

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida  
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

---

**Implementación de un modelo *in vitro* de esteatohepatitis no  
alcohólica para evaluar la actividad anti-fibrótica de  
nanopartículas**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**David Alejandro García Topete**

Ensenada, Baja California, México  
2023

Tesis defendida por  
**David Alejandro García Topete**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Ana Bertha Castro Ceseña**  
Codirectora de tesis

---

**Dr. Marco Antonio De León Nava**  
Codirector de tesis

**Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro**

**Dra. Johanna Bernáldez Sarabia**

**Dr. Santiago Camacho López**



---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dr. Pedro Negrete Regagnon**  
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **David Alejandro García Topete** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología

**Implementación de un modelo *in vitro* de esteatohepatitis no alcohólica para evaluar la actividad anti-fibrótica de nanopartículas**

Resumen aprobado por:

---

**Dra. Ana Bertha Castro Ceseña**  
Codirectora de tesis

---

**Dr. Marco Antonio De León Nava**  
Codirector de tesis

Alrededor del 33% de la población mundial sufre la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD). Del total de estos pacientes, un 30% puede progresar y padecer esteatohepatitis no alcohólica (NASH), el punto crítico en el que la falta de tratamiento lleva a la cirrosis y a la falla hepática. En 2019, la Asociación Mexicana de Gastroenterología y la Asociación Mexicana de Hepatología estimaron que la prevalencia de esta enfermedad podría superar el 50%, por lo que se considera un problema de salud nacional. La transdiferenciación de células estrelladas hepáticas (HSCs) a miofibroblastos es la principal causa de la disfunción hepática, que provoca la sobreexpresión crónica de genes profibróticos e inflamación en enfermedades como la NASH. Los recientes avances científicos indican que los nanomateriales conjugados con agentes que tengan capacidad anti-oxidante y anti-inflamatoria podrían ser una opción para atenuar la actividad de las HSCs transdiferenciadas. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue determinar la actividad de nanopartículas (NPs) cargadas con agentes anti-oxidantes en HSCs transdiferenciadas. Para cumplirlo, implementamos un modelo de estudio, *in vitro*, de un co-cultivo formado por HSCs de un donador humano diagnosticado con NASH (HHSC-N) y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Los co-cultivos fueron tratados ya sea con: (1) NPs de plata funcionalizadas con ácido alfa-lipoico (AgNPs-ALA) a 6.25, 12.5 y 17.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (2) puntos cuánticos de carbono (CD), o (3) CD conjugados con lactoferrina (CD-LF) a 5, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24 o 72 h. Los resultados muestran que los tratamientos con NPs modulan significativamente los niveles de expresión de genes en las HHSC-N en co-cultivo a las 72 h, disminuyendo los niveles de ACTA2, actina expresada en HSCs transdiferenciadas; COL1A1, productor de colágeno tipo I; y TIMP1, productor de inhibidores tisulares de metaloproteinasas, con respecto a las células que no fueron tratadas con NPs. También se detectaron las citocinas solubles en los medios de los co-cultivos, cuyas concentraciones sugieren una respuesta asociada a un proceso de inflamación/regeneración en progreso. Nuestros resultados pueden ser un punto de partida para el desarrollo de un tratamiento para la NASH, usando bionanotecnología.

**Palabras clave:** células estrelladas hepáticas; fibrosis hepática; inflamación; co-cultivo; nanopartículas.

Abstract of the thesis presented by **David Alejandro García Topete** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology

**Implementation of an *in vitro* non-alcoholic steatohepatitis model to assay the anti-fibrotic activity of nanoparticles**

Abstract approved by:

