII), induciendo el reclutamiento del receptor TGF- $\beta$  tipo I (T- $\beta$ RI). T- $\beta$ RII fosforila a T- $\beta$ RI y le provoca un cambio conformacional, sensibilizándolo a unirse y fosforilar a las proteínas SMAD2 y SMAD3, también llamadas SMADs reguladas por receptor (R-SMADs). Después de la fosforilación, SMAD2 y SMAD3 forman un heterocomplejo con la proteína SMAD4, el cual se transloca al núcleo de la célula para unirse al DNA y así regular la transcripción de múltiples genes que inducen la expresión de componentes de la MEC (120,122).

Por otra parte, TGF- $\beta$  también actúa a través de vías de señalización no dependientes de SMADs, conocidas como vías no canónicas. Estas incluyen a las cascadas de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK), como la vía de las quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (ERK1/2) y la vía de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK), de las cuales ERK1/2 es capaz de activar la síntesis de colágeno tipo I y CTGF (115,122).

También, TGF- $\beta$  puede interactuar con otros tipos de vías, como por ejemplo la señalización dependiente de NADPH oxidasas (NOX), en la cual las ROS derivadas de la isoforma NOX4 facilitan la señalización de TGF- $\beta$ , al promover la activación de su forma latente y la posterior acción de sus efectos fibróticos (123). Por otro lado, TGF- $\beta$  se relaciona además con la vía Notch, donde ésta última actúa como mediadora selectiva de las propiedades fibrogénicas de TGF- $\beta$ , de acuerdo al balance entre sus acciones como regulador del crecimiento de células progenitoras y su habilidad para promover inflamación hepática y reparación fibrogénica (124).

Recientemente se reportó la participación de la endogлина como un co-receptor de TGF- $\beta$ , cuya función es regular la vía dependiente de proteínas SMADs (125). Si bien anteriormente se mencionó al par de receptores T- $\beta$ RII y T- $\beta$ RI, que inician la cascada de señalización de TGF- $\beta$ , hay evidencia que indica la existencia de dos tipos de receptores T- $\beta$ RI, denominados quinasa 1 similar a receptor de activina (ALK1) y quinasa 5 similar a receptor de activina (ALK5). La endogлина interactúa con ambos receptores (125,126). La vía canónica clásicamente descrita, que ocurre a través de las proteínas SMAD2 y SMAD3, incluye al receptor tipo I ALK5. Mientras que el receptor tipo I ALK1 involucra a las proteínas SMAD1 y SMAD5. Si bien se descubrió que la endogлина inhibe la vía ALK5-SMAD2/3, se encontró que dicha molécula es capaz de activar la vía ALK1-SMAD1/5, la cual también induce la transdiferenciación de las HSC hacia miofibroblastos (125). Por lo tanto, la sobreexpresión de endogлина puede inducir un aumento de las propiedades fibrogénicas de TGF- $\beta$  a través de la acción de otras proteínas SMADs, representando una vía alternativa para TGF- $\beta$  (126).

Recientemente se implicó un rol para otro miembro de la superfamilia de TGF- $\beta$  en el desarrollo de fibrosis hepática, correspondiente a la proteína morfogenética ósea-9 (BMP9). Esta proteína también es capaz de regular la transcripción génica de genes profibrogénicos, principalmente a través de proteínas SMAD (127).

La vía de señalización Hedgehog (Hh) también es partícipe de los mecanismos de la fibrosis hepática (128). La señalización de Hh comienza con la interacción de los ligandos Shh, Ihh y Dhh con su receptor, expresado en la membrana de las células responsivas. En injurias hepáticas crónicas, prácticamente todas las poblaciones celulares intrahepáticas producen y liberan estos ligandos cuando son expuestas a estrés citotóxico y mediadores

inflamatorios, activando la vía y contribuyendo a la mantención de la fibrosis hepática (128,129). Los ligandos Hh también mantienen la proliferación de los miofibroblastos hepáticos y su habilidad de producir componentes de la MEC mientras exista una injuria persistente (128).

Otro evento importante de la fibrosis hepática es la elevada remodelación de la MEC, provocada por la ruptura del equilibrio homeostático entre producción y degradación de sus componentes. Este recambio alterado de MEC es mediado por metaloproteinasas de matriz (MMPs) e inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) (130). Muchas MMPs están ausentes o estrictamente controladas en hígados sanos, pero durante una injuria su expresión aumenta (130–132).

Las MMPs son enzimas endopeptidasas dependientes de zinc que presentan más de 25 subtipos y son capaces de degradar diversos componentes de la MEC. Y los TIMPs se definen como inhibidores endógenos específicos que se unen al sitio activo de las MMPs, de este modo bloqueando su acceso a los sustratos de la MEC (130). De las cuatro TIMPs descubiertas, se reportó que TIMP-1 y TIMP-2 están involucradas en fibrosis hepática, expresándose en altos niveles por parte de las HSC. TIMP-1 es un contribuyente importante, debido a su acción inhibitoria sobre las MMPs que actúan sobre colágenos tipo I y III, que son los componentes más abundantes de la cicatriz fibrosa. De esta forma, la elevada expresión de TIMP-1 impide la degradación de MEC y contribuye a la progresión de la fibrosis hepática (130,133–135).

La activa remodelación y recambio de MEC genera un aumento en la expresión de diversas MMPs, entre ellas MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-19, MMP-23, MMP-24, MMP-27 y MMP-28. Incluso, se reportó que la expresión de MMP-2 y MMP-9 se encuentra elevada en presencia de altos índices de TIMPs durante el proceso fibrogénico (135). Las principales fuentes de MMPs son las células de Kupffer y las HSC, aunque también los hepatocitos son capaces de expresarlas, particularmente MMP-10 (136).

Finalmente, los datos sugieren que incluso en fibrosis avanzada las MMPs están presentes dentro del hígado, pero son inhibidas por la persistente expresión de TIMP-1 por parte de los miofibroblastos hepáticos. El balance entre TIMPs y MMPs puede, mediante

finas modificaciones en los niveles de cada mediador, alterar el rango de degradación de la MEC en la fibrosis hepática (60,137).

Ahora bien, existe otra familia de enzimas involucradas, conocida como desintegrinas y metaloproteinasas (ADAM) (138). Las proteasas ADAM regulan el proceso de fibrosis hepática mediante la liberación de factores de crecimiento y citoquinas, el desprendimiento o liberación de receptores de membrana en las HSC y, a través de la modulación de los componentes de la MEC. En efecto, diferentes estudios han revelado que la expresión de varias proteasas ADAM aumentan con la activación de las HSC, entre ellas ADAM-8, ADAM-9, ADAM-10, ADAM-12 y ADAM-17, las cuales actúan en vías de señalización profibrogénicas (138).

El sobrecruzamiento de las fibras de colágeno, también llamado reticulación, colabora mejorando la rigidez de la MEC hepática. Esto ocurre, en parte, gracias a la acción de otro conjunto de enzimas conocidas como lisil oxidasas (LOX) (139). Estas enzimas catalizan el sobrecruzamiento de los componentes estructurales de la MEC, así estabilizando la red de fibras colágenas y elásticas, aumentando la rigidez tisular e impidiendo la acción degradante de las MMPs (140). La principal fuente celular de las enzimas LOX son los miofibroblastos hepáticos, y en particular de LOXL-2, cuya principal función es modificar post-traduccionamente el colágeno tipo I transformándolo en alisina, el cual es responsable de los enlaces cruzados que estabilizan las fibras colágenas y elásticas de la MEC (141,142).

Como se puede apreciar, la fibrosis hepática implica un escenario molecular complejo, donde sus componentes están estrechamente relacionados. Si bien ante una injuria aguda estos mecanismos son capaces de funcionar coordinadamente y con la capacidad de retornar a la normalidad, cuando ocurre una injuria crónica se perturba el equilibrio homeostático del tejido hepático y todas estas cascadas moleculares conllevan al progreso de la enfermedad.

#### **4.2.4. Patrones de Fibrosis Hepática.**

El depósito de MEC genera notables alteraciones estructurales y metabólicas en el lobulillo hepático. Estos cambios se observan en las diferentes etiologías de las hepatopatías crónicas, donde la naturaleza de la injuria tiene un determinado impacto en la forma de

depósito de componentes de la MEC, generando 3 patrones de desarrollo fibrótico bien descritos (128).

El primer patrón corresponde a la fibrosis en puente, típicamente observado en pacientes con infección crónica por HBV o HCV, o con hepatitis autoinmune. La fibrosis en puente se caracteriza por la predominante formación de un tabique fibroso portal-central, aunque también se asocia con la aparición de tabiques ciegos o de tabiques de conexión entre diferentes espacios portales (Fig. 4.6) (128).

El segundo patrón descrito es la fibrosis pericelular, también conocido como fibrosis intercelular (Fig. 4.6). Se observa en el hígado de pacientes con trastornos metabólicos como NASH y hemocromatosis, aunque también suele aparecer en hepatitis virales (56). El depósito excesivo de MEC comienza en el espacio de Disse y conlleva a una extensiva capilarización de los sinusoides hepáticos (128). También es posible observar este patrón en torno a la vena central del lobulillo hepático, especialmente en pacientes con hepatopatía alcohólica, donde el depósito de MEC genera un engrosamiento de la zona pericentral que brota hacia el parénquima perivenoso (56,143). Además, la capilarización de los sinusoides generada por este patrón de fibrosis ocasiona engrosamiento del endotelio vascular, pérdida de fenestraciones en las células endoteliales y la formación de una lámina basal continua. Estos cambios sinusoidales comprometen el flujo metabólico bidireccional entre la circulación y el parénquima, alterando la fisiología hepática y generando hipertensión portal (128,143), una complicación clásica de la fibrosis hepática.

Y el tercer patrón corresponde a la fibrosis biliar, el cual se observa en injurias hepáticas de origen colestásico, donde el conductillo biliar del espacio portal se ve comprometido. Se caracteriza por la formación de un tabique fibroso portal-portal alrededor de nódulos hepáticos, similar a la fibrosis en puente (Fig. 4.6) (128).

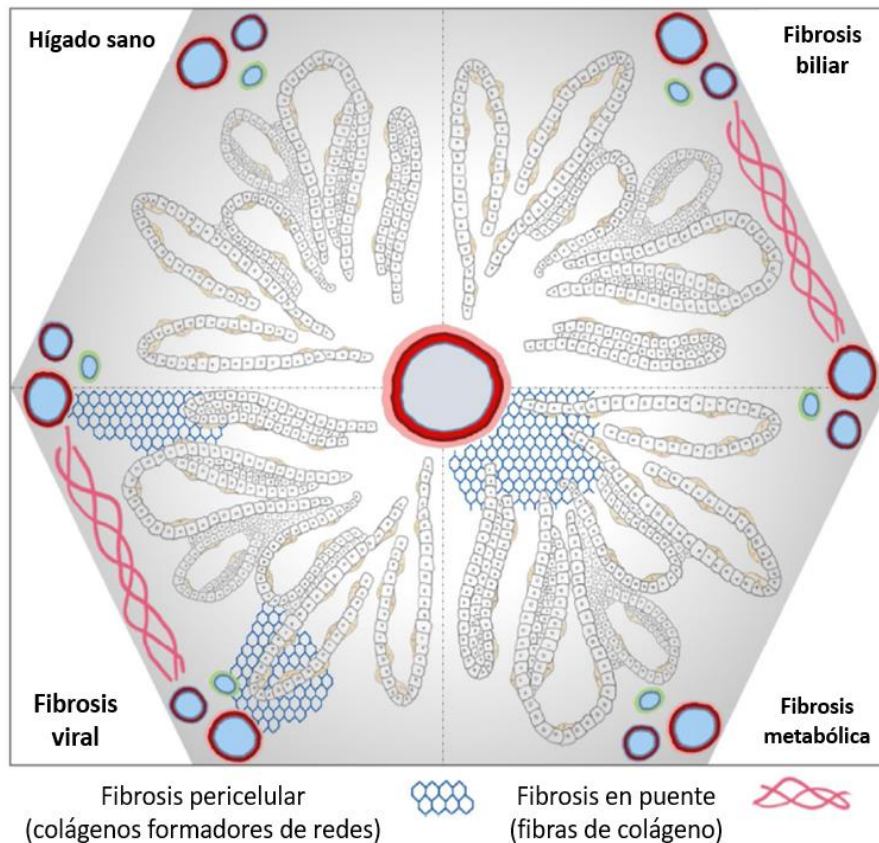


**FIGURA 4.6.** *Patrones de fibrosis hepática según su etiología.* Si bien en la imagen la fibrosis en puente aparece también asociada a fibrosis biliar, se ha establecido a esta última como un tercer patrón de fibrosis, con tabiques entre espacios portales de formación importante. Extraído y modificado de la referencia (56).

#### 4.2.5. Rol de las células hepáticas no parenquimatosas.

Los hepatocitos del parénquima constituyen el blanco principal de los distintos tipos de injuria hepática y cuando resultan dañados son una fuente importante de citoquinas y mediadores tanto proinflamatorios como profibrogénicos (80). Sin embargo, el nicho celular fibrótico también contiene otras células no parenquimatosas con papeles importantes, como las células de Kupffer y las células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSECs) (72). Estas células, en conjunto con las HSC, los hepatocitos y las células inmunes infiltrantes, conforman un ambiente heterogéneo con múltiples funciones claves para el proceso fibrótico (49,72).

Las células de Kupffer son altamente fagocíticas, se encuentran en el espacio perisinusoidal de Disse junto a las HSC, íntimamente cercanas a las LSECs, y son fundamentales en la respuesta hepática ante una injuria, ya que ante cualquier cambio degenerativo en los hepatocitos, o estímulo proveniente de los sinusoides, las células de Kupffer responden inmediatamente al insulto a través de la liberación de mediadores como ROS, TGF- $\beta$ , PDGF, metabolitos de ciclooxigenasa, entre otros, que ejercen efectos paracrinicos importantes en las demás células hepáticas y que, a su vez, gatillan respuestas inflamatorias y reparativas (49,119,144). Gracias a la liberación de estos mediadores, son capaces de mediar la activación de las HSC y la síntesis de colágeno tipo I (49). Por otro lado, las células de Kupffer también participan en el recambio de MEC, a través de la producción de MMPs y TIMPs, así regulando el depósito y degradación de componentes de la matriz. Sin embargo, durante una injuria crónica las células de Kupffer ejercen un rol principalmente fibrogénico, favoreciendo el depósito de MEC (119,144).

Las LSECs son un tipo celular altamente especializadas que tapizan los sinusoides hepáticos, la unidad microvascular del hígado, y que se encargan de mediar el intercambio de plasma, nutrientes, lípidos y lipoproteínas entre la circulación y los hepatocitos, a través de un sistema de ultrafiltración que consiste en fenestras o poros sin diafragma, y que no poseen membrana basal (145).

En la etapa temprana de la fibrosis hepática, las LSECs dañadas sufren un proceso denominado capilarización, el cual consiste en la pérdida de fenestras por la formación de una membrana basal continua. Esta membrana se forma a raíz de los colágenos fibrilares que se acumulan en el espacio de Disse, principalmente colágeno tipo I y III, producidos por las primeras HSC activadas, lo cual altera el flujo de intercambio entre los sinusoides y los hepatocitos, causando resistencia al flujo sanguíneo, inducción de isquemia atrófica del parénquima y promoción de fibrogénesis hepática (145,146).

Normalmente, las LSEC contribuyen a la mantención del estado quiescente de las HSC a través de la secreción de óxido nítrico. Sin embargo, la defenestración y capilarización de las LSEC ocurridas por injuria hepática generan pérdida de la producción de óxido nítrico, así promoviendo la activación de las HSC (145,147). También, las LSEC capilarizadas secretan otros mediadores profibrogénicos que actúan sobre las HSC, tales como fibronectina, plasmina y PDGF, induciendo su transdiferenciación (147).

A medida que avanza el proceso fibrogénico, la MEC se torna rígida y con ello aumenta la tensión intracelular de las LSEC, generando efectos en su citoesqueleto que inducen la formación de estructuras de actina llamadas podosomas. Esta adaptación de las LSEC contribuye a la degradación de MEC circundante, dejando sitios libres para la formación de nuevos vasos sanguíneos (148). En efecto, la angiogénesis es otra característica que se observa durante el desarrollo de fibrosis hepática, la que será revisada en la próxima sección.

Junto al espacio de Disse, los sinusoides hepáticos conforman un microambiente tisular caracterizado por interacciones multidireccionales entre las células no parenquimatosas, la matriz y la circulación sanguínea, cuya actividad es vital para el mantenimiento de la homeostasis hepática y, además, crucial para la progresión de la fibrosis hepática (149).

Además de las células de Kupffer y las LSEC, las células progenitoras hepáticas (HPC) también colaboran con el desarrollo de fibrosis hepática, debido a que la regeneración hepática también se asocia a la aparición de fibrosis, especialmente cuando dicho proceso se torna crónico y descontrolado (150,151). La reacción ductular hace referencia a la proliferación de una población de HPC que se diferencia hacia células similares a colangiocitos, cuya extensión se correlaciona con la severidad de la fibrosis hepática, puesto que las HPC se activan cuando la replicación de hepatocitos maduros es inhibida, sobre todo en presencia de injurias importantes. De este modo, y como se señaló con anterioridad, la cronicidad del daño genera una respuesta regenerativa deteriorada que contribuye al proceso de fibrogénesis (150,151).

Finalmente, las células hepáticas parenquimatosas y no parenquimatosas trabajan en conjunto y de forma sinérgica para colaborar con el progreso de esta patología, a través de diversas y complejas interacciones moleculares.

#### **4.2.6. Complicaciones asociadas a Fibrosis hepática.**

La fibrosis hepática es un elemento en común para todas las hepatopatías crónicas y cuando transcurre de manera progresiva se pueden desarrollar una serie de eventos adversos, como angiogénesis patológica, hipertensión portal y cirrosis hepática, caracterizada por

fibrosis difusa, alteración de la arquitectura del hígado y compromiso de la función hepática normal (152).

Los cambios en la composición de la MEC, como el reemplazo de los colágenos tipo IV y VI por colágenos tipo I y III en el espacio de Disse, desencadenan respuestas y señalizaciones celulares alteradas, como la capilarización de los sinusoides anteriormente mencionada. Estas modificaciones generan la formación de tabiques fibrosos que favorecen la hipoxia tisular (153).

La hipoxia hepática es un estímulo importante para inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, conocida como angiogénesis, debido a la necesidad de irrigar el tejido con deficiencia de oxígeno. Normalmente, una vez que se ha restablecido la oxigenación tisular, se produce la regresión de los nuevos vasos sanguíneos formados mediante la apoptosis de células endoteliales. Sin embargo, durante la fibrosis hepática estos procesos se ven alterados, promoviendo la formación de vasos sanguíneos irregulares, tortuosos y desorganizados. Por lo tanto, la vascularización patológica y el desarrollo de una angio-arquitectura anormal en el hígado están asociados a la fibrogénesis progresiva (154–158). Así lo han demostrado los hígados humanos cirróticos que contienen más vasos sanguíneos que los hígados sanos, y nódulos cirróticos que se encuentran rodeados de plexos vasculares densos (155).

La masiva respuesta inflamatoria que se produce durante la fibrosis hepática genera un microambiente tisular rico en factores de crecimiento, citoquinas y moléculas de adhesión que promueven los procesos de angiogénesis y fibrosis en conjunto, así otorgando las condiciones perfectas para la cronicidad de la lesión (159).

Otra lesión vascular importante que contribuyen a la disfunción hepática es la capilarización de los sinusoides, a causa del depósito de MEC, con la formación de una membrana basal que convierte a los sinusoides de paredes delgadas en canales vasculares de presión sanguínea más elevada, originando hipertensión portal (2,80). La hipertensión portal es una condición debida al aumento de la resistencia al flujo sanguíneo portal y a la compresión de las venas centrales, tanto por fibrosis perivenular y por los nódulos parenquimatosos expandidos. En un hígado cirrótico, con hipertensión portal ya establecida, la presión venosa puede incluso superar los 10 mmHg, causando otras complicaciones como várices gastroesofágicas, ascitis, encefalopatía hepática y síndrome hepatorenal (152).

El aumento de la resistencia intrahepática está mediado, en primer lugar, por la deposición de MEC, que provoca vasoconstricción en la circulación intrahepática. Las células de Kupffer, LSECs y HSC también contribuyen a dicho proceso mediante la secreción de mediadores vasoconstrictores, como la endotelina-1 y la angiotensina II. Ambos potencian el fenotipo contráctil de las HSC y promueven un aumento de la presión intrahepática (152,160).

Finalmente, tanto angiogénesis como hipertensión portal son procesos que se desarrollan de forma paralela conforme al avance de la fibrogénesis hepática, unificando sus consecuencias a favor del progreso de la enfermedad hacia cirrosis (2). Histológicamente, la cirrosis hepática se caracteriza por tabiques fibróticos que unen tractos portales y venas centrales, ocasionando que el parénquima hepático se componga de islotes de hepatocitos rodeados por estos tabiques (6). Inevitablemente, el desarrollo de cirrosis confiere un elevado riesgo de adquirir carcinoma hepatocelular (HCC), el cual es conocido por ser la tercera causa más común de muerte por cáncer en el mundo (6,55).