---

**Dra. Ana Bertha Castro Ceseña**

Thesis codirector

---

**Dr. Marco Antonio De León Nava**

Thesis codirector

Around 33% of the global population suffers from non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). From these patients, 30% of them progress into non-alcoholic steatohepatitis (NASH), the critical point where lack of treatment leads to cirrhosis and hepatic failure. In 2019, the Mexican Association of Gastroenterology and Mexican Association of Hepatology estimated that the prevalence of this disease could surpass 50%, making it a national health problem. The transdifferentiation of hepatic stellate cells (HSCs) to myofibroblasts contributes the most to hepatic dysfunction, which leads to chronic overexpression of profibrotic genes in diseases such as NASH. Recent scientific reports indicate that nanomaterials conjugated with anti-oxidant and anti-inflammatory agents have potential to reduce the activity of transdifferentiated HSCs. Therefore, the objective of this project was to determine the activity of anti-oxidant agent loaded nanoparticles (NPs). To achieve it, we implemented an *in vitro* study model formed by a co-culture of HSCs from a single NASH diagnosed human donor (HHSC-N) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The co-cultures were treated with: (1) silver NPs conjugated with alpha-lipoic acid (AgNPs-ALA) at 6.25, 12.5 and 17.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (2) quantum carbon dots (CD) and (3) CD conjugated with lactoferrin (CD-LF) at 5, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 24 h or 72 h. Results demonstrate that the NPs treatments were able to significantly modulate profibrotic genes' expression levels in co-cultured HHSC-N. At 72 h of treatment, the levels of genes like ACTA2, an actin expressed on transdifferentiated HSCs; COL1A1, producer of collagen type I; and TIMP1, producer of tissue inhibitor metalloproteinases, were reduced when compared to cells that weren't treated with NPs. In addition to this, soluble cytokines were detected in the co-culture's media, whose concentrations may suggest an inflammation/regeneration associated response in progress. Our findings may serve as a starting point for the development of a treatment for NASH using bionanotechnology.

**Keywords:** hepatic stellate cells; hepatic fibrosis; inflammation; co-culture; nanoparticles.

## Dedicatoria

A mis padres, mis hermanos y mis sobrinos por ser una familia en la cual siento que puedo contar incondicionalmente y por siempre amarme. Por ellos estoy dispuesto a hacer mi mejor esfuerzo para cuidarlos como ellos me han cuidado a mí.

A mis amigos con los que comparto vínculos tan especiales, tanto los que se encuentran en mi ciudad natal como aquellos que se encuentran en algún otro país o los que formé en Ensenada durante mi estancia.

A mí mismo, por atrever a sumergirme en un nuevo reto, a salir de mi zona de confort, por entrar a un mundo en el cual no sabía si yo sería lo suficientemente bueno para cumplir las expectativas que yo mismo me había plantado y, en el final, por lograr mis objetivos.

*"We all have something within that is pushing us, to take that plunge head-first into hell. For most people... That something... Is not their own will. They're forced into it by their environment or the expectations of others; it was never their own choice. But when we choose to immerse ourselves in that same hell willingly... We can see something beyond it... It might even be hope. Or in the end just a hell of another making. You'll never know if you're not the one who's continuing to take that path... Unless you keep moving forward." -Eren Jaeger*

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica de Educación Superior de Ensenada, Baja California por permitirme realizar mis estudios de Maestría en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme una beca de apoyo económico durante mis estudios de posgrado, con el número de becario: 1042036.

A mi comité de tesis. A la doctora Ana Bertha Castro Ceseña por aceptarme en su grupo de trabajo, por siempre brindarme atención sin importar el momento del día, por sus comentarios alentadores y apoyo tanto en el ámbito académico como en el personal y por ser una persona amable y comprensible. Al doctor Marco Antonio de León Nava por sus comentarios, recomendaciones y por brindarme parte del material necesario para la realización del proyecto. A los miembros de mi comité por capacitarme para la realización de mis experimentos, por apoyarme con material de trabajo y por sus comentarios enriquecedores que le dieron forma al proyecto.

A aquellos que me ayudaron con material de trabajo. Al M. C. Carlos Guzmán e ing. Marco Urióstegui por sintetizar y proveerme con las muestras de puntos cuánticos de carbono para mis experimentos. Al doctor Gerard Jean Fournier Pierrick por donarnos células HepG2 para realizar un ensayo.

A mis padres por siempre creer en mí, por siempre darme palabras de apoyo, por brindarme apoyo económico para vivir cómodamente, por recibirme cálidamente cada que volvía a casa, y por amarme incondicionalmente.

A mis amigos tan especiales Iván, Octavio y Alejandra que hicieron de mi tiempo en Ensenada una experiencia más emocionante y placentera. Especialmente a Iván por ser el mejor roomie que pude haber pedido. A Gabriela por ser la compañera de laboratorio más divertida. No creo que hubiera llegado tan lejos sin la amistad y apoyo de todos ellos.

A la doctora Laura Angélica Ibeth Álvarez Lee por su inmensa ayuda durante la parte más importante de mi tesis, por sus comentarios tan alentadores cuando me sentía desmotivado para seguir adelante, por creer siempre en mí cuando yo no lo hacía y por motivarme a ser una mejor persona.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y la fibrosis hepática.....	2
1.1.2 Células del hígado.....	4
1.1.3 Respuesta inmunológica.....	5
1.1.4 Nanopartículas de plata y puntos cuánticos de carbono.....	6
1.1.5 Ácido alfa lipoico y lactoferrina.....	7
1.1.6 Trasplante de hígado.....	8
1.1.7 AgNPs-ALA y CD-LF como tratamiento terapéutico contra la NASH.....	8
1.2 Justificación.....	9
1.3 Hipótesis.....	10
1.4 Objetivos.....	10
1.4.1 Objetivo general.....	10
1.4.2 Objetivos específicos.....	10
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>11</b>
2.1 Materiales.....	11
2.2 Ensayos colorimétricos para la selección de nanopartículas y concentraciones con mayor potencial de actividad hepatoprotectora.....	12
2.2.1 Evaluación de la capacidad antioxidante de nanopartículas.....	12



2.2.1.1	ABTS.....	12
2.2.1.2	DPPH.....	13
2.2.2	Capacidad de remoción de óxido nítrico (NO*).....	14
2.2.3	Pruebas de viabilidad celular de MNPs-ALA, CD y CD-LF en fibroblastos de ratón L929..	14
2.2.4	Ensayo indicador de SEAP en HEK-Blue TGF-β.....	16
2.3	Cultivo de células estrelladas hepáticas humanas de donadores esteatohepatitis no alcohólica (HHSC-N) .....	17
2.4	Pruebas de viabilidad celular de MNPs-ALA, CD y CD-LF en HHSC-N y HepG2.....	18
2.5	Muestras de sangre periférica.....	18
2.6	Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).....	18
2.7	Co-cultivo de HHSC-N y PBMCs para posteriores tratamientos con nanopartículas .....	19
2.8	Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	20
2.9	Reacciones de PCR en Tiempo Real (qPCR) de muestras tratadas .....	21
2.10	Detección de citocinas sobrenadantes en cultivos de HHSC-N y PBMCs por citometría de flujo .....	23
2.11	Análisis estadístico .....	25
<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>		<b>26</b>
3.1	Evaluación de la capacidad antioxidante de nanopartículas .....	26
3.2	Evaluación de la remoción del radical óxido nítrico (NO*) de nanopartículas.....	28
3.3	Pruebas preliminares de viabilidad celular en línea celular L929 .....	30
3.4	Ensayo indicador de la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) en la línea celular HEK-Blue TGF-β.....	32
3.4.1	Tratamientos con AgNPs-ALA: Detección de SEAP por QUANTI-Blue y viabilidad celular	32
3.4.2	Tratamientos con CD-LF y LF: Producción de SEAP y viabilidad celular .....	33
3.5	Pruebas de viabilidad celular en células estrelladas hepáticas humanas de un donador con NASH (HHSC-N) y en hepatocitos HepG2 .....	34
3.5.1	Evaluación de la viabilidad celular de las AgNPs-ALA por 24, 48 y 72 h .....	34
3.5.2	Evaluación de la viabilidad celular con los CD por 24, 48 y 72 h.....	35