#### **4.2.7. Tratamiento de Fibrosis hepática: actualidad y futuras perspectivas.**

Pese al gran conocimiento existente acerca de los mecanismos fisiopatológicos, celulares y moleculares de la fibrosis hepática, en la actualidad no existe un tratamiento antifibrótico como tal que revierta de manera exitosa la progresión de la fibrogénesis en pacientes con hepatopatías crónicas. Para ellos, las únicas opciones terapéuticas disponibles a la fecha son la eliminación del agente causal de la enfermedad y el trasplante hepático (161,162). Por lo tanto, los investigadores han dedicado años y mucho esfuerzo en la identificación de múltiples blancos terapéuticos para la elaboración de algún fármaco con acciones antifibróticas (163).

El propósito de la eliminación del agente causal es aliviar el proceso inflamatorio y prevenir la progresión de la fibrosis hepática, o bien, promover su regresión, así mejorando la función hepática, aplazando el desarrollo de cirrosis y brindando una buena calidad de vida para los pacientes, a la vez prolongando su supervivencia (163,164).

Para controlar la causa subyacente de la hepatopatía se suele recurrir a la supresión o eliminación de la replicación viral de HCV o HBV, al tratamiento de la colestasis, a la reducción de peso corporal en pacientes con hepatopatías grasas, al mejoramiento de

desórdenes metabólicos asociados, al cese del consumo de alcohol en pacientes con hepatopatía alcohólica y, también, al uso de inmunosupresores en caso de hepatopatía autoinmune. Todas estas terapias pueden reducir la injuria hepática persistente, de este modo inhibiendo la fibrogénesis hepática y promoviendo la fibrinólisis. En efecto, existe mucha evidencia que apoya la noción de que la fibrosis, e incluso la cirrosis temprana, pueden retroceder su avance luego del tratamiento efectivo de la hepatopatía subyacente (163). En pacientes con hepatitis crónica se suele indicar el uso de fármacos como Lamivudina, Entecavir y Tenofovir para el tratamiento contra el HBV, mientras que para el HCV se recurre a la terapia basada en interferón (IFN). Estos agentes antivirales pueden suprimir persistentemente la replicación viral, detener la inflamación, generar un retroceso de la fibrosis e, incluso, curar la enfermedad (165).

Sin embargo, también existen reportes de algunos pacientes que, a pesar de responder al tratamiento antiviral, no experimentan regresión de la fibrosis. Por lo tanto, se estableció que la terapia antiviral por sí sola no resuelve completamente el problema de la fibrosis hepática en la hepatitis viral, lo que incrementa la necesidad de un tratamiento antifibrótico como tal (163).

Si bien ha sido complicado encontrar buenos candidatos a agentes antifibróticos efectivos, lo ideal es que dicho agente se dirija al menos al bloqueo de las HSC activadas (166).

La investigación pre-clínica ha encontrado múltiples objetivos para agentes antifibróticos, algunos de los cuales han logrado entrar al campo de investigación clínica con la realización de ensayos en fase II y III, particularmente en el área de la fibrosis hepática relacionada con la NASH. Estos nuevos fármacos se dirigen a diversas vías involucradas en la patogénesis de las hepatopatías crónicas y se estima que algunos de ellos puedan ser aprobados prontamente para su uso en pacientes (164,167). Uno de ellos corresponde al Simtuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra la enzima LOX-2 y que inhibe el sobrecruzamiento de las fibras de colágeno característico de la fibrosis avanzada, de este modo promoviendo la resolución de la enfermedad. Desafortunadamente, los resultados obtenidos a partir de estudios clínicos en fase II mostraron que la monoterapia con Simtuzumab era inefectiva en la disminución del contenido de colágeno hepático (164). Otro ejemplo es el del antagonista de Galectina-3, cuyo tratamiento, por el contrario, tuvo

resultados alentadores, puesto que logró disminuir el gradiente de presión venosa hepática en un estudio clínico de fase II en pacientes con cirrosis asociada a NASH. Por estas razones, el antagonista de Galectina-3 está siendo actualmente evaluado en ensayos de fase III [(164).

Sin embargo, el progreso de estos agentes también se ha visto impedido por algunos obstáculos, como la falta de biomarcadores con una adecuada sensibilidad y especificidad, que permitan medir correctamente la regresión o reversión de la fibrosis hepática (167). Otras barreras metodológicas en el desarrollo de agentes antifibróticos son los complejos mecanismos asociados a la fibrosis hepática, los factores que los influyen y las variaciones entre los mismos pacientes (163). También, influyen los cambios anatómicos generados por la fibrosis progresiva, tanto en términos de topografía, bioquímica y estructura de la MEC hepática. En efecto, durante la fibrosis avanzada y sin importar la etiología de la hepatopatía crónica, el tejido cicatricial presenta rigidez y extenso sobrecruzamiento de fibras de colágeno. Bajo estas condiciones, e independientemente del blanco celular o molecular del fármaco en evaluación, los cambios bioquímicos de la MEC y la desconexión vascular en grandes áreas del tejido fibrótico constituyen una importante barrera física que necesita ser considerada cuando el objetivo del tratamiento propuesto es la reversión de la fibrosis (24).

Por su parte, el descubrimiento de nuevos fármacos es un proceso costoso y que puede durar entre 8 y 14 años. Además, los ensayos clínicos de agentes antifibróticos aún requieren el uso de la biopsia hepática para evaluar su eficacia en los pacientes, debido a que continúa siendo el método de evaluación *gold standard*. Por lo tanto, cuando las pruebas bioquímicas sanguíneas y las técnicas de imagenología puedan evaluar los cambios de la fibrosis hepática con una mayor precisión, el desarrollo clínico de fármacos y terapias antifibróticas tomará menos tiempo (163).

#### **4.2.8. Mecanismos de regresión de fibrosis hepática.**

Desde que los estudios experimentales y clínicos demostraron que la fibrosis hepática avanzada, e incluso la cirrosis en etapa temprana, son procesos reversibles una vez que se suprime o elimina la causa subyacente, como la hepatitis viral B o C (140,168,169), se confirmó que la fibrosis hepática es un proceso altamente dinámico. Así, estos hechos motivaron la investigación de los mecanismos tisulares asociados a su regresión, para finalmente poder vincularlos con los efectos de la terapia antifibrótica en desarrollo (169).

Si bien aún es incierto el punto en que la cirrosis se torna irreversible, esta irreversibilidad se vuelve más probable a medida que el tejido cicatricial se engrosa, se vuelve más acelular y denso. El énfasis actual está puesto sobre los cambios en el microambiente tisular de las citoquinas, en la composición de la MEC y en el comportamiento de las HSC. Así, estos componentes surgen como elementos clave en la respuesta de regresión (168).

Principalmente, la reducción del número de HSC activadas es crítica para la reversibilidad del proceso fibrótico, y existen 3 vías importantes a través de las cuales estas células fibrogénicas son eliminadas o suprimidas del microambiente tisular (168,169). La primera vía corresponde a la apoptosis de las HSC activadas, la cual es orquestada por una compleja interacción entre señales pro-apoptóticas y pro-supervivencia, donde aproximadamente un 50% de las HSC activadas experimenta apoptosis. El proceso de muerte celular ocurre por activación de vías mediadas por receptores apoptóticos y los ligandos Fas o TRAIL, por caspasas 3 y 8, por regulación positiva de proteínas pro-apoptóticas como p53 y, también, por la acción de células NK y NK-T hepáticas (169). Estas células se unen de manera directa a determinados receptores de las HSC, conduciendo a la subsecuente degranulación de péptidos citotóxicos, como granzima B, hacia el citoplasma, induciendo la muerte de las HSC activadas. También, las células NK y NK-T son una fuente importante de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), el cual produce un fuerte efecto antifibrótico al ejercer la apoptosis directa de las HSC (169).

La segunda vía consiste en la senescencia de las HSC activadas. La senescencia celular es una forma de arresto proliferativo controlado genéticamente que previene la división celular y que está asociado a la represión estable de genes replicativos (168,169). Entonces, cuando las HSC activadas se vuelven senescentes, estas disminuyen su secreción de componentes de MEC y, por lo tanto, disminuye la fibrogénesis (169).

Y la tercera vía, corresponde a la inactivación de las HSC previamente activadas, cuya reversión a un estado “desactivado” implica una regulación negativa de genes fibrogénicos y la adquisición de un fenotipo similar, pero no idéntico, a las HSC quiescentes, que detiene la síntesis de MEC (168,169). Ahora bien, se ha descrito que las HSC poseen una marcada plasticidad celular y una memoria epigenética que promueve una conversión más efectiva hacia el fenotipo miofibroblástico ante la presencia de un nuevo estímulo, por lo que estas células en estado inactivo permanecen prácticamente preparadas y con una capacidad

de reactivación mejorada. Por lo tanto, el proceso de desactivación de las HSC necesita más estudios investigativos que esclarezcan este comportamiento y sus consecuencias (168).

Otro mecanismo importante en la regresión de la fibrosis hepática radica en la acción de los macrófagos hepáticos, los cuales expresan MMPs que degradan componentes de la MEC. Entonces, el aumento de la actividad de las MMPs, particularmente MMP-12 y MMP-13, promueve la resolución de la fibrosis tisular (169).

También, la regresión de la fibrosis hepática se acompaña de otros procesos, como la disminución de citoquinas proinflamatorias en el microambiente, entre ellas IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF y TGF- $\beta$ . En ausencia de TGF- $\beta$  y su señalización, el número de HSC activadas disminuye rápidamente, a su vez, suprimiendo la producción de MEC, mientras que la expresión de MMPs se regula positivamente por sobre la expresión de TIMPs, de este modo favoreciendo la degradación de fibras y otros componentes de la MEC (168,169).

Finalmente, el conocimiento de estos mecanismos (Fig. 4.7) puede beneficiar enormemente el descubrimiento y desarrollo de tratamientos antifibróticos, puesto que representan una serie de objetivos terapéuticos a considerar, especialmente cuando se trata de eventos celulares y moleculares que forman parte de la homeostasis de la MEC hepática y que se pueden potenciar para lograr la restauración de este órgano vital.

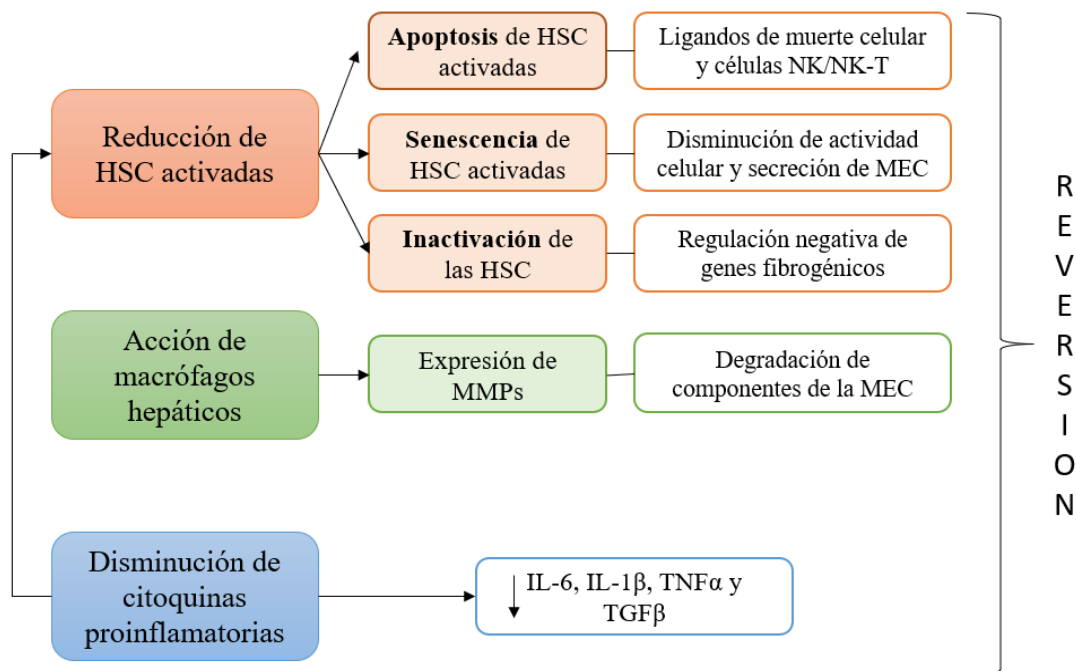


**FIGURA 4.7.** *Mecanismos asociados a la reversión o regresión de la fibrosis hepática.* HSC: célula estrellada hepática; NK: *natural killer*; MEC: matriz extracelular; MMPs: metaloproteinasas de matriz; IL: interleuquina; TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral-alfa; TGF $\beta$ : factor de crecimiento transformante-beta. Elaborado en base a las referencias (168,169).

### 4.3. TERAPIA CELULAR EMERGENTE EN FIBROSIS HEPÁTICA.

Ante la evidente problemática que representan la fibrosis hepática progresiva y la ausencia de una terapia antifibrótica como tal, los investigadores se han dirigido hacia la terapia celular, un área importante de la medicina regenerativa. La terapia celular consiste en un tratamiento donde cualquier tipo de célula o producto celular, incluso modificado con técnicas de biotecnología, es aplicado sobre modelos de enfermedad humanos, animales o *in vitro*, para lograr una regeneración celular o tisular estable y continua, con efectos adversos mínimos e insignificantes. En fibrosis hepática, particularmente, la terapia celular busca detener su progresión y, a la vez, el establecimiento de los factores necesarios para la resolución de la fibrosis (170), revisados en la sección anterior.

Inicialmente, una posible estrategia de terapia celular para restablecer la función hepática fue el trasplante de hepatocitos maduros. Sin embargo, se necesitan muchos hepatocitos (aproximadamente 1 billón de células) para un eventual trasplante, y, además, los hepatocitos son difíciles de manipular, criopreservar y expandir en cultivo. Por estas razones, surgió el interés en la utilización de células madre, las cuales son más fáciles de cultivar y poseen, además, la capacidad de diferenciarse hacia hepatocitos. Estas cualidades hicieron de las células madre una atractiva opción para la regeneración tisular hepática (8,171).

Las células madre se caracterizan por ser inmaduras y por tener la capacidad de autorrenovarse, repoblar un tejido e integrarse al funcionamiento del órgano. En tanto, se estableció que la célula madre ideal para la terapia celular hepática debe ser fácil de cultivar y preservar, tener gran capacidad de expansión, buena capacidad de diferenciación hepatocitaria, buen perfil de bioseguridad, ser inmunoprivilegiada (poseer características

inmunológicas beneficiosas), tener buena capacidad de integración en el órgano y, también, de estimulación de la regeneración endógena del tejido hepático (171).

Varios estudios comprobaron que el trasplante de células madre mesenquimales (MSC) resultaba ventajoso sobre el proceso de regeneración, debido a que actúan de manera paracrina para promover angiogénesis, perfusión del tejido hepático dañado, proliferación y supervivencia de hepatocitos, a través de la liberación de factores de crecimiento y de la regulación de la inflamación (8,171).

Las MSC son células madre adultas, es decir, que se obtienen a partir de tejidos adultos y ya formados, y además de tipo multipotencial, puesto que pueden originar más de un tipo especializado de células, como los hepatocitos (170,171). Las fuentes más comunes de MSC son la médula ósea y el tejido adiposo. Por un lado, las MSC de médula ósea (BM-MSC) han demostrado efectos terapéuticos positivos frente a los modelos experimentales de fibrosis hepática, como la apoptosis de las HSC y la reducción de la cantidad de colágeno (170). Sin embargo, a pesar de estos resultados, algunos estudios aseguraron que las BM-MSC pueden experimentar diferenciación celular hacia miofibroblastos fibrogénicos y mantener el proceso fibrótico. Además, la recolección de células de médula ósea es un procedimiento invasivo, doloroso y que proporciona un número relativamente bajo de BM-MSC, el cual disminuye con la edad del donante. Por lo tanto, se necesitan más estudios para verificar si las BM-MSC son realmente una buena opción para terapia celular hepática (170,172,173).

Por otro lado, las MSC derivadas de tejido adiposo (ADSC) también representan una alternativa terapéutica para la fibrosis hepática, ya que son capaces de inhibir la proliferación y activación de las HSC (170). A pesar de que las ADSC pueden obtenerse más fácilmente que las BM-MSC a través de procedimientos de liposucción, y de que pueden expandirse exitosamente de manera *in vitro*, existen controversias con respecto a su ruta de administración, al cronometraje de trasplante y a los resultados de su uso a corto y largo plazo, por lo que se necesitan más estudios para ampliar el panorama de las ADSC en terapia celular hepática (170,174).

Si bien las MSC están libres de problemas éticos en su uso y no generan rechazo al ser trasplantadas, ya que normalmente se obtienen del propio paciente, ocurre que no son capaces de proliferar tan rápidamente luego de su aislamiento (8). Y las terapias basadas en

el trasplante de células madre requieren una gran cantidad celular (8,173). Las células madre embrionarias son las que tienen el mayor potencial de diferenciación, porque son capaces de dividirse ilimitadamente y crecer bastante rápido en cultivos celulares. Pero su uso aún implica cuestionamientos éticos, por la destrucción de embriones que involucra el proceso de aislamiento celular, además del riesgo del desarrollo de teratomas (8).

En este contexto, la investigación se dirigió hacia los tejidos perinatales humanos, como la placenta y sus membranas fetales, cuyas células tendrían características intermedias entre las células madre embrionarias y las células madre adultas (173–175). Además, el que los tejidos placentarios contribuyan al desarrollo y crecimiento de un feto semialogénico, es decir, que expresa antígenos paternos que puedan ser reconocidos como “no propios” de la madre, y sin ser rechazado durante el embarazo, favorece la idea de que las células placentarias poseen características inmunológicas únicas (176,177). También, las células madre de tejidos perinatales a término pueden proliferar y diferenciarse *in vitro* hacia muchas líneas celulares, y su obtención no implica cuestionamientos éticos ni procedimientos invasivos, puesto que tanto la placenta como las membranas fetales son expulsadas naturalmente luego del parto mediante el alumbramiento (173,174).

De las membranas fetales, la membrana amniótica humana y sus células han sido muy estudiadas para su potencial uso terapéutico en fibrosis hepática, por lo que, junto a sus prometedores efectos en esta patología, serán el enfoque de esta revisión.

#### **4.4. MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA (hAM)**

Los tejidos perinatales humanos a término se conforman por la placenta, el cordón umbilical y las membranas fetales (Fig. 4.8). La placenta es el órgano que permite el intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto (178). En estado terminal, presenta forma discoide y dos caras, una materna y una fetal. La cara materna está compuesta por decidua endometrial, mientras que la cara fetal se encuentra completamente cubierta por la placa coriónica. A su vez, esta placa se halla cubierta por la membrana amniótica, o amnios, dando lugar a un conjunto denominado membrana amniocoriónica, cuya extensión origina el saco amniótico que envuelve al feto y que contiene el líquido amniótico (Fig. 4.8) (178–181).

Las membranas coriónica y amniótica, o membrana amniocoriónica, constituyen las membranas fetales. De ambas, la membrana amniótica es la más interna y se contacta directamente con el feto, permitiendo su desarrollo normal, impidiendo el rechazo inmune materno y brindando protección microbiana (180,181). Debido a estas cualidades, más la ausencia de problemas éticos tras su obtención, la membrana amniótica humana (hAM) ha sido extensamente estudiada y caracterizada durante la última década.

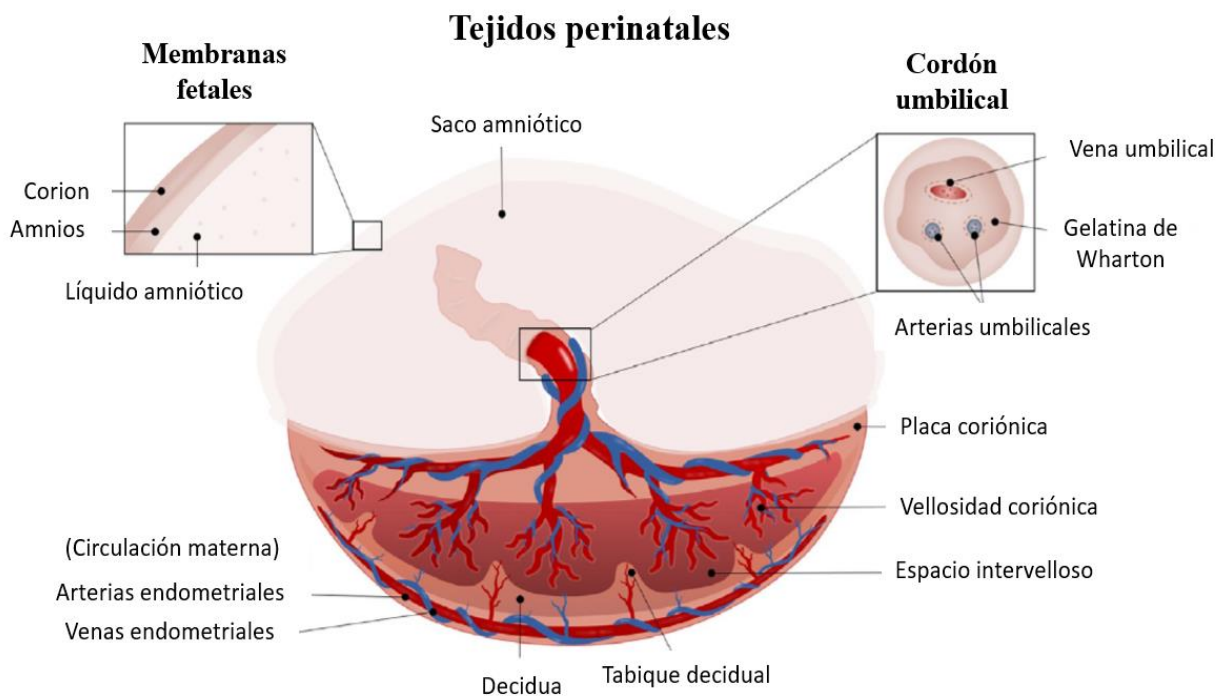


**FIGURA 4.8.** *Tejidos perinatales humanos: placenta, membranas fetales y cordón umbilical.* En la esquina superior izquierda se observa la membrana amniótica, o amnios, como la capa más interna del saco amniótico. El amnios se extiende por todo el interior del saco, tapizando por completo la cara fetal de la placenta y parte del cordón umbilical.