3.5.3	Evaluación de la viabilidad celular con los CD-LF por 24, 48 y 72 h.....	35
3.5.4	Tratamientos de AgNPs-ALA, CD y CD-LF en línea celular de hepatocitos HepG2 .....	36
3.6	Expresión de genes profibróticos en co-cultivos de células estrelladas hepáticas humanas de donadores con NASH (HHSC-N) y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) ....	37
3.6.1	Niveles de referencia de expresión de genes profibróticos .....	38
3.6.2	Tratamientos con AgNPs-ALA, CD y CD-LF en monocapa de HHSC-N por 24 h.....	39
3.6.3	Tratamientos con AgNPs-ALA, CD y CD-LF en co-cultivo HHSC-N y PBMCs por 24 h .....	40
3.6.4	Tratamientos con AgNPs-ALA, CD y CD-LF en co-cultivo HHSC-N y PBMCs por 72 h .....	42
3.7	Detección de citocinas solubles en co-cultivos de células estrelladas hepáticas humanas de un donador con NASH (HHSC-N) y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) ...	44
3.7.1	Niveles de referencia de citocinas sin tratamientos en cultivos con HHSC-N y PBMCs .....	44
3.7.2	Citocinas solubles detectadas en co-cultivos con HHSC-N y PBMCs tratados con AgNPs-ALA por 24 h y 72 h .....	46
3.7.3	Citocinas solubles detectadas en co-cultivos con HHSC-N y PBMCs tratados con CD por 24 h y 72 h.....	50
3.7.4	Citocinas solubles detectadas en co-cultivos con HHSC-N y PBMCs tratados con CD-LF por 24 h y 72 h.....	53
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>56</b>
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>74</b>
5.1	Conclusiones .....	74
5.2	Perspectivas .....	75
	<b>Literatura citada .....</b>	<b>76</b>
	<b>Anexos .....</b>	<b>86</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Consecuencias de la transdiferenciación de células estrelladas hepáticas. ....	4
2. Respuesta inmunológica del hígado y factores asociados en diferentes etapas.....	6
3. Factores determinantes en el progreso de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) .....	9
4. Vía de señalización de TGF- $\beta$ en células HEK-Blue TGF- $\beta$ .....	17
5. Diagrama del ensayo para detección de citocinas solubles.....	25
6. Inhibición de oxidación de AgNPs-ALA mediante el ensayo de capacidad antioxidante por medio de ABTS .....	26
7. Inhibición de oxidación de MoS <sub>2</sub> a-ALA y MoS <sub>2</sub> b-ALA mediante el ensayo de capacidad antioxidante por medio de ABTS.....	27
8. Inhibición de oxidación de MoS <sub>2</sub> a-ALA y MoS <sub>2</sub> b-ALA mediante el ensayo de capacidad antioxidante por medio de DPPH.....	27
9. Inhibición de oxidación de CD y CD-LF mediante el ensayo de capacidad antioxidante por medio de ABTS .....	28
10. Remoción de NO* por parte de las AgNPs-ALA .....	29
11. Remoción de NO* por parte de las nanopartículas MoS <sub>2</sub> a-ALA .....	29
12. Remoción de NO* por parte de los CD y CD-LF .....	30
13. Viabilidad celular en fibroblastos de ratón L929 a las 24 h .....	31
14. Fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) detectada por QUANTI-Blue y porcentajes de viabilidad celular en células HEK-Blue TGF- $\beta$ tratadas con AgNPs-ALA .....	32
15. Fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) detectada por QUANTI-Blue y porcentajes de viabilidad celular en células HEK-Blue TGF- $\beta$ tratadas con CD-LF y LF.....	33
16. Viabilidad celular en células HHSC-N tratadas con diversas concentraciones de AgNPs-ALA.....	34
17. Viabilidad celular en células HHSC-N tratadas con diversas concentraciones de CD .....	35
18. Viabilidad celular en células HHSC-N tratadas con diversas concentraciones de CD-LF .....	35
19. Viabilidad celular en células HepG2 tratadas con diversas concentraciones de AgNPs-ALA, CD y CD-LF .....	36

20. Niveles de referencia de expresión de genes profibróticos en HHSC-N en monocapa y co-cultivadas con PBMCs .....	38
21. Niveles de expresión de genes profibróticos en monocapa de HHSC-N con diferentes tratamientos durante 24 h.....	39
22. Niveles de expresión de genes profibróticos en co-cultivo de HHSC-N y PBMCs con diferentes tratamientos durante 24 h.....	40
23. Niveles de expresión de genes profibróticos en co-cultivo de HHSC-N y PBMCs con diferentes tratamientos durante 72 h.....	42
24. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs sin tratamientos .....	45
25. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs tratados con AgNPs-ALA [1/2].....	47
26. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs tratados con AgNPs-ALA [2/2].....	48
27. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs tratados con CD [1/2].....	50
28. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs tratados con CD [2/2].....	51
29. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs tratados con CD-LF [1/2] .....	53
30. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs tratados con CD [2/2].....	54

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Nanopartículas y concentraciones evaluadas.....	11
2. Volúmenes por tubo para sintetizar una muestra de ADNc con el kit de síntesis ADNc SuperScript VILO™.....	20
3. Genes profibróticos evaluados en HHSC-N.....	21
4. Oligonucleótidos utilizados para qPCR en HHSC-N.....	22
5. Componentes para reacción qPCR de muestras con HHSC-N.....	22
6. Citocinas evaluadas asociadas a poblaciones de linfocitos Th que las producen. Tomado del manual de Multi-Analyte Flow Assay Kit HU Th Cytokine Panel (12-plex) V02 .....	24
7. Eficiencias de amplificación para graficar expresión relativa de genes profibróticos. ....	37
8. Relación de muestras con HHSC-N evaluadas en el proyecto .....	86

## Capítulo 1. Introducción

---

Las defunciones provocadas por enfermedades del hígado corresponden a un total de dos millones anualmente, de las cuales un millón están asociadas a enfermedades crónicas de hígado y complicaciones por cirrosis, una etapa tardía de la fibrosis con alto grado de cicatrización. Mientras que el otro millón de pacientes padece hepatitis viral y carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés). Estas estadísticas convirtieron a la cirrosis en la decimoprimer causa de muerte a nivel mundial en el 2015. Adicionalmente, alrededor de dos mil millones de adultos sufren de obesidad o sobrepeso, y 400 millones tienen diabetes, a nivel mundial. Estas condiciones representan factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas como hígado graso no alcohólico (NAFL, por sus siglas en inglés), la cual puede progresar a esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés) con desarrollo de fibrosis, el cual representa el punto crítico, ya que el daño hasta este estado puede ser revertido con la ayuda de tratamiento antes de que progrese a cirrosis. Con el creciente número de personas que presentan factores de riesgo, las probabilidades de que la población presente una enfermedad crónica hepática son cada vez más altas (Flegal et al., 2012; Marchesini et al., 2016; Mokdad et al., 2014; Singh et al., 2015).

La NASH es producto de la acumulación de lípidos como triglicéridos en forma de gotas lipídicas en los hepatocitos y de la oxidación disminuida de ácidos grasos libres en el hígado, lo cual lleva a la expansión (ballooning, por sus siglas en inglés) y apoptosis de hepatocitos seguido de una respuesta inflamatoria con depósitos de colágeno (Allaire and Gilgenkrantz, 2020). El progreso de la NASH lleva consigo el desarrollo de la fibrosis hepática, la cual resulta del daño ocasionado por inflamación o enfermedades crónicas del hígado. Esta condición se caracteriza por la síntesis aumentada de colágeno fibrilar y la degradación disminuida de proteínas de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), lo cual ocasiona un depósito excesivo de colágeno y, por lo tanto, endurecimiento del órgano y fallas en sus funciones debido a la pérdida de los hepatocitos, las células más abundantes del hígado que además tienen capacidad regenerativa (Henderson e Iredale, 2007). La causa principal de esta incapacidad es la transdiferenciación o activación de las células estrelladas hepáticas (HSCs, por sus siglas en inglés). Dicho suceso inicia la secreción de citocinas, especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y factores de crecimiento, los cuales promueven la activación, proliferación y migración de las HSCs a la zona lesionada. La transdiferenciación de HSCs resulta en la perpetuación del estado fibrótico. Por lo tanto, la inactivación de las HSCs se ha catalogado como el blanco principal para promover la regeneración de tejido hepático (Eng and Friedman, 2000).