Extraído y modificado de la referencia (181).

#### 4.4.1. Embriología y desarrollo de la hAM.

Para comprender por qué la membrana amniótica humana (hAM) y sus células poseen características de células madre, como la pluripotencialidad, es importante conocer su proceso de embriogénesis (182).

Entre el séptimo y el octavo día después de la fecundación, el blastocisto ya se encuentra implantado en el endometrio materno y está conformado por el embrioblasto, o masa celular interna, y el trofoblasto. A su vez, desde el embrioblasto se forma el disco embrionario bilaminar, compuesto por dos capas celulares denominadas epiblasto e hipoblasto. Posteriormente, entre estas dos capas surge un pequeño espacio llamado cavidad amniótica primitiva (Fig. 4.9) (182–184).

Luego, desde el epiblasto comienzan a surgir células denominadas amnioblastos, las cuales, apoyadas sobre el trofoblasto, proliferan y forman una cubierta epitelial que tapiza la cavidad amniótica primitiva. Esta cubierta origina el epitelio de la membrana amniótica (Fig. 4.9), compuesto por células epiteliales amnióticas humanas (hAECs) (182). Simultáneamente, las células migratorias del hipoblasto se diferencian hacia células mesenquimales que constituyen el mesodermo extraembrionario, a partir del cual se desarrolla el tejido conectivo amniótico, con las células estromales mesenquimales amnióticas humanas (hAMSCs). Así, entre ambos procesos, se forma finalmente la estructura de la hAM (184).

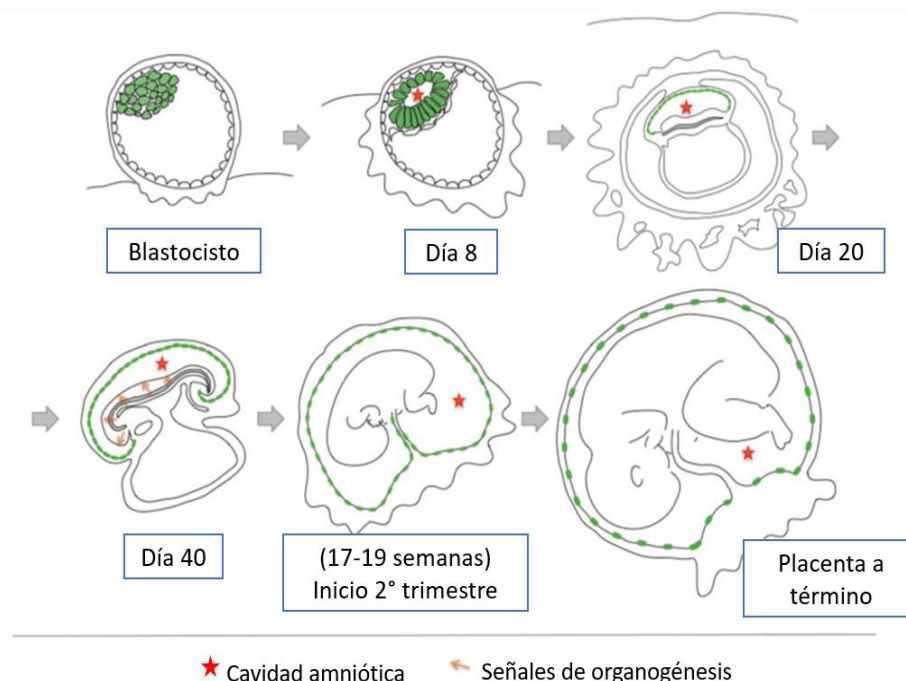


**FIGURA 4.9.** *Origen embriológico del epitelio amniótico humano a partir del epiblasto.* 8 días luego de la fecundación, la masa celular interna se diferencia en epiblasto e hipoblasto. Entre ambos surge la cavidad amniótica (estrella roja), y a medida que la cavidad crece, la segregación espacial permite que algunos amnioblastos no reciban señales de diferenciación, así conservando características de células madre del epiblasto hasta el final de la gestación, incluso cuando ya se han diferenciado en epitelio amniótico. Las flechas naranjas representan las señales de la organogénesis, las cuales aparecen después de que surgen los amnioblastos. Extraído de la referencia (184).

Además de originar el epitelio amniótico, el epiblasto es la fuente de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) que darán origen al cuerpo del embrión, mediante el proceso de organogénesis (184). Ahora bien, la formación de los amnioblastos a partir del epiblasto ocurre antes de la organogénesis, por lo que los amnioblastos separados espacialmente por la cavidad amniótica, a medida que avanza la organogénesis, escapan de las señales moleculares de diferenciación celular (184,185). Si bien muchos de los amnioblastos se diferencian hacia una estirpe epitelial, se ha demostrado que un porcentaje de estas células epiteliales amnióticas humanas (hAECS) logran retener características de células madre del epiblasto (Fig. 4.9) (184).

Entonces, se puede afirmar que la membrana amniótica humana, particularmente sus células epiteliales (hAECS), comparten el mismo desarrollo embriológico que el cuerpo del embrión y esto les confiere cualidades propias de las células madre pluripotentes (183,184).

#### **4.4.2. Estructura e histología de la hAM.**

La membrana amniótica humana (hAM) es la capa más interna de las membranas fetales. Es una estructura biológica semitransparente, delgada, elástica y resistente que carece de nervios, músculos, vasos linfáticos y vasos sanguíneos (Fig. 4.10). Al término del embarazo, presenta una superficie aproximada de 700 a 1.200 cm<sup>2</sup>, un peso de 15 - 35 g y un grosor que varía entre 0,02 y 0,05 mm (11,186–188). Estructuralmente, la hAM está constituida por 3 regiones: 1) Amnios placentario, ubicado sobre la placa coriónica y tapizando la cara fetal de la placenta; 2) Amnios libre o reflejado, el cual se extiende por

fuera de la placenta para formar parte del saco amniótico, y 3) Amnios umbilical, el cual recubre la superficie del cordón umbilical (11).

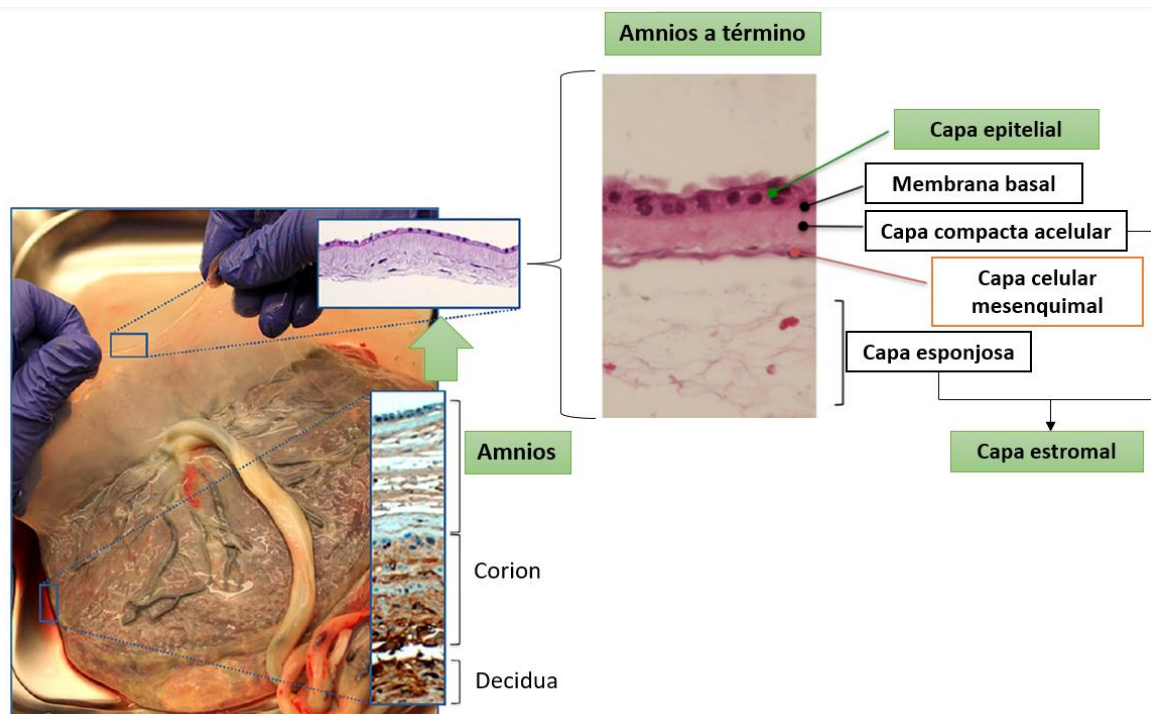


**FIGURA 4.10.** *Placenta humana a término de la gestación.* Durante el proceso de aislamiento, la remoción de membrana amniótica, de aspecto delgado y semitransparente, se realiza de forma manual. Abajo, se observa una sección histológica de placenta, señalando hacia arriba (flecha verde) la estructura del amnios y, hacia la derecha, una visión aumentada de su histología (tinción H-E), señalando las respectivas capas amnióticas. Extraído y modificado a partir de las referencias (186,187).

Histológicamente, la hAM posee 3 diferentes capas: una capa epitelial, una lámina basal gruesa y una capa estromal. Esta última, a su vez, se compone de una capa compacta acelular, una capa celular mesenquimatosa y una capa esponjosa (Fig. 4.10 y 4.11) (11,186,187).

El epitelio amniótico es una monocapa continua de células cuya forma varía entre cuboidal y cilíndrica, de acuerdo a la región amniótica donde se encuentren (13,183,189).

Estas células se conocen como hAECs, poseen una gran cantidad de microvellosidades en su superficie y cumplen funciones tanto secretoras como de transporte celular (13,183). Sus núcleos son irregulares y presentan abundantes vesículas pinocíticas, así como un activo aparato de Golgi, para el cumplimiento de funciones metabólicas durante la gestación, como la producción y liberación de citoquinas y factores de crecimiento hacia el líquido amniótico (183).

Adosada al epitelio amniótico, se encuentra la membrana basal amniótica, la cual es una de las más gruesas de todos los tejidos humanos (187). Contiene altas concentraciones de colágenos tipo IV, V y VII, junto con fibronectina y laminina. También, posee abundantes proteoglicanos ricos en heparán sulfato, que sirven como una barrera permeable para macromoléculas, y además varias moléculas con funciones estructurales que mantienen la integridad del amnios, tales como actina, espectrina, ezrina y vimentina (188,190).

La membrana basal se conecta con el estroma o tejido conectivo amniótico, el cual en su parte más proximal presenta una capa compacta acelular compuesta por fibronectina, colágenos intersticiales tipo I y III, dispuestos en haces paralelos, más colágenos tipo V y VI que forman conexiones filamentosas entre los colágenos intersticiales y la membrana basal amniótica (191). Luego, esta zona acelular se continúa con la capa celular mesenquimal, la cual posee células fibroblásticas inmersas en una malla de fibras reticulares y denominadas células mesenquimales estromales amnióticas humanas (hAMSCs), correspondientes al segundo tipo celular de la hAM (11,191). Finalmente se encuentra la capa esponjosa, la cual separa a la membrana amniótica del corion placentario. Esta capa es rica en elastina, proteoglicanos hidratados como perlecan, glicoproteínas que absorben agua y fibras de colágeno tipo III organizadas de forma laxa (191). A continuación, se ilustran las 5 capas histológicas de la hAM (Fig. 4.11).

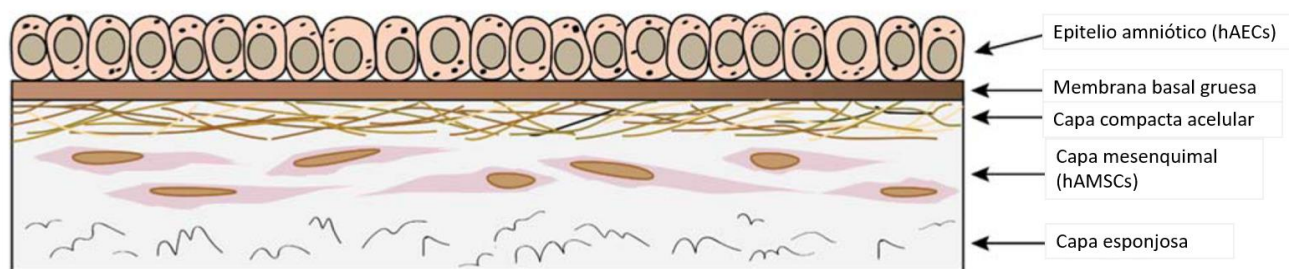


**FIGURA 4.11.** *Capas de la membrana amniótica humana (hAM).* En la superficie se aprecian las células epiteliales amnióticas humanas (hAECs) en monocapa y forma cuboidea. Bajo la membrana basal, en el estroma, se aprecian las células estromales mesenquimales amnióticas humanas (hAMSCs) de forma ahusada. Extraído de la referencia (190).

#### **4.4.3. La hAM como fuente de células madre.**

La membrana amniótica humana (hAM) presenta dos poblaciones celulares heterogéneas, las hAECs y las hAMSCs, las que han sido extensamente caracterizadas gracias a sus propiedades biológicas y al hecho de que pueden ser aisladas con facilidad (192,193). Este proceso comienza con la separación mecánica de la hAM del corion subyacente, a través de la capa esponjosa amniótica, y luego continúa con digestiones enzimáticas en diferentes concentraciones y períodos de tiempo. Se suele utilizar tripsina o dispasa para liberar las hAECs desde la membrana basal amniótica, mientras que las hAMSCs pueden obtenerse con el uso subsecuente de colagenasa (194).

A pesar de sus diferencias en morfología, ubicación y expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales, tanto hAECs como hAMSCs se caracterizan por la presencia de marcadores de células madre embrionarias, como el factor de transcripción-4 de unión a octámero (OCT-4), el cual regula y mantiene la pluripotencialidad en las células embrionarias (184,195,196). Otro aspecto que comparten las células amnióticas es su negatividad en la expresión de marcadores hematopoyéticos, presentes en el corion placentario adyacente. De este modo, dicha negatividad es utilizada para descartar la contaminación con células hematopoyéticas y confirmar la pureza celular amniótica (196). El perfil de marcadores de hAECs y hAMSCs se resume en la figura 4.12.

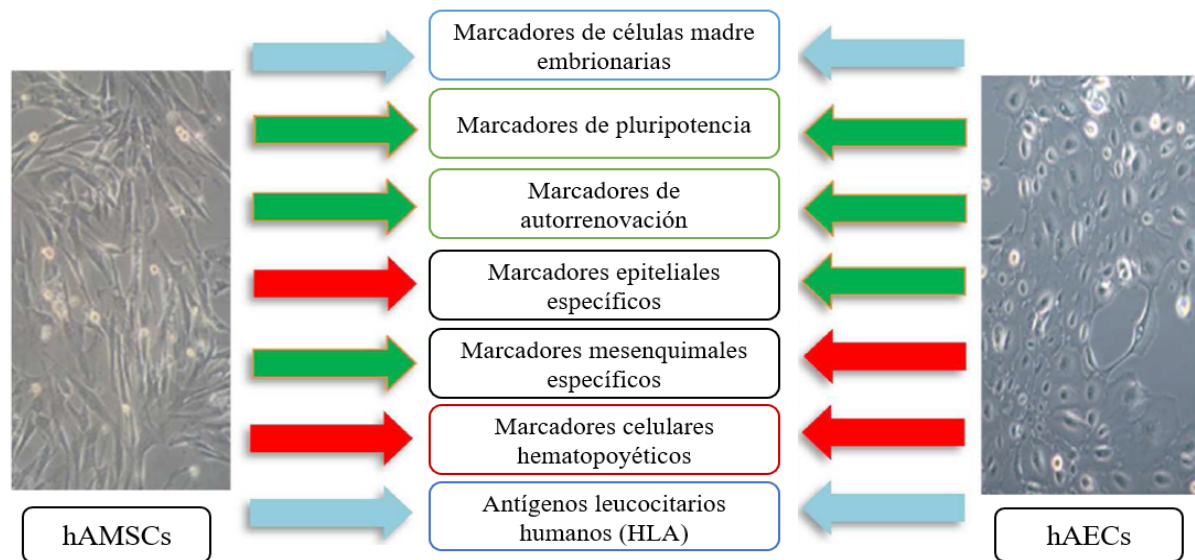


**FIGURA 4.12.** Esquema ilustrativo de los marcadores expresados por las células epiteliales amnióticas humanas (hAECs) y las células estromales mesenquimales amnióticas humanas (hAMSCs). Las flechas verdes indican expresión positiva, las flechas rojas muestran expresión negativa y las flechas celestes señalan expresión variable.

Extraído y modificado de la referencia (196).

#### 4.4.3.1. Células epiteliales amnióticas humanas (hAECs).

Originadas a partir del epiblasto embrionario, las hAECs son células mayoritariamente cuboides, aunque pueden adquirir una forma cilíndrica en la región amniótica que cubre el disco placentario, y una forma aplanada en la región amniótica libre exterior a la placenta. A pesar de su heterogeneidad morfológica y fisiológica, debido a su localización, las hAECs comparten la expresión de determinadas moléculas que les otorga características de células madre. Primero, expresan marcadores de superficie asociados a células madre embrionarias, como son los antígenos embrionarios específicos de etapa 3 y 4 (SSEA-3 y SSEA-4), y los antígenos de rechazo tumoral TRA-1-60 y TRA-1-81. Y segundo, las hAECs expresan factores de transcripción específicos de pluripotencialidad como SOX-2, Nanog, Rex-1 y OCT-4, previamente mencionado (11,197–201).

Además de su origen embrionario, las hAECs poseen otras cualidades intrínsecas y beneficiosas, como tolerancia inmunológica y la secreción de moléculas antiinflamatorias,

antibacterianas, factores de crecimiento y citoquinas relacionadas con procesos regenerativos (187,200,202), las que se ilustran en la figura 4.13.

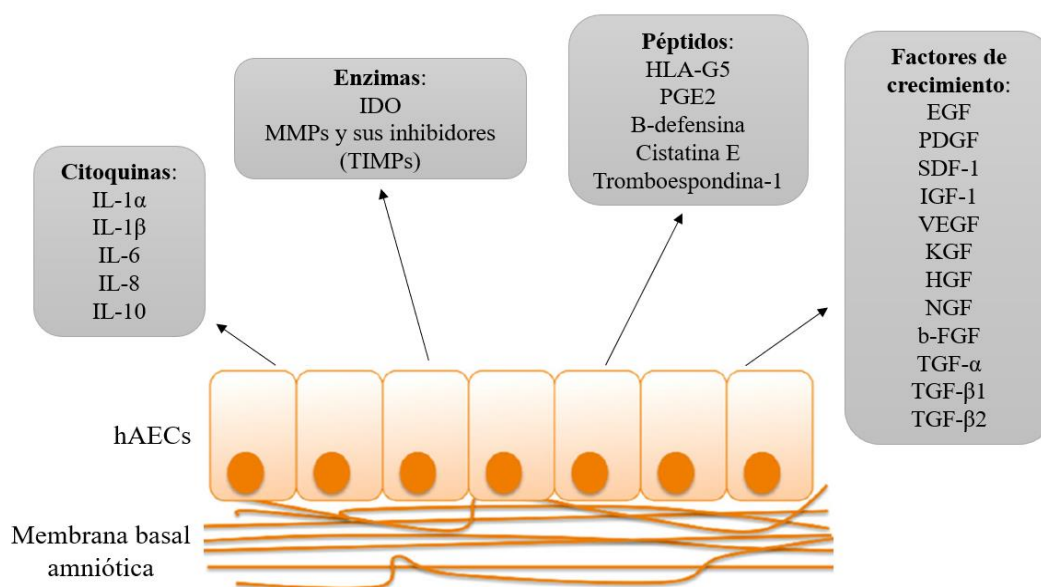


**FIGURA 4.13.** *Moléculas secretadas por las hAECs.* Estas incluyen citoquinas (interleuquinas-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -6, -8 y -10), enzimas (IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa; MMPs: metaloproteinasas de matriz; TIMPs: inhibidores de metaloproteinasas tisulares), péptidos (HLA-G5: forma soluble del antígeno leucocitario humano G; PGE2: prostaglandina E2;  $\beta$ -defensina: antimicrobiano; Cistatina E: antiviral; Tromboespondina-1: factor antiangiogénico), y factores de crecimiento (EGF: factor de crecimiento epidermal; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; SDF-1: factor 1 derivado de células estromales; IGF-1: factor 1 de crecimiento insulínico; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; KGF: factor de crecimiento de queratinocitos; HGF: factor de crecimiento hepatocitario; NGF: factor de crecimiento nervioso; bFGF: factor de crecimiento fibroblástico; TGF- $\alpha$ , - $\beta$ 1 y - $\beta$ 2: factor de crecimiento transformante).

Elaborado a partir de la referencia (187).

Por otra parte, las hAECs también poseen la capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia células de las tres líneas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Incluso, bajo condiciones de cultivo específicas, las hAECs pueden experimentar diferenciación hepática

y expresar marcadores típicos de hepatocitos maduros, como albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína y  $\alpha$ 1-antitripsina (203,204). Además, recientemente se demostró que las hAECs son capaces de formar estructuras similares a capilares cuando son cultivadas en condiciones angiogénicas, lo que lleva a hipotetizar su potencial diferenciación hacia otras células hepáticas, como las células endoteliales sinusoidales (LSEC), de este modo ampliando las expectativas que se tienen sobre las células amnióticas y su uso con fines regenerativos en hepatopatías (205).

Hasta la fecha, sin embargo, la diferenciación de las hAECs hacia hepatocitos ha sido la más investigada y caracterizada, incluso llegando a evidenciar que las hAECs obtenidas del amnios libre y del amnios circundante al cordón umbilical son mucho más susceptibles a la adquisición de características hepatocitarias (206). Por otro lado, gracias a la diferenciación *in vitro*, se sugirió que el microambiente hepático y su MEC por sí mismos son capaces de proporcionar condiciones adecuadas e inducir la diferenciación hepatocitaria de las hAECs. Esto se pudo corroborar *in vivo* gracias al uso de modelos experimentales, en los cuales las hAECs fueron trasplantadas y lograron insertarse en el hígado exitosamente a través de la diferenciación hacia hepatocitos (202).

Otra ventaja que representan las hAECs es que pueden ser colectadas, aisladas y almacenadas adecuadamente para uso clínico. A partir de una sola membrana amniótica se pueden aislar aproximadamente 120 millones de células epiteliales viables, las que pueden ser mantenidas en cultivos y medios de criopreservación libres de componentes de origen animal (*xeno-free*), cuyo uso ha demostrado una preservación exitosa de las hAECs, con ausencia de contaminantes y mantención de viabilidad, pureza, capacidad proliferativa, propiedades inmunomoduladoras y expresión de moléculas propias de células madre luego del proceso de descongelación, incluso después de años de almacenamiento (207–209).

Lo anterior afirma el potencial de las hAECs como células madre y, además, favorecen el interés en su utilización con fines terapéuticos en enfermedades hepáticas.

#### **4.4.3.2. Células mesenquimales estromales amnióticas humanas (hAMSCs).**

Derivadas del hipoblasto embrionario, las hAMSCs son células ahusadas y similares a fibroblastos que se encuentran distribuidas irregularmente en la capa mesenquimal del estroma amniótico e impregnadas entre fibras reticulares. De características más bien homogéneas, también expresan moléculas propias de las células madre embrionarias, como

los antígenos embrionarios SSEA-3 y SSEA-4 y los marcadores de pluripotencialidad OCT-4, Nanog, SOX-2 y Rex-1 (11,210,211).

Al igual que las hAECs, las hAMSCs también son capaces de diferenciarse en células de las tres capas germinales, no forman teratomas y son inmunológicamente privilegiadas (195,212,213). Si bien no han sido investigadas tan profundamente como las hAECs, las hAMSCs han demostrado ser una fuente de células mesenquimales más eficiente que la médula ósea (BM-MS), debido a su capacidad proliferativa superior y a una mayor tasa de crecimiento a largo plazo (214). En efecto, los datos evidencian que las hAMSCs expandidas de manera *in vitro* son células homogéneas, genéticamente estables, seguras y biológicamente activas (215), incluso con la utilización de medios de cultivo *xeno-free*, que son diferentes a los medios comúnmente utilizados (214).

En vista del potencial uso terapéutico que se pretende dar a estas células madre, es necesario destacar la importancia del uso de medios de cultivo y preservación de tipo *xeno-free*, debido a que estos impiden la contaminación de las células en expansión con componentes de origen animal, como virus, priones y proteínas, que pueden ser retenidas en el citoplasma de las células y desencadenar reacciones inmunes en los pacientes cuando son trasplantadas (214).

Además de garantizar la seguridad en terapia celular y medicina regenerativa, estos medios, elaborados en base a suplementos de origen humano como suero sanguíneo de cordón umbilical a término, también aseguran la mantención de las propiedades proliferativas, pluripotenciales e inmunomoduladoras de las células madre, tanto en hAMSCs como en hAECs (214).

Finalmente, ambas poblaciones celulares amnióticas poseen características beneficiosas y propias de células madre, que hacen de la membrana amniótica humana un elemento prometedor y atractivo para su aplicación terapéutica.

#### **4.4.4. Propiedades y beneficios de la hAM.**

Estudios *in vitro* han demostrado que la hAM y sus células poseen diversas propiedades biológicas, incluyendo efectos inmunomoduladores, antifibróticos, angiogénicos y reepitelizantes, los cuales están estrechamente vinculados a la acción regenerativa. Tales efectos son debidos a la secreción de una gran variedad de citoquinas,

péptidos y factores de crecimiento que actúan de forma paracrina (216–219). Además, recientemente se descubrieron propiedades amnióticas antimicrobianas y antitumorales, lo que favorece aún más la utilización de la hAM (9).

Por otra parte, la membrana basal y la MEC amnióticas en sí también poseen una estructura que otorga propiedades bioquímicas, promoviendo diversos procesos biológicos. Estos procesos ocurren fundamentalmente por la interacción entre los ligandos moleculares de la MEC amniótica y los receptores de las células que se contactan con la membrana amniótica (11).

#### **4.4.4.1. *Propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias.***

La hAM puede servir como una barrera física, confinando células inflamatorias y reduciendo la secreción de mediadores estimulantes en el área de la injuria. El ácido hialurónico presente en el estroma amniótico participa en la adhesión de células inflamatorias, ya que actúa como un ligando para el antígeno CD44 expresado en dichas células (188). Además, esta capacidad de adhesión de la MEC amniótica también induce apoptosis en las células inflamatorias inmersas en la matriz, a través de agentes pro-apoptóticos (220).

La modulación de la inflamación es clave para la restauración de la integridad del tejido y las células amnióticas liberan moléculas bioactivas que actúan sobre el componente inmune innato y adaptativo, como IL-10, PGE2 y el antígeno leucocitario HLA-G, favoreciendo la resolución del proceso inflamatorio (221,222). Las hAMSCs, por su lado, además de secretar factores solubles, también son capaces de ejercer su acción inmunomoduladora a través del contacto celular directo con células inmunes activadas del microambiente (223).

Particularmente, la expresión del antígeno leucocitario humano G (HLA-G) en las células amnióticas se asocia a propiedades tolerogénicas e inmunosupresoras durante la gestación. Además, la poca o nula expresión de antígenos HLA clase Ia y HLA clase II confiere un perfil de baja inmunogenicidad a las células amnióticas. Por lo tanto, estas células se consideran inmunorreguladoras e inductoras de la tolerancia inmune (11,14,224,225).

En el sistema inmune innato, las células amnióticas inhiben la citotoxicidad de las células NK regulando negativamente sus receptores, debido al aumento de la producción de

IL-10 y PGE2. Además, las células amnióticas impiden el desarrollo de una respuesta inmune inhibiendo la migración de monocitos, macrófagos y neutrófilos, de paso reduciendo la producción de citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  (226,227). También, se demostró que las células amnióticas inducen la diferenciación de macrófagos desde un fenotipo proinflamatorio (M1) hacia uno antiinflamatorio (M2), especialmente las hAMSCs, gracias a su producción de IL-10 e IL-6, lo cual promueve la resolución de la inflamación tisular (226,228). Incluso, se comprobó que la membrana amniótica criopreservada mantiene su potencial inmunomodulador, al promover el fenotipo M2 en los macrófagos a pesar de la presencia de estímulos inflamatorios (229).

Por otra parte, las células amnióticas también actúan sobre las células dendríticas modificando su función presentadora de antígenos, al inhibir su generación, maduración y capacidad de estimular la proliferación de células T CD4(+) y T CD8(+). También, se ha demostrado que, en presencia de células amnióticas, las células dendríticas inducen la diferenciación de células T hacia células T reguladoras, cuya función es suprimir a otras células inmunes. Estas acciones se deben fundamentalmente a la secreción del antígeno HLA-G por parte de las células amnióticas (226).

Tanto células inmunes innatas como adaptativas presentan receptores para el antígeno HLA-G, por ende, son susceptibles a experimentar sus efectos inmunosupresores. En el sistema inmune adaptativo, HLA-G inhibe la proliferación de células T e inactiva a las células T efectoras CD8(+). Mientras que, en las células B, HLA-G inhibe su proliferación, quimiotaxis y secreción de inmunoglobulinas (226). También se ha demostrado que las hAMSCs son capaces de suprimir fuertemente la proliferación y diferenciación de las células B, impidiendo su maduración terminal hacia células plasmáticas (230).

Estas propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias presentes en las células amnióticas, inicialmente demostradas de manera *in vitro*, ya han sido confirmadas en estudios preclínicos (230), lo que favorece el uso de la hAM para suprimir respuestas inmunológicas, inducir tolerancia y revertir el daño tisular inflamatorio.

#### **4.4.4.2. Propiedades angiogénicas y antiangiogénicas.**

Las propiedades angiogénicas son una importante contribución para la acción regenerativa y desde hace años han sido atribuidas al amnios humano. Sin embargo, este

también posee propiedades antiangiogénicas (231). Recientemente, se demostró que el epitelio amniótico inhibe la angiogénesis, mientras que el mesénquima promueve la neovascularización (9,220).

Las propiedades angiogénicas surgen gracias a la secreción de factores angiogénicos como angiopoyetina-2, IL-6, IL-8, EGF, bFGF, PDGF, VEGF y factor de crecimiento placentario (PlGF), producidos por las hAMSCs alojadas en el mesénquima amniótico (9,220,231).

Por otra parte, las propiedades antiangiogénicas se deben a la secreción de factores como trombospondina-1, endostatina, factor derivado de pigmento epitelial (PEDF) e inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs-1, -2, -3 y -4), liberados por las hAECs (9,220,232).

En vista de lo anterior, y considerando la aplicación terapéutica de la hAM, es fundamental el uso del amnios en una orientación acorde a los efectos deseados (9).

#### **4.4.4.3. *Propiedades reepitelizantes.***

La epitelización es una propiedad importante de la hAM y está descrita como un mecanismo esencial para la curación de heridas dermatológicas, sin embargo, también puede asociarse a la regeneración tisular en epitelios de otros órganos (9).

La hAM actúa como un andamio que promueve migración, adhesión y diferenciación celular epitelial, al mismo tiempo que previene la apoptosis de células epiteliales (188). Estas acciones se deben a la secreción de factores como EGF, IL-8, IGF-1, bFGF y HGF, por parte de las células amnióticas (9,188,231).

También se ha reportado que algunas moléculas de la MEC amniótica promueven adhesión y migración celular epitelial, entre ellas fibronectina, laminina-1, laminina-5 y colágenos tipo I, III, IV, V y VII (9,231). Entonces, tanto células como estroma amnióticos pueden tener efectos regenerativos en tejidos epiteliales dañados.

#### **4.4.4.4. *Propiedades antitumorales.***

La formación de tumores está estrechamente relacionada con las células madre pluripotenciales de origen embrionario. Sin embargo, a diferencia de otras células madre embrionarias, las células amnióticas no son tumorigénicas después de ser trasplantadas

(186,233). En efecto, no se ha reportado la formación de teratomas (tumores de células germinativas) *in vivo* por parte de células madre derivadas de la hAM, y tampoco se ha observado crecimiento de tumores cuando han sido trasplantadas en voluntarios humanos (233).

Esta propiedad se debería a la estabilidad genética de las células amnióticas, tanto en hAECs como en hAMSCs, en vista de que, primero, la placenta humana y sus membranas son un tejido neonatal que posee mucho menos daño ambiental y adquirido por la edad en su DNA (184,186). Y segundo, las células amnióticas presentan un estado epigenético único, de modo que les otorga la capacidad de diferenciarse hacia células de las tres capas germinales y sin la formación de tumores (186).

Otro hecho que garantiza la estabilidad genética de las células amnióticas es que no expresan la enzima telomerasa transcriptasa inversa (TERT), la cual promueve el crecimiento celular neoplásico y carcinogénico (184). Por otro lado, también se ha demostrado que la viabilidad de las células cancerígenas disminuye en presencia de células amnióticas *in vitro*, lo que lleva a hipotetizar que estas células secretan factores que promueven la muerte de las células neoplásicas, finalmente impidiendo el crecimiento de tumores (233).

Ahora bien, mientras los potenciales efectos anticancerígenos de las células amnióticas necesitan más estudios, la ausencia de tumorigenicidad luego de aplicar o trasplantar células derivadas de hAM otorga un grado de seguridad para su uso terapéutico en pacientes.

#### **4.4.4.5. Propiedades antibacterianas.**

De forma natural, la placenta y las membranas fetales producen componentes antimicrobianos. Por su parte, la hAM se destaca por su secreción de  $\beta$ -defensinas, las cuales son los principales péptidos antimicrobianos amnióticos (11,220). Incluso, la  $\beta$ 3-defensina es considerada una parte importante del sistema inmune innato (220).

Además, las células amnióticas expresan otras moléculas con fuertes capacidades antimicrobianas y antiinflamatorias, como elafina e inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora (SLPI) (220).

Gracias a los componentes mencionados, se ha demostrado que la hAM posee efectos antimicrobianos *in vitro* en una gran variedad de bacterias, incluyendo *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (11,226).

#### **4.4.4.6. Propiedades antifibróticas.**

Está bien descrito que la hAM acelera la curación de heridas con una mínima formación de tejido cicatricial. Esto se debe a la regulación negativa de TGF- $\beta$ 1, la principal isoforma del factor TGF- $\beta$  encargada de inducir la activación de miofibroblastos y con ello, la respuesta fibrogénica (11,220). A su vez, el principal inhibidor de TGF- $\beta$ 1 es el ácido hialurónico que se encuentra en el estroma amniótico (220,226).

Por otro lado, hay estudios que demuestran que las hAECs producen la isoforma TGF- $\beta$ 3, cuya acción previene la migración y proliferación de células inflamatorias, oponiéndose a los efectos de TGF- $\beta$ 1 y actuando como un factor antifibrótico (195).

También, se reportaron características antifibróticas en exosomas derivados de hAECs. Estas vesículas extracelulares contienen diversas proteínas involucradas en vías de señalización celular, y además portan una gama de microRNAs (miRNAs) que controlan mecanismos de señalización en fibrosis, como las vías de PI3K-Akt y de TGF- $\beta$ . Dentro de estos miRNAs destacan miR-27a y miR-34a, los cuales afectan la proliferación y diferenciación de miofibroblastos, de este modo reprimiendo el proceso fibrogénico (195).

Hasta la fecha, la hAM ha demostrado diversas propiedades beneficiosas para la restauración de los tejidos, lo cual es el pilar de la medicina regenerativa. Dichas propiedades se ilustran en la figura 4.14.

Además de sus células (hAECs y hAMSCs), las cuales poseen características de células madre, la MEC amniótica y sus componentes estructurales también juegan un papel importante en estas propiedades, en vista de que son capaces de actuar como ligandos para las células que entran en contacto con la hAM, de este modo desencadenando sus efectos de forma sinérgica junto a los factores solubles liberados por las células amnióticas.

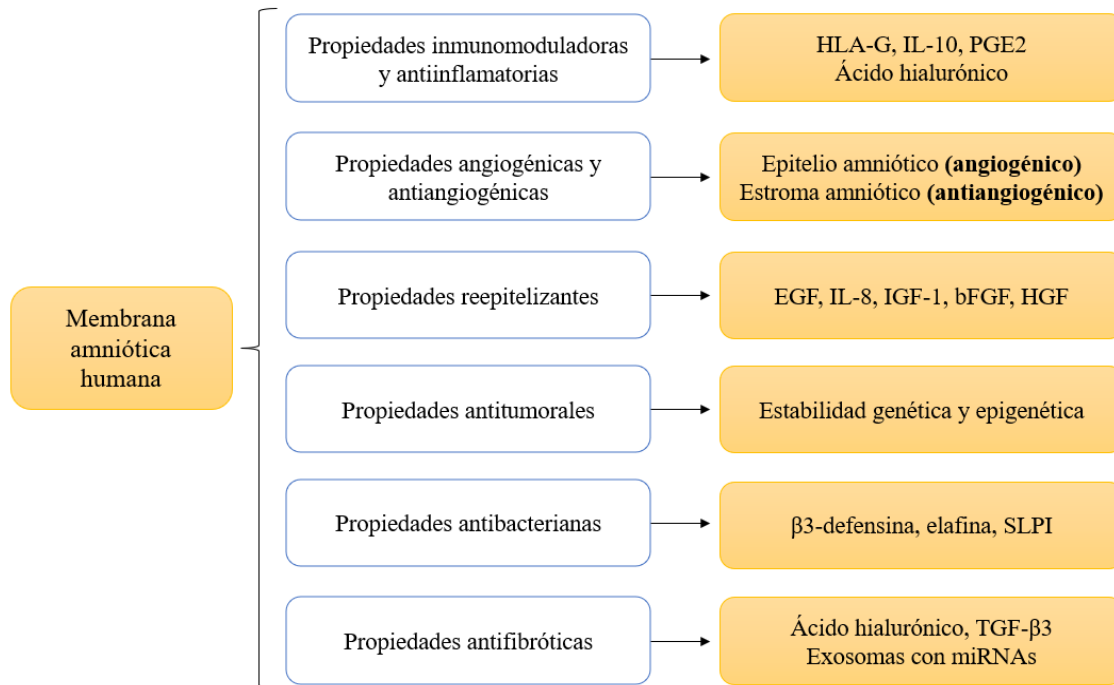


**FIGURA 4.14.** Principales propiedades de la membrana amniótica humana (hAM) descritas hasta la fecha, con sus respectivos fundamentos. HLA-G: antígeno leucocitario humano G; IL-10: interleuquina-10; PGE2: prostaglandina E2; EGF: factor de crecimiento epidermal; IL-8: interleuquina-8; IGF-1: factor 1 de crecimiento insulínico; bFGF: factor de crecimiento fibroblástico; HGF: factor de crecimiento hepatocitario; SLPI: inhibidor de proteasa leucocitaria secretora; TGF- $\beta$ 3: factor de crecimiento transformante  $\beta$ 3. Elaborado en base a las referencias (9,11).

## 4.5. EFECTOS DEL USO DE hAM EN FIBROSIS HEPÁTICA.

En la última década se han realizado diversos estudios experimentales en modelos de fibrosis hepática con resultados alentadores, los cuales implican tanto el uso de hAM intacta como de células amnióticas y sus derivados (232,234).

### 4.5.1. Trasplante de células amnióticas.

El trasplante o infusión de células madre es uno de los principales métodos de la terapia celular y, en el último tiempo, se ha comprobado que las células derivadas de la hAM poseen características beneficiosas que las convierten en una herramienta promisoriosa,

especialmente para el tratamiento de hepatopatías progresivas como la fibrosis hepática (232,234).

Entonces, en vista de sus cualidades de células madre, hAECs y hAMSCs, así como sus medios condicionados, han demostrado potentes efectos antifibróticos en modelos preclínicos, los cuales serán analizados en las siguientes secciones.

#### **4.5.1.1. Efectos del trasplante de hAECs.**

Las hAECs fueron las primeras células amnióticas en ser aisladas y testeadas en modelos murinos de fibrosis hepática, inducida principalmente por administración de tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ). Utilizando este modelo, Manuelpillai y colaboradores demostraron que el trasplante de hAECs reduce la inflamación, gracias a la disminución de las citoquinas proinflamatorias  $\text{TNF-}\alpha$  e IL-6, y también la fibrosis, debido a la reducción de miofibroblastos hepáticos productores de MEC y la menor tasa de apoptosis de hepatocitos, los cuales generan señales profibrogénicas (235). Además, se observó que las hAECs trasplantadas fueron capaces de insertarse en el hígado de los roedores, encontrándose principalmente en espacios portales y parénquima hepático adyacente, sin infiltración de células inflamatorias y sin evidencia de rechazo tisular (235).

Siguiendo esta línea de investigación, más tarde el mismo grupo demostró que, bajo la administración continua de  $\text{CCl}_4$  en simulación de una injuria crónica, el trasplante de doble dosis de hAECs redujo significativamente la fibrosis hepática en los ratones tratados, además de los niveles de señalización de la citoquina fibrogénica  $\text{TGF-}\beta$  y de las HSC activadas, evaluadas por inmunohistoquímica a través de  $\alpha$ -SMA (236). También, se comprobó la inducción del fenotipo antiinflamatorio M2 en los macrófagos hepáticos, los cuales poseen una elevada plasticidad celular de acuerdo a las condiciones del microambiente tisular. Entonces, se hipotetizó que la presencia de hAECs promueve la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo restaurador, promoviendo la regeneración del tejido (236).

Por otra parte, es bien sabido que las hAECs son capaces de diferenciarse hacia hepatocitos tanto *in vitro* como *in vivo*. En este contexto, Lin y colaboradores midieron los efectos del trasplante de hAECs puras y de hAECs diferenciadas previamente a hepatocitos *in vitro*, a través de inyección esplénica, en ratas con cirrosis inducida por tioacetamida (TAA). Se comprobó que ambos tipos celulares se incorporaron en los hígados de los

roedores, actuando como hepatocitos funcionales, mejorando el tejido hepático y disminuyendo la cantidad de nódulos cirróticos (237). También, estos hallazgos confirman la diferenciación hepatocitaria *in vivo* de las hAECs y su supervivencia en el tejido hepático, lo cual contrarresta las limitaciones que presenta la diferenciación *in vitro* al generar hepatocitos de un aspecto más bien fetal, que carecen de funciones metabólicas completas. Entonces, se puede sostener que la capacidad de diferenciación *in vivo* de las hAECs genera hepatocitos de aspecto maduro, gracias al microambiente tisular íntegro en el que se incorporan, ayudando a la restauración del hígado (237).

En otro modelo murino de fibrosis hepática, inducido por ligadura de ducto biliar (BDL), Cargnoni y colaboradores demostraron que las hAECs trasplantadas actúan de manera intensa sobre las células precursoras de miofibroblastos hepáticos, correspondientes a fibroblastos portales y HSC, reduciendo su activación y transdiferenciación miofibroblástica, especialmente en fibroblastos portales (238). También, se evidenció una notable reducción de las cantidades de colágeno y fibronectina gracias a la infusión de hAECs. Además, en este mismo estudio se descubrió que las hAECs también actúan sobre las células epiteliales biliares, disminuyendo su proliferación en los espacios periportales. Este hallazgo sostiene que las hAECs inhiben la reacción ductal, la cual es un evento característico de la fibrosis hepática de origen biliar, así disminuyendo el entorno inflamatorio que fomenta la fibrogénesis hacia el resto del parénquima hepático. Por lo tanto, este estudio concluyó que las hAECs trasplantadas actúan principalmente sobre células fibrogénicas ubicadas en los espacios portales (238).

Por otra parte, se descubrió que los medios condicionados de hAECs (hAEC-CM), obtenidos a partir del cultivo de estas células, también son capaces de atenuar la fibrosis hepática (239,240), sugiriendo que la presencia de factores solubles liberados por las hAECs serían los responsables del efecto antifibrótico. Para corroborar esto, Alhomrani y colaboradores aislaron vesículas extracelulares de hAECs (hAEC-EV), las cuales contienen una carga de proteínas determinadas, y analizaron sus efectos *in vitro* e *in vivo*. Los hallazgos indicaron que las hAEC-EV participan activamente en comunicación celular, incluso modificando el fenotipo y destino de sus células blanco. Además, se comprobó que las hAEC-EV también reducen el número de HSC y su producción de colágeno, en conjunto con una disminución de la señalización de TGF- $\beta$  (239).

El estudio de Alhomrani y col. también contempló un análisis proteómico que identificó más de 160 diferentes proteínas que conforman el secretoma de las hAECs, el cual actúa a través de vesículas extracelulares que son liberadas por las hAECs hacia el espacio extracelular hepático, finalmente ejerciendo sus efectos restauradores (239).

En vista de estos beneficios, más las múltiples injurias hepáticas que desencadenan el proceso fibrogénico, Kuk y colaboradores evaluaron el trasplante de hAECs y de hAEC-CM en un modelo murino de fibrosis hepática por esteatohepatitis no alcohólica (NASH), para examinar los efectos de los factores solubles liberados por estas células (240). Y en efecto, los hallazgos confirmaron nuevamente la acción antifibrótica de las hAECs y su secretoma, contenido en el hAEC-CM, con una reducción de la fibrosis hepática cercana al 40%, más la disminución de la señalización de TGF- $\beta$  y del número de HSC activadas, y un aumento de las MMPs -2 y -9, las cuales degradarían el contenido de colágeno tisular (240).

Recientemente, se descubrió otro mecanismo de acción de las hAECs trasplantadas, gracias al estudio de Hodge y colaboradores (241), quienes establecieron que, además de reducir la inflamación y fibrosis hepáticas, la administración de hAECs durante una injuria crónica promueve la regeneración endógena del hígado, a través de la proliferación de hepatocitos (241). También, se descubrió que las hAECs reducen la activación del compartimento de células progenitoras hepáticas (HPC), el cual prolifera sólo cuando existe un daño crónico severo y la replicación de hepatocitos no es suficiente para compensar la injuria. Entonces, se concluye que la administración de hAECs fomenta la reparación del tejido hepático (241).

Finalmente, se establece que las hAECs y su medio condicionado (hAEC-CM) poseen efectos antifibróticos y regenerativos en modelos preclínicos de fibrosis hepática (Fig. 4.15 y Tabla 4.2), lo que las convierte en una herramienta prometedora para la terapia celular en hepatopatías.

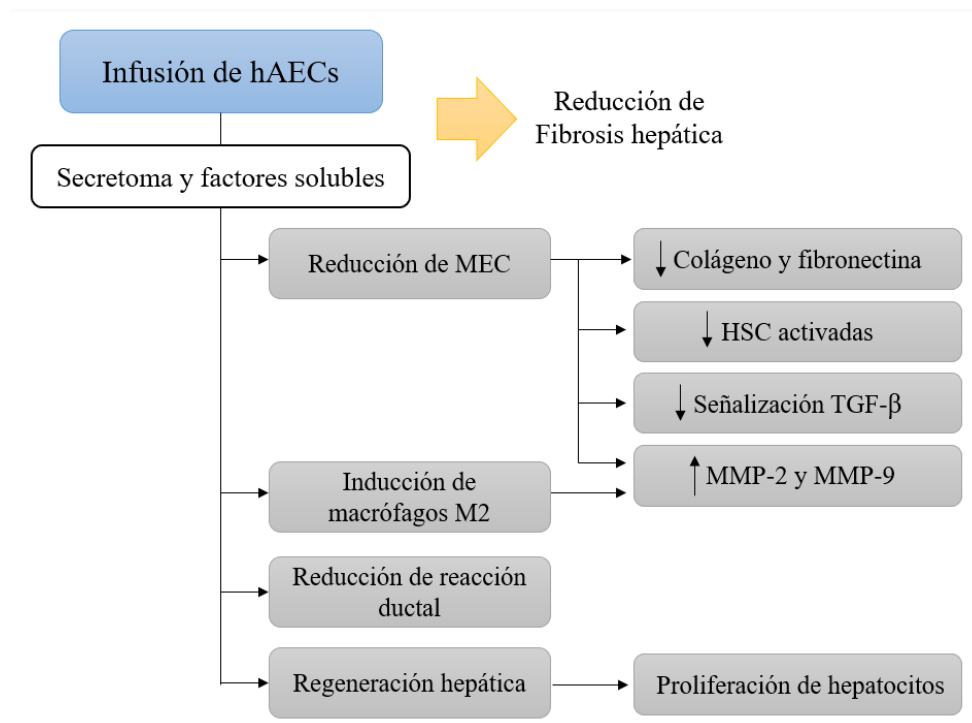


**FIGURA 4.15.** Esquema ilustrativo de los principales efectos antifibróticos del trasplante de células epiteliales amnióticas humanas (hAECs), observados en modelos preclínicos de fibrosis hepática. MEC: matriz extracelular; HSC: células estelares hepáticas; TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante-beta; M2: macrófagos con fenotipo antiinflamatorio y reparativo; MMP: metaloproteinasas de matriz.

#### 4.5.1.2. Efectos del trasplante de hAMSCs.

Además de las hAECs, también se han reportado efectos antifibróticos para la infusión de hAMSCs en la última década.

Utilizando el mismo modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl<sub>4</sub>, Zhang y colaboradores (242) trasplantaron hAMSCs, aisladas desde una placenta a término, con una infusión a través del bazo de ratones, las cuales migraron por la circulación sanguínea hasta los sinusoides hepáticos y luego hacia el parénquima, incorporándose en el tejido hepático y reduciendo las áreas de fibrosis hepática. Además, tras la infusión de hAMSCs se detectó una menor activación de HSC y apoptosis de hepatocitos, en conjunto con un alza en los niveles del factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y en la tasa de proliferación de

hepatocitos. Por lo tanto, se estableció que la infusión de hAMSCs mejora la fibrosis hepática, al mismo tiempo que promueve la regeneración del hígado dañado (242).

Siguiendo esta línea experimental, Kubo y colaboradores (243) demostraron que el trasplante de hAMSCs, además de reducir el depósito de colágeno tipo I, también disminuye la infiltración de macrófagos y la expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP-1), el cual es un potente estímulo para la mantención de la fibrogénesis. Además, se descubrió un alza en la expresión de MMP-9, la que participa en la degradación de la MEC (243).

Por otra parte, Lee y colaboradores investigaron los efectos antifibróticos de una subpoblación de hAMSCs más primitivas, denominada hAMSCs CD34(+), obtenida tras la eliminación de fibroblastos estromales CD34(-) (244). El propósito del aislamiento de esta población de hAMSCs es garantizar mayor seguridad en la terapia celular con células madre mesenquimales (MSC), desde que se comprobó que las MSC en general poseen fibroblastos mesenquimales maduros que pueden eventualmente formar tumores. Entonces, los investigadores probaron la efectividad del trasplante de células madre mesenquimales amnióticas libres de dichos fibroblastos (hAMSCs CD34(+)) y demostraron que la acumulación de colágeno disminuyó aproximadamente en un 50% en los roedores tratados, junto a una menor tasa de activación de HSC y de la señalización fibrogénica de TGF- $\beta$ . Por lo tanto, las hAMSCs CD34(+) se suman como herramienta promisorio y segura para la terapia antifibrótica hepática (244). Sin embargo, se necesitan más estudios sobre esta subpoblación de hAMSCs, en vista de que es relativamente nueva en amnios humano.

Al igual que con el medio condicionado de hAECs (hAEC-CM), se hipotetizó que el medio condicionado derivado de hAMSCs (hAMSC-CM) también posee factores solubles liberados por las hAMSCs. En este contexto, Fu y colaboradores cultivaron HSC primarias de rata con hAMSC-CM, comprobando que éste es capaz de regular las funciones de las HSC, disminuyendo su activación y proliferación (245). Finalmente, este estudio concluyó que las hAMSCs tienen un papel inhibitorio sobre las principales células fibrogénicas hepáticas (HSC), mediante señalizaciones paracrinas, así promoviendo la degradación de MEC por parte de las MMPs, las cuales aumentan sus niveles en presencia de células amnióticas (245).

Recientemente, un estudio llevado a cabo por Pietrosi y colaboradores evaluó el trasplante de células amnióticas en un modelo murino de cirrosis hepática. Los resultados demostraron que, particularmente, las hAMSCs mejoraron de forma significativa la presión sanguínea portal en los roedores tratados, disminuyendo sus niveles, y la función microcirculatoria hepática, la cual se ve seriamente comprometida durante la cirrosis (246). Tras co-cultivar células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) y HSC con hAMSCs, los investigadores también observaron una mejora en el fenotipo de estas células hepáticas, lo cual se asocia a la mejora de la hemodinamia del hígado. Además, se comprobó una notable reducción del nivel de fibrosis hepática, incluso en presencia de un modelo de cirrosis avanzada (246). Esto lleva a hipotetizar que la infusión de hAMSCs podría mitigar el grado de hipertensión portal en pacientes con cirrosis establecida, e incluso disminuir el avance de la enfermedad hacia una etapa terminal.

Gracias a estos estudios, se confirma el potencial antifibrótico de las hAMSCs y su medio condicionado, cuyos principales efectos se ilustran en la figura 4.16.

Finalmente, el trasplante o infusión de ambas poblaciones celulares amnióticas (hAECs y hAMSCs), enlistados en la Tabla 4.2, representan una alternativa terapéutica para retroceder el avance de la fibrosis hepática y restaurar la estructura y función del hígado.

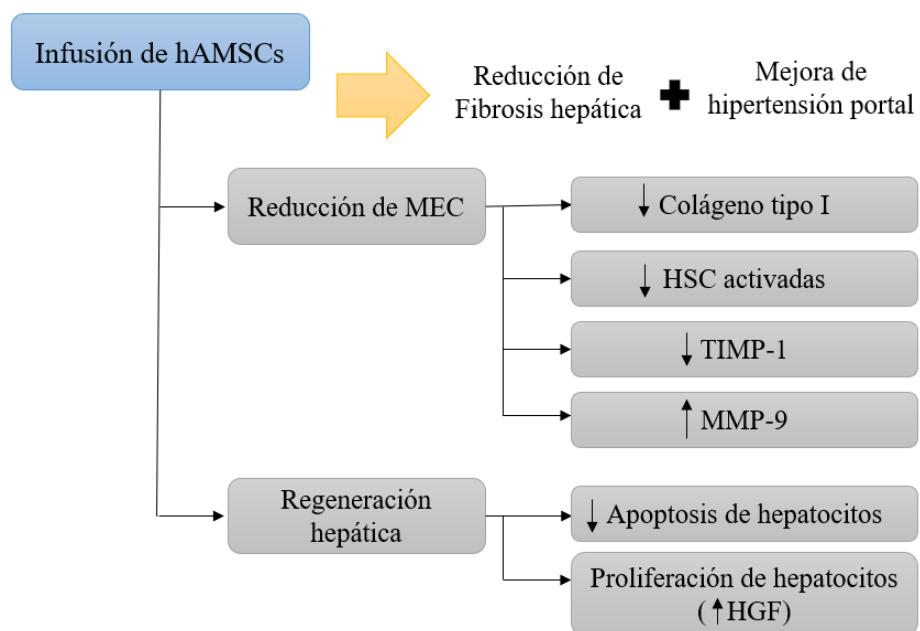


**FIGURA 4.16.** Esquema ilustrativo de los principales efectos antifibróticos del trasplante de células mesenquimales estromales amnióticas humanas (hAMSCs), observados en modelos preclínicos de fibrosis hepática. MEC: matriz extracelular; HSC: células estelares hepáticas; TIMP-1: inhibidor tisular de metaloproteinasas 1; MMP-9: metaloproteinasa de matriz 9; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos.

**TABLA 4.2.** Conjunto de estudios preclínicos que han recurrido al uso y trasplante de células amnióticas humanas y sus derivados para el tratamiento de fibrosis hepática en la última década. [hAECs: células epiteliales amnióticas humanas; CCl<sub>4</sub>: tetracloruro de carbono; TAA: tioacetamida; BDL: ligadura de ducto biliar; hAEC-EV: vesículas extracelulares de células epiteliales amnióticas humanas; hAEC-CM: medio condicionado de células epiteliales amnióticas humanas; hAMSCs: células mesenquimales estromales amnióticas humanas; hAMSCs CD34(+): subpoblación de células mesenquimales amnióticas humanas primitivas; hAMSC-CM: medio condicionado de células mesenquimales estromales amnióticas humanas; HSC: células estelares hepáticas; LSEC: células endoteliales sinusoidales hepáticas].

| Uso y trasplante de células amnióticas humanas |                                                                               |               |                                                 |                                |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------|--------------------------------|
|                                                | Método de uso                                                                 | Tiempo máximo | Modelo experimental                             | Ref.                           |
| hAECs                                          | Trasplante de hAECs frescas en dosis simple                                   | 4 semanas     | Fibrosis hepática inducida por CCl <sub>4</sub> | Manuelpillai et al. 2010 [235] |
|                                                | Trasplante de doble dosis de hAECs frescas                                    | 4 semanas     | Fibrosis hepática inducida por CCl <sub>4</sub> | Manuelpillai et al. 2012 [236] |
|                                                | Trasplante de hAECs puras y hAECs diferenciadas a hepatocitos <i>in vitro</i> | 4 semanas     | Cirrosis inducida por TAA                       | Lin et al. 2015 [237]          |
|                                                | Trasplante de hAECs frescas en dosis simple                                   | 6 semanas     | Fibrosis hepática inducida por BDL              | Cargnoni et al. 2017 [238]     |
|                                                | Trasplante de hAEC-EV                                                         | 4 semanas     | Fibrosis hepática inducida por CCl <sub>4</sub> | Alhomrani et al. 2017 [239]    |
|                                                | Trasplante de hAECs criopreservadas y hAEC-CM                                 | 6 semanas     | Fibrosis hepática inducida por dieta grasa      | Kuk et al. 2019 [240]          |
|                                                | Trasplante de hAECs frescas y hAEC-CM                                         | 4 semanas     | Fibrosis hepática inducida por CCl <sub>4</sub> | Hodge et al. 2020 [241]        |

(continúa)

|        | Método de uso                          | Tiempo máximo         | Modelo experimental                                                                | Ref.                       |
|--------|----------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| hAMSCs | Trasplante de hAMSCs frescas           | 4 semanas             | Fibrosis hepática inducida por CCl <sub>4</sub>                                    | Zhang et al. 2011 [242]    |
|        | Trasplante de hAMSCs frescas           | 4 semanas             | Fibrosis hepática inducida por CCl <sub>4</sub>                                    | Kubo et al. 2015 [243]     |
|        | Trasplante de hAMSCs CD34(+)           | 3 semanas             | Fibrosis hepática inducida por TAA                                                 | Lee et al. 2016 [244]      |
|        | Obtención de hAMSC-CM                  | 48 horas              | Cultivo de HSC primarias de rata fibrótica                                         | Fu et al. 2018 [245]       |
|        | Trasplante y cultivo de hAMSCs frescas | 2 semanas<br>24 horas | Cirrosis inducida por CCl <sub>4</sub><br>Cultivo con LSEC y HSC de rata cirrótica | Pietrosi et al. 2020 [246] |

#### 4.5.2. Aplicación de fragmentos de hAM.

Mientras se estudiaban los potenciales efectos antifibróticos de las células amnióticas (hAECs y hAMSCs) como tal, también se analizaron los efectos de la aplicación de fragmentos íntegros o parches de amnios humano, en vista de su consistencia membranosa, fina y transparente, sobre la superficie de hígados fibróticos murinos, inducidos principalmente por ligadura de ducto biliar (BDL) (202,247).

Utilizando parches de hAM frescos, es decir, dentro de las primeras 24 horas tras su obtención, Sant' Anna y colaboradores demostraron que su aplicación sobre la superficie del hígado de ratas fibróticas reduce la fibrosis hepática aproximadamente en un 50% (248). Tras seis semanas de aplicación de hAM, los hallazgos indicaron una progresión menos severa del proceso fibrogénico, con leves índices de fibrosis confinada en los espacios portales, ausencia de fibrosis intersticial en el parénquima hepático y sin signos de cirrosis. También se observó una menor cantidad de miofibroblastos activados y de reacción ductular. Este estudio concluyó que la aplicación de hAM inhibe la cascada de eventos moleculares y celulares fibrogénicos, impidiendo su progresión hacia la etapa de cirrosis (248). Interesantemente, los investigadores no detectaron células amnióticas en los roedores tratados, por lo tanto, no hubo incorporación celular al tejido hepático huésped. Esto lleva a reafirmar la hipótesis

sobre la acción paracrina de las células amnióticas, mediante la liberación de factores solubles hacia el parénquima hepático (248).

Una vez confirmados los efectos antifibróticos de la hAM fresca en fibrosis hepática experimental, la investigación se dirigió hacia la hAM criopreservada, en vista de las controversias que existen con el uso de amnios fresco, tales como el riesgo de infección por VIH, HCV, HBV o citomegalovirus (CMV), puesto que el periodo de ventana entre la infección y la aparición de anticuerpos detectables puede enmascarar la positividad de la donante de la placenta (220,249). Estos riesgos, más la necesidad de material disponible para volver a analizar y luego trasplantar, promueve el almacenamiento y preservación de la hAM a largo plazo a través de métodos como criopreservación o liofilización (Tabla 4.3) (220).

En base a lo anterior, Ricci y colaboradores investigaron y compararon los efectos antifibróticos entre parches de hAM fresca y hAM criopreservada en un modelo murino de fibrosis hepática (249), debido a que las técnicas de preparación y preservación de amnios pueden influir significativamente en sus propiedades biológicas (220). Sin embargo, este estudio demostró que ambos tipos de hAM, fresca y criopreservada, ejercen los mismos efectos antifibróticos. Los hallazgos indicaron una disminución de la fibrosis hepática, con una reducción en las cantidades de colágeno y fibronectina, de HSC activadas y de los niveles de reacción ductular (249).

Además de evaluar su acción antifibrótica, Ricci y col. analizaron la estructura de ambos tipos de hAM y descubrieron que la hAM criopreservada luce una apariencia más blanquecina y de mayor grosor que la hAM fresca. También se observó que, histológicamente, ambas son similares, pero la hAM criopreservada presentó un número ligeramente reducido de hAECs y un estroma más grueso. Y a través de inmunohistoquímica, se evidenció una mantención del fenotipo e integridad de las células amnióticas en la hAM criopreservada. Estos hallazgos sostienen que tanto la estructura como la acción antifibrótica de la hAM no se ven afectadas por la criopreservación, a excepción de la reducción de células epiteliales. Sin embargo, se reportó en aplicaciones oftalmológicas que la pérdida de algunas células amnióticas no afecta la acción antifibrótica de la hAM, y que la deprivación de células por ciclos de congelación y descongelación no interfiere en la supresión de la señalización de TGF- $\beta$ , la principal citoquina fibrogénica. Y con respecto al engrosamiento del estroma amniótico, esto se debería al aumento de agua tisular que ocasiona el proceso de

criopreservación, así generando hinchazón en la hAM que, por lo visto, tampoco influye en su acción antifibrótica (249).

**TABLA 4.3.** *Caracterización de los métodos más comunes de preservación de amnios humano a largo plazo, utilizados en ámbitos experimentales y clínicos. hAM: membrana amniótica humana. Elaborado en base a las referencias (12,220).*

| Tipo de hAM preservada | Características                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| hAM criopreservada     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Método de preservación más común para la hAM.</li> <li>• Se utiliza un aditivo o criomedio, como el glicerol, en lugar de la congelación directa, para preservar funcionalidad celular.</li> <li>• Almacenamiento por hasta 12 meses a <math>-80^{\circ}\text{C}</math>.</li> <li>• No afecta la estructura histológica de la hAM.</li> <li>• Mantiene propiedades antitumorales, angiogénicas, antiangiogénicas y antibacterianas de la hAM.</li> </ul> |
| hAM liofilizada        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Método de desecación al vacío a baja temperatura, que permite almacenamiento a temperatura ambiente.</li> <li>• Mantiene la estructura histológica de la hAM, pero disminuye su concentración de proteínas y factores de crecimiento.</li> <li>• Requiere esterilización por irradiación gama, la cual no afecta las características morfológicas, físicas y biológicas de la hAM.</li> </ul>                                                            |

Cabe mencionar que, si bien la hAM liofilizada es considerada como método de preservación en aplicaciones clínicas oftalmológicas y ensayos experimentales de diversas patologías, hasta la fecha no se ha reportado su utilización en modelos preclínicos de fibrosis hepática, probablemente por la disminución de la concentración de proteínas y factores solubles que genera el proceso de liofilización, lo cual podría afectar su acción antifibrótica (220). Sin embargo, se necesitan estudios para corroborar lo anterior y verificar si es factible su uso terapéutico en fibrosis hepática.

En un principio los investigadores aplicaron fragmentos de hAM al mismo tiempo de la inducción de la fibrosis, obteniendo resultados positivos (248). Posteriormente, y considerando el contexto clínico de una fibrosis hepática ya establecida, Sant' Anna y colaboradores aplicaron parches de hAM fresca luego de dos semanas de haber inducido la

injuria por BDL en ratas (250). Nuevamente, los hallazgos demostraron una notable disminución de la fibrosis hepática, con una reducción en la cantidad de colágeno cercana al 50% y también en la cantidad de miofibroblastos activados. Además, en este estudio se evaluó la expresión de TGF- $\beta$ , una citoquina fibrogénica y pleiotrópica que actúa sobre la gran mayoría de las células hepáticas y durante todas las etapas de la enfermedad, desde el inicio de la injuria hasta la cirrosis terminal, y cuyo aumento de expresión se correlaciona con la severidad de la fibrosis. Gracias a la aplicación de hAM, se observó una reducción significativa en la señalización de TGF- $\beta$ , aproximadamente de un 62%, lo cual favorece la disminución del proceso fibrogénico y el restablecimiento de la integridad tisular del hígado. Por lo tanto, se concluyó que la aplicación de parches de hAM logra revertir el progreso de la fibrosis hepática al momento de inducir la injuria y una vez ya establecida la enfermedad (250).

Luego, y utilizando el mismo modelo experimental, Sant' Anna y colaboradores evaluaron los efectos de la aplicación de hAM fresca a largo plazo, es decir, por una mayor cantidad de semanas (251). 9 semanas después, mientras las ratas con BDL progresaban a cirrosis avanzada, las ratas tratadas con hAM mostraron fibrosis confinada a los espacios portales, sin signos de cirrosis y con el tejido hepático mejor conservado. Al comparar ambos grupos, se demostró una reducción de la cantidad de colágeno cercana al 55%. Por lo tanto, se concluyó que a mayor tiempo de aplicación de un fragmento de hAM, se produce una mayor reducción de la fibrosis hepática y un mejoramiento de la arquitectura del hígado (251).

Siguiendo el mismo modelo experimental, otro estudio realizado por Garrido y colaboradores aplicó parches de hAM en ratas jóvenes, simulando un contexto de fibrosis hepática causada por atresia de vías biliares, una patología congénita, para evaluar el posible uso terapéutico de amnios en pacientes pediátricos (252). Los hallazgos indicaron una disminución de la fibrosis hepática cercana al 50%, con reducción de los depósitos de colágeno, de la señalización de TGF- $\beta$  y de la expresión de apelina, una molécula involucrada en hepatopatías y cuyos niveles de expresión se correlacionan con la severidad de la fibrosis hepática. Gracias a estas observaciones, se concluyó que la aplicación de parches amnióticos es efectiva en la reducción de fibrosis hepática en hígados juveniles, lo cual apoya un futuro

uso terapéutico infantil, en vista de la complejidad del trasplante hepático en estos pacientes (252).

La mayoría de los experimentos había contemplado la aplicación de fragmentos de hAM en la superficie hepática completa, cubriendo todos los lóbulos del hígado. En este contexto, Mamede y colaboradores evaluaron los efectos de la aplicación total y parcial de hAM, luego de dos semanas de haber inducido la fibrosis por BDL en ratas. Interesantemente, los hallazgos demostraron que la aplicación parcial de amnios, o sea, alrededor de un solo lóbulo hepático, es más efectiva en la reducción de la severidad y extensión de la fibrosis hepática, disminuyendo los depósitos de colágeno en un 80%, en comparación con la aplicación total, que los disminuyó en un 50% (253). Estas observaciones sugieren otro posible mecanismo, distinto de la reducción directa de miofibroblastos, el cual sería la disminución de los niveles de citoquinas inflamatorias y fibrogénicas, más el aumento de MMPs, y posterior a esto, vendría la desaparición de los miofibroblastos. A su vez, estos efectos serían generados mediante la liberación de factores solubles por parte de las células amnióticas, los cuales se difunden por el parénquima hepático desde el lóbulo cubierto con hAM hacia los demás, desencadenando sus efectos a nivel molecular y celular (253).

El estudio de Mamede y col. también se enfocó en los macrófagos hepáticos, los cuales poseen una marcada plasticidad celular de acuerdo a su microambiente. Los resultados mostraron un elevado número de macrófagos en la región periportal de las ratas tratadas con hAM, lo que, junto a las bajas cantidades de colágeno, sugiere la presencia de macrófagos restaurativos (M2) y capaces de expresar MMPs y citoquinas antiinflamatorias que promueven la restauración hepática. Como conclusión, este estudio sugirió que no sería necesaria la aplicación de hAM sobre la superficie del hígado completo, puesto que la acción antifibrótica se ejerce de todas maneras y de una forma muy efectiva (253).

Finalmente, los estudios experimentales en torno a la aplicación terapéutica de parches de hAM en modelos de fibrosis hepática, enlistados en la tabla 4.4, nos revelan resultados prometedores y que apoyan la utilización de amnios para el tratamiento de esta patología en pacientes, en vista de sus efectos antifibróticos tanto a nivel celular como molecular, ilustrados en la figura 4.17.

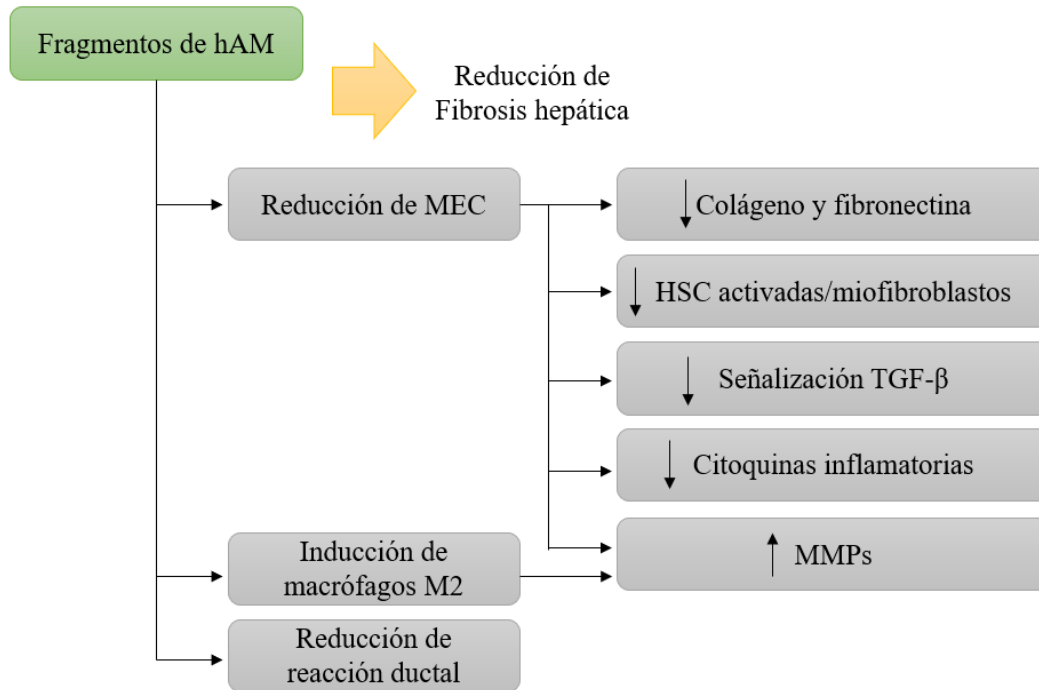


**FIGURA 4.17.** Esquema ilustrativo de los principales efectos antifibróticos de la aplicación de fragmentos o parches de membrana amniótica humana (hAM), observados en modelos preclínicos de fibrosis hepática. MEC: matriz extracelular; HSC: células estelares hepáticas; TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante-beta; MMPs: metaloproteinasas de matriz; M2: macrófagos con fenotipo antiinflamatorio y reparativo.

**TABLA 4.4.** *Conjunto de estudios preclínicos que han recurrido a la aplicación de parches de membrana amniótica humana (hAM) para el tratamiento de fibrosis hepática en la última década [BDL: ligadura de ducto biliar].*

| <b>Aplicación de parches o fragmentos de hAM</b>                      |                      |                                                                  |                              |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| <b>Método de uso</b>                                                  | <b>Tiempo máximo</b> | <b>Modelo experimental</b>                                       | <b>Ref.</b>                  |
| Aplicación total de hAM fresca, por su lado estromal                  | 6 semanas            | Fibrosis hepática inducida por BDL en ratas adultas              | Sant' Anna et al. 2011 [248] |
| Aplicación total de hAM fresca y criopreservada, por su lado estromal | 6 semanas            | Fibrosis hepática inducida por BDL en ratas adultas              | Ricci et al. 2013 [249]      |
| Aplicación total de hAM fresca, por su lado estromal                  | 6 semanas            | Fibrosis hepática establecida, inducida por BDL en ratas adultas | Sant' Anna et al. 2016 [250] |
| Aplicación total de hAM fresca, por su lado estromal                  | 9 semanas            | Fibrosis hepática inducida por BDL en ratas adultas              | Sant' Anna et al. 2017 [251] |
| Aplicación total de hAM criopreservada                                | 6 semanas            | Fibrosis hepática inducida por BDL en ratas jóvenes              | Garrido et al. 2018 [252]    |
| Aplicación total y parcial de hAM                                     | 4 semanas            | Fibrosis hepática establecida, inducida por BDL en ratas adultas | Mamede et al. 2019 [253]     |

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

La fibrosis hepática es una patología caracterizada por la acumulación crónica de matriz extracelular (MEC), y que puede progresar rápidamente a cirrosis, comprometiendo la vida de los pacientes. A la fecha, la única alternativa terapéutica efectiva para ellos es el trasplante de hígado, sin embargo, la falta de donantes compatibles, más la ausencia de una terapia antifibrótica que impida el avance de la enfermedad, crea la necesidad de encontrar nuevas opciones de tratamiento.

Diferentes grupos de investigación se han dedicado por años al estudio y eventual uso de células madre en medicina regenerativa, para restablecer funciones e integridad estructural de los órganos dañados. En este contexto, se plantea el uso de hAM y sus células en modelos preclínicos de fibrosis hepática, los cuales han demostrado la gran capacidad antifibrótica y regenerativa de la hAM sobre el tejido hepático.

El trasplante o infusión de células amnióticas humanas fue la primera forma de uso que se le dio a la hAM en modelos experimentales, los cuales demostraron que estas células madre son capaces tanto de incorporarse en el tejido hepático huésped, diferenciándose hacia hepatocitos funcionales, como de ejercer efectos antifibróticos, mediante la liberación de factores solubles. Simultáneamente, se hipotetizó que la hAM propiamente tal podría ejercer sus propiedades regenerativas mediante su aplicación en formato de parches o fragmentos amnióticos sobre la superficie hepática, los cuales incluyen hAECs, hAMSCs y, además, a la MEC amniótica, rica en componentes como ácido hialurónico, proteoglicanos y glicoproteínas. En efecto, la exitosa regresión de la fibrosis hepática, demostrada por las pruebas experimentales, confirma que las células y la MEC amniótica ejercen en conjunto sus propiedades terapéuticas en el tejido hepático dañado.

Por otro lado, la ausencia de células amnióticas humanas en los modelos animales tratados con parches de hAM lleva a hipotetizar que no ocurre incorporación celular en el tejido huésped, reforzando la teoría de la liberación de factores solubles y biomoléculas que actúan sobre el tejido. Ahora bien, tampoco se puede descartar que puedan ocurrir ambos eventos de manera simultánea: diferenciación celular hepatocitaria y secreción de biomoléculas con acciones regenerativas.

La MEC hepática, cuyo comportamiento es influenciado por las células hepáticas circundantes, es también considerada como un microambiente dinámico y un agente partícipe del proceso de fibrogénesis hepática, llegando a aumentar hasta 7 veces más de lo normal conforme avanza la enfermedad. Afortunadamente, la aplicación experimental de hAM ha logrado una exitosa regresión de la fibrosis hepática en los modelos tratados, incluso en etapas de cirrosis.

Interesantemente, la aplicación de hAM no actúa tan sólo sobre la MEC del hígado fibrótico, reduciendo sus cantidades, sino que actúa sobre todos los componentes hepáticos, tanto moleculares como celulares, los cuales funcionan de manera sinérgica para promover la regresión del proceso fibrogénico. Hasta la fecha, los componentes de la MEC más estudiados en presencia de amnios humano son el colágeno tipo I y la fibronectina, probablemente por ser los más predominantes. Sin embargo, existen otros componentes cuyas cantidades aumentan durante la fibrosis hepática, como los colágenos tipo III, IV y V, elastina, proteoglicanos, proteínas matricelulares y glicosaminoglicanos, los cuales también podrían verse afectados con la aplicación de hAM.

Otro componente importante de la MEC hepática normal es la reticulina, cuyos niveles disminuyen drásticamente durante el curso de la fibrosis hepática, debido a la dinámica irregular y anormal de la MEC. Ahora bien, hasta el momento no se han reportado estudios sobre el comportamiento de la reticulina bajo los efectos de amnios humano. Y, considerando el papel de la reticulina en el sostén e integridad de las trabéculas de hepatocitos, resulta fundamental analizar qué ocurre con sus niveles en presencia de hAM y verificar si es que logran retornar a la normalidad del mismo modo que los niveles de otros componentes extracelulares, como el colágeno tipo I. Por lo tanto, se hace necesario el estudio del comportamiento de los demás elementos de la MEC en presencia de hAM, en vista de que la matriz corresponde a un compartimento heterogéneo, e independientemente de que el colágeno sea el componente que más predomine.

Con respecto a los elementos celulares, las células hepáticas más intensamente estudiadas en presencia de hAM son las HSC activadas, en calidad de miofibroblastos productores de componentes de MEC, cuyas cantidades se ven notablemente reducidas, y los macrófagos hepáticos, los cuales han sido catalogados con un fenotipo antiinflamatorio y

restaurador de tejidos. Interesantemente, estos hallazgos, y otros más como la disminución de los niveles de la citoquina profibrogénica TGF- $\beta$  y el aumento de la concentración de MMPs, ya confirmados por las investigaciones, coinciden con los mecanismos de regresión endógenos de fibrosis hepática. Entonces, se puede establecer que la presencia de hAM promueve un proceso regenerativo similar a los mecanismos de reparación intrínsecos del hígado, que ocurren ante injurias menores, y sin alterar la integridad estructural del órgano.

Otro punto importante a considerar es que, en los últimos años, la mayoría de los experimentos que han utilizado parches de hAM lo han hecho aplicando el lado estromal amniótico en contacto directo con la superficie del hígado, obteniendo resultados antifibróticos positivos. Sin embargo, sería interesante observar qué ocurre con la aplicación de hAM por su lado epitelial, considerando que las hAECs liberan diversos factores solubles. Eventualmente, se podrían evaluar y comparar los efectos desencadenados por ambos lados de la hAM. Así como también se pueden analizar los efectos del uso de hAM descelularizada y evaluar la acción de la MEC amniótica sobre el tejido hepático, en vista de que los componentes matriciales también son capaces de gatillar señalizaciones moleculares.

Hay diversas perspectivas desde donde abordar la utilización de hAM en el tratamiento de fibrosis hepática. Por temas de practicidad y eficiencia, pareciera ser más factible el uso de fragmentos de hAM, ya que son más sencillos de obtener, preparar y conservar, gracias a métodos de mantención a largo plazo como la criopreservación, la que además no interfiere con las propiedades antifibróticas de la hAM.

Finalmente, la aplicación experimental de hAM ejerce exitosas acciones antifibróticas en modelos de fibrosis hepática, disminuyendo el exceso de MEC y restableciendo la estructura hepática. Estos resultados apoyan el uso terapéutico de hAM, por lo que sería ideal planificar futuros ensayos clínicos, más aún sabiendo que se trata de un tejido perinatal de fácil obtención, sin problemas éticos, sin rechazo inmune, sin formación de tumores y que representa una valiosa fuente de células madre embrionarias con altos índices de bioseguridad para los pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins y Cotran: Patología estructural y funcional. Novena edición. Barcelona, España: Elsevier ; 2015.
2. Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins: Patología humana. Novena edición. Barcelona, España: Elsevier; 2013.
3. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. 9, Cells; 2020.
4. Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. Vol. 18, Clinical Gastroenterology and Hepatology. W.B. Saunders; 2020;18:2650–66.
5. Aydin MM, Akcali KC. Liver fibrosis. Turkish Journal of Gastroenterology; 2018;29:14–21.
6. Tanwar S, Rhodes F, Srivastava A, Trembling PM, Rosenberg WM. Inflammation and fibrosis in chronic liver diseases including non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. World J Gastroenterol . 2020;26(2):109–33.
7. Herrera J, Henke CA, Bitterman PB. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. Journal of Clinical Investigation. American Society for Clinical Investigation; 2018;128:45–53.
8. Wang J, Sun M, Liu W, Li Y, Li M. Stem Cell-Based Therapies for Liver Diseases: An Overview and Update. Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society; 2019;16:107–18.
9. Ramuta TŽ, Kreft ME. Human Amniotic Membrane and Amniotic Membrane–Derived Cells: How Far Are We from Their Use in Regenerative and Reconstructive Urology? Cell Transplantation. 2018;27(1):77–92.
10. Pimentel-Parra GA, Murcia-Ordoñez B. Células madre, una nueva alternativa médica. Perinatología y Reproducción Humana. 2017;31(1):28–33.
11. Garcia de Insausti CL. Aislamiento y Caracterización de las Células Madre de la Membrana Amniótica. Una nueva fuente para Terapia Celular e Inmunomodulación [tesis doctoral]. España; 2012.
12. Lacorzana J. Amniotic membrane, clinical applications and tissue engineering. Review of its ophthalmic use. Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia. Elsevier; 2020;95:15–23.
13. Ortega-Molina JM, Salgado-Miranda A, Chaves-Samaniego MJ, Solans Pérez-Larraya A. La membrana amniótica en Oftalmología: del Recubrimiento - Injerto a la Ingeniería tisular. Artículo de revisión. Rev Esp Inv Oftal. 2014;4(2):117–22.
14. Insausti CL, Rodríguez M, Castellanos G, Moraleda JM. Immunomodulatory Properties of the Amniotic Membrane Stem Cells: New Perspectives. Rev Hematol Mex. 2014;15:11–20.
15. Miki T. A Rational Strategy for the Use of Amniotic Epithelial Stem Cell Therapy for Liver Diseases. Stem Cells Translational Medicine. 2016;5(4):405–9.

16. Ross MH, Wojciech P. *Histología: Texto y Atlas. Correlación con biología celular y molecular*. Séptima edición. Barcelona, España: Wolters Kluwer ; 2016.
17. Young B, O'Dwod G, Woodford P. *Wheater: Histología funcional, texto y atlas en color*. Sexta edición. Barcelona, España: Elsevier ; 2014.
18. Brusco Herminia A, López Acosta JJ, Loidl César F. *Histología médico-práctica*. Barcelona, España: Elsevier; 2014.
19. Cordero-Espinoza L, Huch M. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2018;128(1):85–96.
20. Fujita T, Narumiya S. Roles of hepatic stellate cells in liver inflammation: A new perspective. *Inflammation and Regeneration*. 2016;36(1).
21. Dolin CE, Arteel GE. The Matrisome, Inflammation, and Liver Disease. *Seminars in Liver Disease*. 2020;40(2):180–8.
22. Tu T, Calabro SR, Lee A, Maczurek AE, Budzinska MA, Warner FJ, et al. Hepatocytes in liver injury: Victim, bystander, or accomplice in progressive fibrosis? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2015;30:1696–704.
23. Elpek GÖ. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(23):7260–76.
24. Böttcher K, Pinzani M. Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2017;121:3–8.
25. Aoudjehane L, Bisch G, Scatton O, Granier C, Gaston J, Housset C, et al. Infection of human liver myofibroblasts by Hepatitis C virus: A direct mechanism of liver fibrosis in Hepatitis C. *PLoS ONE*. 2015;10(7).
26. Page A, Paoli PP, Hill SJ, Howarth R, Wu R, Kweon SM, et al. Alcohol directly stimulates epigenetic modifications in hepatic stellate cells. 2015.
27. Fujii H, Kawada N. Fibrogenesis in alcoholic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(25):8048–54.
28. Mehta KJ, Je Farnaud S, Sharp PA. Iron and liver fibrosis: Mechanistic and clinical aspects. *World Journal of Gastroenterology*. 2019;25(5):521–38.
29. Tacke F. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2012;5(S1).
30. Mchedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*. 2013;39(2):357–71.
31. Zhang M, Zhang S. T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
32. Sziksz E, Pap D, Lippai R, Béres NJ, Fekete A, Szabó AJ, et al. Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators of Inflammation*. 2015.
33. Xu R, Zhang Z, Wang FS. Liver fibrosis: Mechanisms of immune-mediated liver injury. *Cellular and Molecular Immunology*. 2012;9(4):296–301.

34. Pinzani M. Pathophysiology of Liver Fibrosis. *Digestive Diseases*. 2015;33(4):492–7.
35. Crosas-Molist E, Fabregat I. Role of NADPH oxidases in the redox biology of liver fibrosis. *Redox Biology*. 2015;6:106–11.
36. Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: A Review. *Current Medicinal Chemistry*. 2012;19:4850–60.
37. Jung YK, Yim HJ. Reversal of liver cirrhosis: Current evidence and expectations. *Korean Journal of Internal Medicine*. 2017;32(2):213–28.
38. Jiang JX, Török NJ. Liver Injury and the Activation of the Hepatic Myofibroblasts. *Current Pathobiology Reports*. 2013;1(3):215–23.
39. Liang S, Kisseleva T, Brenner DA. The role of NADPH Oxidases (NOXs) in liver fibrosis and the activation of myofibroblasts. *Frontiers in Physiology*. 2016;7.
40. Paik YH, Kim J, Aoyama T, de Minicis S, Bataller R, Brenner DA. Role of NADPH oxidases in liver fibrosis. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2014;20(17):2854–72.
41. Alegre F, Pelegrin P, Feldstein AE. Inflammasomes in Liver Fibrosis. *Seminars in Liver Disease*. 2017;37(2):119–27.
42. Tao Y, Wang N, Qiu T, Sun X. The Role of Autophagy and NLRP3 Inflammasome in Liver Fibrosis. *BioMed Research International*. 2020.
43. Li J, Yr Z, Tian Z, Xie Q, Jw X, Xg Y, et al. Roles of hepatic stellate cells in acute liver failure: From the perspective of inflammation and fibrosis. *World Journal of Hepatology World J Hepatol*. 2019;11(5):412–88.
44. van Hul N, Lanthier N, Espaul Suer R, Abarca Quinones J, van Rooijen N, Leclercq I. Kupffer cells influence parenchymal invasion and phenotypic orientation, but not the proliferation, of liver progenitor cells in a murine model of liver injury. *American Journal of Pathology*. 2011;179(4):1839–50.
45. Williams MJ, Clouston AD, Forbes SJ. Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology*. 2014;146(2):349–56.
46. Fasbender F, Widera A, Hengstler JG, Watzl C. Natural killer cells and liver fibrosis. *Frontiers in Immunology*. 2016;7.
47. Yang YM, Seki E. TNF $\alpha$  in Liver Fibrosis. *Current Pathobiology Reports*. 2015;3(4):253–61.
48. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011;6:425–56.
49. Arriazu E, de Galarreta MR, Cubero FJ, Varela-Rey M, de Obanos MPP, Leung TM, et al. Extracellular matrix and liver disease. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2014;21(7):1078–97.
50. McQuitty CE, Williams R, Chokshi S, Urbani L. Immunomodulatory Role of the Extracellular Matrix Within the Liver Disease Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.

51. Chen J, Chen L, Zern MA, Theise ND, Diehl AM, Liu P, et al. The diversity and plasticity of adult hepatic progenitor cells and their niche. *Liver International*. 2017;37(9):1260–71.
52. Sánchez-Romero N, Sainz-Arnal P, Pla-Palacín I, Dachary PR, Almeida H, Pastor C, et al. The role of extracellular matrix on liver stem cell fate: A dynamic relationship in health and disease. *Differentiation*. 2019;106:49–56.
53. Hansen NUB, Genovese F, Leeming DJ, Karsdal MA. The importance of extracellular matrix for cell function and in vivo likeness. *Experimental and Molecular Pathology*. 2015;98(2):286–94.
54. Patsenker E, Stickel F. Role of integrins in fibrosing liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301:425–34.
55. Karsdal MA, Manon-Jensen T, Genovese F, Jacob Kristensen XH, Nielsen MJ, Marie Sand JB, et al. Novel insights into the function and dynamics of extracellular matrix in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;308:807–30.
56. Villesen IF, Daniels SJ, Leeming DJ, Karsdal MA, Nielsen MJ. Review article: the signalling and functional role of the extracellular matrix in the development of liver fibrosis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2020;52(1):85–97.
57. Karsdal MA, Nielsen SH, Leeming DJ, Langholm LL, Nielsen MJ, Manon-Jensen T, et al. The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2017;121:43–56.
58. Kang N. Mechanotransduction in Liver Diseases. *Seminars in Liver Disease*. 2020;40(1):84–90.
59. Xia T, Zhao R, Feng F, Yang L. The effect of matrix stiffness on human hepatocyte migration and function-An in vitro research. *Polymers*. 2020;12(9).
60. Iredale JP, Thompson A, Henderson NC. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2013;1832(7):876–83.
61. Chen W, Rock JB, Yearsley MM, Ferrell LD, Frankel WL. Different collagen types show distinct rates of increase from early to late stages of hepatitis C-related liver fibrosis. *Human Pathology*. 2014;45(1):160–5.
62. Chen G, Xia B, Fu Q, Huang X, Wang F, Chen Z, et al. Matrix mechanics as regulatory factors and therapeutic targets in hepatic fibrosis. *International Journal of Biological Sciences*. 2019;15(12):2509–21.
63. Kanta J. Elastin in the liver. *Frontiers in Physiology*. 2016 Oct;7.
64. Chen W, Yan X, Xu A, Sun Y, Wang B, Huang T, et al. Dynamics of elastin in liver fibrosis: Accumulates late during progression and degrades slowly in regression. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(12):22613–22.
65. Wen SL, Feng S, Tang SH, Gao JH, Zhang LH, Tong H, et al. Collapsed reticular network and its possible mechanism during the initiation and/or progression of hepatic fibrosis. *Scientific Reports*. 2016;6.

66. Couchman JR, Pataki CA. An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2012;60(12):885–97.
67. Lord MS, Tang F, Rnjak-Kovacina J, Smith JGW, Melrose J, Whitelock JM. The multifaceted roles of perlecan in fibrosis. *Matrix Biology*. 2018;68–69:150–66.
68. Bukong TN, Maurice SB, Chahal B, Schaeffer DF, Winwood PJ. Versican: A novel modulator of hepatic fibrosis. *Laboratory Investigation*. 2016;96(3):361–74.
69. Krishnan A, Li X, Kao WY, Viker K, Butters K, Masuoka H, et al. Lumican, an extracellular matrix proteoglycan, is a novel requisite for hepatic fibrosis. *Laboratory Investigation*. 2012;92(12):1712–25.
70. Magdaleno F, Arriazu E, Ruiz De Galarreta M, Chen Y, Ge X, Conde De La Rosa L, et al. Cartilage oligomeric matrix protein participates in the pathogenesis of liver fibrosis. *Journal of Hepatology*. 2016;65:963–71.
71. Guedes PLR, Castañón MCMN, Nagaoka MR, Aguiar JAK. Increase of glycosaminoglycans and metalloproteinases 2 and 9 in liver extracellular matrix on early stages of extrahepatic cholestasis. *Arq Gastroenterol*. 2014;5(4):309–15.
72. Matsuda M, Seki E. The liver fibrosis niche: Novel insights into the interplay between fibrosis-composing mesenchymal cells, immune cells, endothelial cells, and extracellular matrix. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;143.
73. Brenner DA, Kisseleva T, Scholten D, Han Paik T, Iwaisako K, Inokuchi S, et al. Origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2012;5:S17.
74. Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Molecular Aspects of Medicine*. 2019;65:37–55.
75. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2017;121:27–42.
76. Perepelyuk M, Terajima M, Wang AY, Georges PC, Janmey PA, Yamauchi M, et al. Hepatic stellate cells and portal fibroblasts are the major cellular sources of collagens and lysyl oxidases in normal liver and early after injury. *Am J Physiol Gastro-intest Liver Physiol*. 2013;304:605–14.
77. Karin D, Koyama Y, Brenner D, Kisseleva T. The characteristics of activated portal fibroblasts/myofibroblasts in liver fibrosis. *Differentiation*. 2016;92(3):84–92.
78. Xu J, Liu X, Koyama Y, Wang P, Lan T, Kim IG, et al. The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies. *Frontiers in Pharmacology*. 2014;5.
79. Iwaisako K, Brenner DA, Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2012;27(SUPPL.2):65–8.
80. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013;3(4):1473–92.
81. Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: Pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. 2012;6(1):67–80.

82. El-Ahwany E, Zoheiry M. New Insights in the Roadmap of Liver Fibrosis Pathogenesis. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2014;(54):71–87.
83. Abdu SB, Al-Bogami FM. Portal fibroblast role in liver fibrosis in rats. *International Journal of Pharmacology*. 2018;14(5):717–26.
84. Lee YS, Jeong W il. Retinoic acids and hepatic stellate cells in liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2012;27(2):75–9.
85. Bi Y, Mukhopadhyay D, Drinane M, Ji B, Li X, Cao S, et al. Endocytosis of collagen by hepatic stellate cells regulates extracellular matrix dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014;307:622–33.
86. Guvendiren M, Perepelyuk M, Wells RG, Burdick JA. Hydrogels with differential and patterned mechanics to study stiffness-mediated myofibroblastic differentiation of hepatic stellate cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2014;38:198–208.
87. Olsen AL, Bloomer SA, Chan EP, Gaça MDA, Georges PC, Sackey B, et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301:110–8.
88. Yi SH, Zhang Y, Tang D, Zhu L. Mechanical force and tensile strain activated hepatic stellate cells and inhibited retinol metabolism. *Biotechnology Letters*. 2015;37(6):1141–52.
89. Mallat A, Lotersztajn S. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 5. Novel insights into liver fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;305:789–99.
90. Li J, Ghazwani M, Liu K, Huang Y, Chang N, Fan J, et al. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and activation by glutamine metabolism. *PLoS ONE*. 2017;12(8).
91. Nwosu ZC, Alborzinia H, Wöfl S, Dooley S, Liu Y. Evolving insights on metabolism, autophagy, and epigenetics in liver myofibroblasts. *Frontiers in Physiology*. 2016;7.
92. Mallat A, Lodder J, Teixeira-Clerc F, Moreau R, Codogno P, Lotersztajn S. Autophagy: A Multifaceted Partner in Liver Fibrosis. *BioMed Research International*. 2014.
93. Seki E, Brenner DA. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 2015;22(7):512–8.
94. Senoo H, Mezaki Y, Fujiwara M. The stellate cell system (vitamin A-storing cell system). *Anatomical Science International*. 2017;92(4):387–455.
95. Forbes SJ, Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. 2011;25(2):207–17.
96. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. 2011;25(2):195–206.
97. Páramo Hernández DB, Regino WO, Pineda Ovalle LF. Fibrogénesis hepática. *Rev Col Gastroenterol* . 2010;25(2):187–97.

98. Herrera Batista AJ, Ruiz Candina HJ, Borroto Leiseca A. La multifuncional célula estrellada del hígado y su papel en la fibrosis hepática. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2018;37(3).
99. Zhang CY, Yuan WG, He P, Lei JH, Wang CX. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(48):10512–22.
100. Rockey DC, Du Q, Shi Z. Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin Deficiency Leads to Decreased Liver Fibrosis via Impaired Cytoskeletal Signaling in Hepatic Stellate Cells. *American Journal of Pathology*. 2019;189(11):2209–20.
101. Li X, Chen R, Kemper S, Brigstock DR. Dynamic Changes in Function and Proteomic Composition of Extracellular Vesicles from Hepatic Stellate Cells during Cellular Activation. *Cells*. 2020;9(2).
102. Fausther M, Lavoie EG, Dranoff JA. Contribution of Myofibroblasts of Different Origins to Liver Fibrosis. *Current Pathobiology Reports*. 2013;1(3):225–30.
103. Lepreux S, Desmoulière A. Human liver myofibroblasts during development and diseases with a focus on portal (myo)fibroblasts. *Frontiers in Physiology*. 2015;6.
104. Fabris L, Brivio S, Cadamuro M, Strazzabosco M. Revisiting Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Liver Fibrosis: Clues for a Better Understanding of the “reactive” Biliary Epithelial Phenotype. *Stem Cells International*. 2016.
105. Zhao YL, Zhu RT, Sun YL. Epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis (Review). *Biomedical Reports*. 2016;4(3):269–74.
106. Yu K, Li Q, Shi G, Li N. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis. *Saudi Journal of Gastroenterology*. 2018;24(1):5–11.
107. Chen Y, Fan Y, Guo D yan, Xu B, Shi X yan, Li J tao, et al. Study on the relationship between hepatic fibrosis and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2020;129.
108. Taura K, Iwaisako K, Hatano E, Uemoto S. Controversies over the epithelial-to-mesenchymal transition in liver fibrosis. *Journal of Clinical Medicine*. 2016;5(1).
109. Kisseleva T, Brenner DA. The phenotypic fate and functional role for bone marrow-derived stem cells in liver fibrosis. *Journal of Hepatology*. 2012;56:965–72.
110. Xu J, Kisseleva T. Bone marrow-derived fibrocytes contribute to liver fibrosis. *Experimental Biology and Medicine*. 2015;240(6):691–700.
111. Xu T, Lu Z, Xiao Z, Liu F, Chen Y, Wang Z, et al. Myofibroblast induces hepatocyte-to-ductal metaplasia via laminin- $\alpha$ v $\beta$ 6 integrin in liver fibrosis. *Cell Death and Disease*. 2020;11(3).
112. Kisseleva T. The origin of fibrogenic myofibroblasts in fibrotic liver. *Hepatology*. 2017;65(3):1039–43.
113. de Oliveira da Silva B, Ramos LF, Moraes KCM. Molecular interplays in hepatic stellate cells: apoptosis, senescence, and phenotype reversion as cellular connections that modulate liver fibrosis. *Cell Biology International*. 2017;41(9):946–59.

114. Kim J, Jung Y. Potential role of Thymosin beta 4 in liver fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(5):10624–35.
115. Foglia B, Cannito S, Bocca C, Parola M, Novo E. ERK pathway in activated, myofibroblast-like, hepatic stellate cells: A critical signaling crossroad sustaining liver fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(11).
116. Dawood RM, El-Meguid MA, Salum GM, el Awady MK. Key players of hepatic fibrosis. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2020;40(10):472–89.
117. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2017;14(7):397–411.
118. Dooley S, ten Dijke P. TGF- $\beta$  in progression of liver disease. *Cell and Tissue Research*. 2012;347(1):245–56.
119. Fabregat I, Caballero-Díaz D. Transforming growth factor- $\beta$ -induced cell plasticity in liver fibrosis and hepatocarcinogenesis. *Frontiers in Oncology*. 2018;8.
120. Xu F, Liu C, Zhou D, Zhang L. TGF- $\beta$ /SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2016;64(3):157–67.
121. Hayashi H, Sakai T. Biological significance of local TGF- $\beta$  activation in liver diseases. *Frontiers in Physiology*. 2012;3.
122. Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker N. Tgf- $\beta$  in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis—updated 2019. *Cells*. 2019;8(11).
123. Jiang F, Liu GS, Dusting GJ, Chan EC. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- $\beta$ -mediated fibrotic responses. *Redox Biology*. 2014;2(1):267–72.
124. Ni M ming, Wang Y rui, Wu W wen, Xia C cai, Zhang Y he, Xu J, et al. Novel Insights on Notch signaling pathways in liver fibrosis. *European Journal of Pharmacology*. 2018;826:66–74.
125. Finnson KW, Philip A. Endoglin in liver fibrosis. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2012;6(1):1–4.
126. Muñoz-Félix JM, González-Núñez M, López-Novoa JM. ALK1-Smad1/5 signaling pathway in fibrosis development: Friend or foe? *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2013;24(6):523–37.
127. Bi J, Ge S. Potential roles of BMP9 in liver fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(11):20656–67.
128. Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2014;548:20–37.
129. Yang JJ, Tao H, Li J. Hedgehog signaling pathway as key player in liver fibrosis: New insights and perspectives. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2014;18(9):1011–21.
130. Robert S, Gicquel T, Victoni T, Valença S, Barreto E, Bailly-Maître B, et al. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis. *Bioscience Reports*. 2016;36(4).

131. Ferranti-Ramos A, Garza-Garza G, Bátiz-Armenta J, Martínez-Delgado G, de la Garza-Álvarez F, Martínez-Menchaca H. Metaloproteinasas de la matriz extracelular y su participación en el proceso de cicatrización. *Med Uis*. 2017;30(2):55–62.
132. Naim A, Pan Q, Baig MS. Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Liver Diseases. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2017;7(4):367–72.
133. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biology*. 2015;44–46:147–56.
134. Munsterman ID, Kendall TJ, Khelil N, Popa M, Lomme R, Drenth JPH, et al. Extracellular matrix components indicate remodelling activity in different fibrosis stages of human non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology*. 2018;73(4):612–21.
135. Roderfeld M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. *Matrix Biology*. 2018;68–69:452–62.
136. Calabro SR, Maczurek AE, Morgan AJ, Tu T, Wen VW, Yee C, et al. Hepatocyte produced matrix metalloproteinases are regulated by CD147 in liver fibrogenesis. *PLoS ONE*. 2014;9(7).
137. Lachowski D, Cortes E, Rice A, Pinato D, Rombouts K, del Rio Hernandez A. Matrix stiffness modulates the activity of MMP-9 and TIMP-1 in hepatic stellate cells to perpetuate fibrosis. *Scientific Reports*. 2019;9(1).
138. Schmidt-Arras D, Rose-John S. Regulation of fibrotic processes in the liver by ADAM proteases. *Cells*. 2019;8(10).
139. Saneyasu T, Akhtar R, Sakai T. Molecular Cues Guiding Matrix Stiffness in Liver Fibrosis. *BioMed Research International*. 2016.
140. Chen W, Yang A, Jia J, Popov Y v, Schuppan D, You H. Lysyl Oxidase (LOX) Family Members: Rationale and Their Potential as Therapeutic Targets for Liver Fibrosis. *Hepatology*. 2020;72(2).
141. Puente A, Fortea JJ, Cabezas J, Loste MTA, Iruzubieta P, Llerena S, et al. LOXL2—A new target in antifibrogenic therapy? *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(7).
142. Kumar P, Smith T, Raeman R, Chopyk DM, Brink H, Liu Y, et al. Periostin promotes liver fibrogenesis by activating lysyl oxidase in hepatic stellate cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(33):12781–92.
143. Mak KM, Png CYM. The Hepatic Central Vein: Structure, Fibrosis, and Role in Liver Biology. *Anatomical Record*. 2020;303(7):1747–67.
144. Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of Hepatology*. 2014;60(5):1090–6.
145. Xu M, Wang X, Zou Y, Zhong Y. Key role of liver sinusoidal endothelial cells in liver fibrosis. *BioScience Trends*. 2017;11(2):163–8.
146. Ni Y, Li JM, Liu MK, Zhang TT, Wang DP, Zhou WH, et al. Pathological process of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2021;23(43):7666–77.

147. Natarajan V, Harris EN, Kidambi S. SECs (Sinusoidal Endothelial Cells), Liver Microenvironment, and Fibrosis. *BioMed Research International*. 2017.
148. Juin A, Planus E, Guillemot F, Horakova P, Albiges-Rizo C, Génot E, et al. Extracellular matrix rigidity controls podosome induction in microvascular endothelial cells. *Biology of the Cell*. 2013;105(1):46–57.
149. Marrone G, Shah VH, Gracia-Sancho J. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *Journal of Hepatology*. 2016;65:608–17.
150. Greenbaum LE, Wells RG. The role of stem cells in liver repair and fibrosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2011;43(2):222–9.
151. Kaur S, Siddiqui H, Bhat MH. Hepatic Progenitor Cells in Action Liver Regeneration or Fibrosis? *American Journal of Pathology*. 2015;185(9):2342–50.
152. Ezhilarasan D. Endothelin-1 in portal hypertension: The intricate role of hepatic stellate cells. *Experimental Biology and Medicine*. 2020;245(16):1504–12.
153. Novo E, Bocca C, Foglia B, Protopapa F, Maggiora M, Parola M, et al. Liver fibrogenesis: un update on established and emerging basic concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2020;689.
154. Park S, Kim JW, Kim JH, Lim CW, Kim B. Differential Roles of Angiogenesis in the Induction of Fibrogenesis and the Resolution of Fibrosis in Liver. *Biol Pharm Bull*. 2015;38(7):980–5.
155. Lemoine S, Thabut D, Housset C. Portal myofibroblasts connect angiogenesis and fibrosis in liver. *Cell and Tissue Research*. 2016;365(3):583–9.
156. Zhang Z, Zhang F, Lu Y, Zheng S. Update on implications and mechanisms of angiogenesis in liver fibrosis. *Hepatology Research*. 2015;45(2):162–78.
157. Hintermann E, Christen U. The many roles of cell Adhesion molecules in hepatic fibrosis. *Cells*. 2019;8(12).
158. Blois SM, Piccioni F, Freitag N, Tirado-González I, Moschansky P, Lloyd R, et al. Dendritic cells regulate angiogenesis associated with liver fibrogenesis. *Angiogenesis*. 2014;17(1):119–28.
159. Ramirez-Pedraza M, Fernández M. Interplay Between Macrophages and Angiogenesis: A Double-Edged Sword in Liver Disease. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
160. Takeda K, Noguchi R, Kitade M, Namisaki T, Moriya K, Kawaratani H, et al. Periostin cross-reacts with the renin-angiotensin system during liver fibrosis development. *Molecular Medicine Reports*. 2017;16(5):5752–8.
161. Zehra M, Curry JC, Pillai SS, Lakhani HV, Edwards CE, Sodhi K. Elucidating potential profibrotic mechanisms of emerging biomarkers for early prognosis of hepatic fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(13):1–17.
162. Cai X, Wang J, Wang J, Zhou Q, Yang B, He Q, et al. Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: New insights into therapy. *Pharmacological Research*. 2020;155.

163. Lu LG. Consensus on the diagnosis and treatment of hepatic fibrosis (2019). *Journal of Digestive Diseases*. 2020;21(3):127–38.
164. Manka P, Zeller A, Syn WK. Fibrosis in Chronic Liver Disease: An Update on Diagnostic and Treatment Modalities. *Drugs*. 2019;79(9):903–27.
165. Su TH, Kao JH, Liu CJ. Molecular mechanism and treatment of viral hepatitis-related liver fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(6):10578–604.
166. Bansal R, Nagórniewicz B, Prakash J. Clinical Advancements in the Targeted Therapies against Liver Fibrosis. *Mediators of Inflammation*. 2016.
167. Fagone P, Mangano K, Mammana S, Pesce A, Pesce A, Caltabiano R, et al. Identification of novel targets for the diagnosis and treatment of liver fibrosis. *International Journal of Molecular Medicine*. 2015;36(3):747–52.
168. Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: A translational success story. *Gut*. 2015;64(5):830–41.
169. Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2020;18(3):151–66.
170. Pinheiro D, Dias I, Ribeiro Silva K, Stumbo AC, Thole A, Cortez E, et al. Mechanisms Underlying Cell Therapy in Liver Fibrosis: An Overview. *Cells*. 2019;8(11).
171. Sancho-Bru P. Posibilidades terapéuticas de las células madre en el tratamiento de las enfermedades hepáticas. *Gastroenterología y Hepatología*. 2011;34(10):701–10.
172. Eom YW, Shim KY, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean Journal of Internal Medicine*. 2015;30(5):580–9.
173. Kmiecik G, Niklińska W, Kuć P, Pancewicz-Wojtkiewicz J, Fil D, Karwowska A, et al. Fetal membranes as a source of stem cells. *Advances in Medical Sciences*. 2013;58(2):185–95.
174. Kitala D, Klama-Baryła A, Misiuga M, Łabuś W, Kraut M, Szapski M, et al. Heterogeneous Mixture of Amniotic Cells is Likely a Better Source of Stem Cells than Adipose Tissue. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2019;67(3):189–96.
175. Gubar O, Rodnichenko A, Vasyliov R, Zlatska A, Zubov D. Postnatal extra-embryonic tissues as a source of multiple cell types for regenerative medicine applications. *Experimental Oncology*. 2017;39:186–90.
176. Silini AR, Masserdotti A, Papait A, Parolini O. Shaping the future of perinatal cells: Lessons from the past and interpretations of the present. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7.
177. Choi YS, Park YB, Ha CW, Kim JA, Heo JC, Han WJ, et al. Different characteristics of mesenchymal stem cells isolated from different layers of full term placenta. *PLoS ONE*. 2017;12(2).
178. Papait A, Vertua E, Magatti M, Ceccariglia S, de Munari S, Silini AR, et al. Mesenchymal Stromal Cells from Fetal and Maternal Placenta Possess Key Similarities and Differences: Potential Implications for Their Applications in Regenerative Medicine. *Cells*. 2020;9(1).

179. Jaramillo-Ferrada PA, Wolvetang EJ, Cooper-White JJ. Differential mesengenic potential and expression of stem cell-fate modulators in mesenchymal stromal cells from human-term placenta and bone marrow. *Journal of Cellular Physiology*. 2012;227(9):3234–42.
180. Sadler TW. Langman, Embriología médica. Decimocuarta edición. Wolters Kluwer; 2019.
181. Deus IA, Mano JF, Custódio CA. Perinatal tissues and cells in tissue engineering and regenerative medicine. *Acta Biomaterialia*. 2020;110:1–14.
182. Arteaga Martínez, García Peláez. Embriología humana y biología del desarrollo. México: Editorial Médica Panamericana; 2013.
183. García-López G, García-Castro IL, Avila-González D, Molina-Hernández A, Flores-Herrera H, Merchant-Larios H, et al. Las células del epitelio amniótico humano (CEAh) como posible fuente de células troncales (CT). *Gaceta Médica de México*. 2015;151:66–74.
184. Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Research & Therapy*. 2011;2(25).
185. Qiu C, Ge Z, Cui W, Yu L, Li J. Human amniotic epithelial stem cells: A promising seed cell for clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(20):1–26.
186. Miki T, Grubbs B. Therapeutic potential of placenta-derived stem cells for liver diseases: Current status and perspectives. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2014;40(2):360–8.
187. Gramignoli R. Therapeutic Use of Human Amnion-Derived Products: Cell-Based Therapy for Liver Disease. *Current Pathobiology Reports*. 2016;4(3):157–67.
188. Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, Botelho MF. Amniotic membrane: From structure and functions to clinical applications. *Cell and Tissue Research*. 2012;349(2):447–58.
189. Barbati A, Mameli MG, Sidoni A, di Renzo GC. Amniotic membrane: Separation of amniotic mesoderm from amniotic epithelium and isolation of their respective mesenchymal stromal and epithelial cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*. 2012;1.
190. Huddleston HP, Cohn MR, Haunschild ED, Wong SE, Farr J, Yanke AB. Amniotic Product Treatments: Clinical and Basic Science Evidence. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*. 2020;13(2):148–54.
191. Insausti CL, Blanquer M, Majado MJ, Insausti A, Moraleda JM. Utilidad terapéutica potencial de las células madre de la membrana amniótica. Artículo de revisión *Rev Hematol Mex*. 2011;12(4):276–86.
192. Koike C, Zhou K, Takeda Y, Fathy M, Okabe M, Yoshida T, et al. Characterization of amniotic stem cells. *Cellular Reprogramming*. 2014;16(4):298–305.

193. Rennie K, Gruslin A, Hengstschläger M, Pei D, Cai J, Nikaido T, et al. Applications of amniotic membrane and fluid in stem cell biology and regenerative medicine. *Stem Cells International*. 2012;
194. Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Cicione C, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, et al. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation*. 2011;81(3):162–71.
195. Farhadhosseiniabadi B, Farahani M, Tayebi T, Jafari A, Biniazan F, Modaresifar K, et al. Amniotic membrane and its epithelial and mesenchymal stem cells as an appropriate source for skin tissue engineering and regenerative medicine. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 2018;46:431–40.
196. Ghamari SH, Abbasi-Kangevari M, Tayebi T, Bahrami S, Niknejad H. The Bottlenecks in Translating Placenta-Derived Amniotic Epithelial and Mesenchymal Stromal Cells Into the Clinic: Current Discrepancies in Marker Reports. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8.
197. Antoniadou E, David AL. Placental stem cells. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2016;31:13–29.
198. Abbaspanah B, Momeni M, Ebrahimi M, Mousavi SH. Advances in perinatal stem cells research: A precious cell source for clinical applications. *Regenerative Medicine*. 2018;13(5):595–610.
199. Centurione L, Passaretta F, Centurione MA, Munari S de, Vertua E, Silini A, et al. Mapping of the Human Placenta: Experimental Evidence of Amniotic Epithelial Cell Heterogeneity. *Cell Transplantation*. 2018;27(1):12–22.
200. Avila-González D, García-López G, Díaz-Martínez NE, Flores-Herrera H, Molina-Hernández A, Portillo W, et al. In vitro culture of epithelial cells from different anatomical regions of the human amniotic membrane. *Journal of Visualized Experiments*. 2019;2019(153).
201. García-López G, Ávila-González D, García-Castro IL, Flores-Herrera H, Molina-Hernández A, Portillo W, et al. Pluripotency markers in tissue and cultivated cells in vitro of different regions of human amniotic epithelium. *Experimental Cell Research*. 2019;375(1):31–41.
202. Fanti M, Gramignoli R, Serra M, Cadoni E, Strom SC, Marongiu F. Differentiation of amniotic epithelial cells into various liver cell types and potential therapeutic applications. *Placenta*. 2017;59:139–45.
203. lo Iacono M, Anzalone R, Corrao S, Corsello T, Loreto C, Sansalone S, et al. Recent Advances in Derivation of Functional Hepatocytes from Placental Stem Cells. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*. 2013;(6):12–25.
204. Maymó JL, Riedel R, Pérez-Pérez A, Magatti M, Maskin B, Dueñas JL, et al. Proliferation and survival of human amniotic epithelial cells during their hepatic differentiation. *PLoS ONE*. 2018;13(1).

205. Serra M, Marongiu M, Contini A, Miki T, Cadoni E, Laconi E, et al. Evidence of Amniotic Epithelial Cell Differentiation toward Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells. *Cell Transplantation*. 2018;27(1):23–30.
206. Passaretta F, Bosco D, Centurione L, Centurione MA, Marongiu F, di Pietro R. Differential response to hepatic differentiation stimuli of amniotic epithelial cells isolated from four regions of the amniotic membrane. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020;24(7):4350–5.
207. Murphy S, Atala A. Amniotic fluid and placental membranes: Unexpected sources of highly multipotent cells. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2013;31(1):62–8.
208. Miki T, Wong W, Zhou E, Gonzalez A, Garcia I, Grubbs BH. Biological impact of xeno-free chemically defined cryopreservation medium on amniotic epithelial cells. *Stem Cell Research and Therapy*. 2016;7(1).
209. Srinivasan RC, Strom SC, Gramignoli R. Effects of Cryogenic Storage on Human Amnion Epithelial Cells. *Cells*. 2020;9(7).
210. Pirjali T, Azarpira N, Ayatollahi M, Aghdaie MH, Geramizadeh B, Talai T. Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly and Amniotic Membrane. *International Journal of Organ Transplantation Medicine*. 2013;4(3).
211. Pozzobon M, Piccoli M, de Coppi P. Stem cells from fetal membranes and amniotic fluid: Markers for cell isolation and therapy. *Cell and Tissue Banking*. 2014;15(2):199–211.
212. Kim EY, Lee KB, Kim MK. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy. *BMB Reports*. 2014;47(3):135–40.
213. Shaer A, Azarpira N, Aghdaie MH, Esfandiari E. Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cells derived from placental decidua basalis; umbilical cord wharton's jelly and amniotic membrane. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2014;30(5).
214. Phermthai T, Thongbopit S, Pokathikorn P, Wichitwiengrat S, Julavijitphong S, Tirawanchai N. Carcinogenicity, efficiency and biosafety analysis in xeno-free human amniotic stem cells for regenerative medical therapies. *Cytotherapy*. 2017 Aug 1;19(8):990–1001.
215. Kannaiyan J, Paulraj B. Isolation, characterization and scale-up of foetal amniotic membrane derived multipotent stromal cells for therapeutic applications. *Int J Pharm Bio Sci*. 2015;6(2):376–85.
216. Grzywocz Z, Pius-Sadowska E, Klos P, Gryzik M, Wasilewska D, Aleksandrowicz B, et al. Growth factors and their receptors derived from human amniotic cells in vitro. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2014;52(3):163–70.
217. Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, et al. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*. 2014;9(2).

218. Hashim SNM, Yusof MFH, Zahari W, Noordin KBAA, Kannan TP, Hamid SSA, et al. Angiogenic potential of extracellular matrix of human amniotic membrane. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016;13(3):211–7.
219. Wu Q, Tao F, Hongxin L, Chen M, Shi P, Xining P, et al. Comparison of the proliferation, migration and angiogenic properties of human amniotic epithelial and mesenchymal stem cells and their effects on endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2017;39(4):918–26.
220. Gholipourmalekabadi M, Farhadhosseiniabadi B, Faraji M, Nourani MR. How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures? *Burns*. 2020;46(6):1254–71.
221. Silini AR, Magatti M, Cargnoni A, Parolini O. Is immune modulation the mechanism underlying the beneficial effects of amniotic cells and their derivatives in regenerative medicine? *Cell Transplantation*. 2017;26(4):531–9.
222. Kang JW, Koo HC, Hwang SY, Kang SK, Ra JC, Lee MH, et al. Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Science*. 2012;13(1):23–31.
223. Bulati M, Miceli V, Gallo A, Amico G, Carcione C, Pampalone M, et al. The Immunomodulatory Properties of the Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Induced by INF- $\gamma$  Produced by Activated Lymphomonocytes and Are Mediated by Cell-To-Cell Contact and Soluble Factors. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
224. Strom SC, Gramignoli R. Human amnion epithelial cells expressing HLA-G as novel cell-based treatment for liver disease. *Human Immunology*. 2016;77(9):734–9.
225. Umezawa A, Hasegawa A, Inoue M, Tanuma-Takahashi A, Kajiwara K, Makino H, et al. Amnion-derived cells as a reliable resource for next-generation regenerative medicine. *Placenta*. 2019;84:50–6.
226. Wassmer CH, Berishvili E. Immunomodulatory Properties of Amniotic Membrane Derivatives and Their Potential in Regenerative Medicine. *Current Diabetes Reports*. 2020;20(8).
227. Li J, Koike-Soko C, Sugimoto J, Yoshida T, Okabe M, Nikaido T. Human amnion-derived stem cells have immunosuppressive properties on NK cells and monocytes. *Cell Transplantation*. 2015;24(10):2065–76.
228. Magatti M, Vertua E, de Munari S, Caro M, Caruso M, Silini A, et al. Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2017;11(10):2895–911.
229. Witherel CE, Yu T, Concannon M, Dampier W, Spiller KL. Immunomodulatory Effects of Human Cryopreserved Viable Amniotic Membrane in a Pro-Inflammatory Environment In Vitro. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2017;10(5):451–62.

230. Magatti M, Masserdotti A, Bonassi Signoroni P, Vertua E, Stefani FR, Silini AR, et al. B Lymphocytes as Targets of the Immunomodulatory Properties of Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
231. Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, Pianta S, Parolini O. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015;3.
232. Guerra S, Mamede AC, Carvalho MJ, Laranjo M, Tralhão JG, Abrantes AM, et al. Liver diseases: what is known so far about the therapy with human amniotic membrane? *Cell and Tissue Banking*. 2016;17(4):653–63.
233. Kang NH, Hwang KA, Kim SU, Kim YB, Hyun SH, Jeung EB, et al. Potential antitumor therapeutic strategies of human amniotic membrane and amniotic fluid-derived stem cells. *Cancer Gene Therapy*. 2012;19(8):517–22.
234. Andrewartha N, Yeoh G. Human amnion epithelial cell therapy for chronic liver disease. *Stem Cells International*. 2019.
235. Manuelpillai U, Tchongue J, Lourensz D, Vaghjiani V, Samuel CS, Liu A, et al. Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl<sub>4</sub>-treated mice. *Cell Transplantation*. 2010;19(9):1157–68.
236. Manuelpillai U, Lourensz D, Vaghjiani V, Tchongue J, Lacey D, Tee JY, et al. Human Amniotic epithelial cell transplantation induces markers of alternative macrophage activation and reduces established hepatic fibrosis. *PLoS ONE*. 2012;7(6).
237. Lin JS, Zhou L, Sagayaraj A, Jumat NHB, Choolani M, Chan JKY, et al. Hepatic differentiation of human amniotic epithelial cells and in vivo therapeutic effect on animal model of cirrhosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2015;30(11):1673–82.
238. Cargnoni A, Farigu S, Cotti Piccinelli E, Bonassi Signoroni P, Romele P, Vanosi G, et al. Effect of human amniotic epithelial cells on pro-fibrogenic resident hepatic cells in a rat model of liver fibrosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2018;22(2):1202–13.
239. Alhomrani M, Correia J, Zavou M, Leaw B, Kuk N, Xu R, et al. The human amnion epithelial cell secretome decreases hepatic fibrosis in mice with chronic liver fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8.
240. Kuk N, Hodge A, Sun Y, Correia J, Alhomrani M, Samuel C, et al. Human amnion epithelial cells and their soluble factors reduce liver fibrosis in murine non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2019;34(8):1441–9.
241. Hodge A, Andrewartha N, Lourensz D, Strauss R, Correia J, Goonetilleke M, et al. Human Amnion Epithelial Cells Produce Soluble Factors that Enhance Liver Repair by Reducing Fibrosis While Maintaining Regeneration in a Model of Chronic Liver Injury. *Cell Transplantation*. 2020;29.
242. Zhang DG, Jiang MY, Miao D. Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse. *PLoS ONE*. 2011;6(2).

243. Kubo K, Ohnishi S, Hosono H, Fukai M, Kameya A, Higashi R, et al. Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Liver Fibrosis in Rats. *Transplantation Direct*. 2015;1(4):1–9.
244. Lee PH, Tu CT, Hsiao CC, Tsai MS, Ho CM, Cheng NC, et al. Antifibrotic Activity of Human Placental Amnion Membrane-Derived CD34+ Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Transplantation in Mice With Thioacetamide-Induced Liver Injury. *Stem Cells Translational Medicine*. 2016;5(11):1473–84.
245. Fu Q, Ohnishi S, Sakamoto N. Conditioned medium from human amnion-derived mesenchymal stem cells regulates activation of primary hepatic stellate cells. *Stem Cells International*. 2018.
246. Pietrosi G, Fernández-Iglesias A, Pampalone M, Ortega-Ribera M, Lozano JJ, García-Calderó H, et al. Human amniotic stem cells improve hepatic microvascular dysfunction and portal hypertension in cirrhotic rats. *Liver International*. 2020;40(10):2500–14.
247. Parolini O, Caruso M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: An update. *Placenta*. 2011;32(2).
248. Sant’Anna LB, Cargnoni A, Ressel L, Vanosi G, Parolini O. Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. *Cell Transplantation*. 2011;20(3):441–53.
249. Ricci E, Vanosi G, Lindenmair A, Hennerbichler S, Peterbauer-Scherb A, Wolbank S, et al. Anti-fibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model. *Cell and Tissue Banking*. 2013;14(3):475–88.
250. Sant’Anna LB, Hage R, Cardoso MAG, Arisawa EAL, Cruz MM, Parolini O, et al. Antifibrotic effects of human amniotic membrane transplantation in established biliary fibrosis induced in rats. *Cell Transplantation*. 2016;25(12):2245–57.
251. Sant’Anna LB, Brito FS, Barja PR, Nicodemo MC. Long-term effects of human amniotic membrane in a rat model of biliary fibrosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2017;50(7).
252. Garrido M, Escobar C, Zamora C, Rejas C, Varas J, Córdova C, et al. Transplantation of human amniotic membrane over the liver surface reduces hepatic fibrosis in a cholestatic model in young rats. *Stem Cells International*. 2018.
253. Mamede KM, Sant’Anna LB. Antifibrotic effects of total or partial application of amniotic membrane in hepatic fibrosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2019;91(3).