El trasplante de hígado es el tratamiento más eficiente contra etapas avanzadas de fibrosis, sin embargo, la baja cantidad de donadores lo convierte en una opción poco viable para resolver el problema a gran escala (UNOS, 2015). A la fecha, la mayoría de los tratamientos alternativos mediante terapia convencional no son efectivos, ya que se enfocan en suprimir la inflamación y no en detener y/o revertir la fibrosis (Poilil Surendran et al., 2017). La medicina regenerativa ofrece una alternativa mediante la entrega dirigida de agentes terapéuticos para reducir la producción de elementos que perpetúan el estado de fibrosis, entre los cuales destacan las ROS.

Un tratamiento emergente para enfermedades hepáticas como NASH son las nanopartículas (NPs) como las NPs metálicas o los puntos cuánticos de carbono (CD, por sus siglas en inglés), debido a que pueden ser conjugados en su superficie gracias a sus propiedades fisicoquímicas, y por su tamaño pueden ser absorbidas por las HSCs (Poilil Surendran et al., 2017). Es posible recubrir las NPs con un agente antioxidante para reducir la producción de ROS. Entre las opciones, el ácido alfalipoico (ALA, por sus siglas en inglés) ha evidenciado reducir la cantidad de HSCs activadas, en un hígado con daño inducido, en un 83% (El-Maadawy et al., 2020). Por otro lado, el uso de lactoferrina (LF) muestra una reducción de hasta un 37% en los niveles de expresión del gen indicador de la transdiferenciación de las HSCs, ACTA2, entre otros genes profibróticos, en un modelo de estudio con ratas Sprague Dawley con daño hepático inducido por dimetilnitrosamina (DMN) que fueron tratadas con 100 mg/kg de LF por 4 semanas. Hasta la fecha, no se han reportado resultados sobre el efecto de AgNPs recubiertas con ALA (AgNPs-ALA) ni de puntos cuánticos de carbono conjugados con lactoferrina (CD-LFs) en HSCs. Por lo tanto, en este proyecto se propone estudiar el efecto sinérgico de AgNPs-ALA, CDs o CD-LFs, en las HSCs como un potencial tratamiento para la NASH.

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y la fibrosis hepática**

La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) se puede definir como el estado avanzado de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) ya que comparten la misma característica principal, la acumulación de grasa en las células más abundantes del hígado, los hepatocitos. Su causa bien podría ser por una ingesta desproporcionada de grasas en la dieta cotidiana. La oxidación constante de ácidos grasos genera niveles incrementados de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como otros metabolitos citotóxicos. Dichos

incrementos promueven el estrés oxidativo y lipotóxico que llevan a la aparición de los indicadores que definen el paso de NAFLD a NASH: daño celular e inflamación. Por lo tanto, la NASH es una combinación de esteatosis hepática, inflamación y la presencia de hepatocitos inflados por la sobrecarga de lípidos dentro de la célula, hasta un punto en el cual mueren los hepaticos debido a la ruptura de sus membranas celulares (Barbero-Becerra et al., 2015; Zisser et al., 2021). Es entonces donde el hígado trata de reparar el daño inducido mediante la producción y depósito de proteínas de matriz extracelular (ECM), por ejemplo, el Colágeno tipo I por obra del gen COL1A1. El depósito de proteínas de ECM es una respuesta regenerativa normal, ya que una vez que se recuperen los hepatocitos apoptóticos, las proteínas de ECM son removidas en el estado de resolución. Sin embargo, cuando hay un depósito excesivo de las proteínas de ECM puede ocurrir fibrosis, fenómeno que provoca la formación de cicatrices, endurecimiento del órgano y una alteración en la composición del hígado. Esta alteración conlleva a la formación de una malla acelular de tejido conectivo, compuesta principalmente de colágeno y promueve su propio entrecruzamiento, lo cual dificulta el trabajo de las enzimas que degradan la ECM (Issa et al., 2003; Ramachandran e Iredale, 2012).

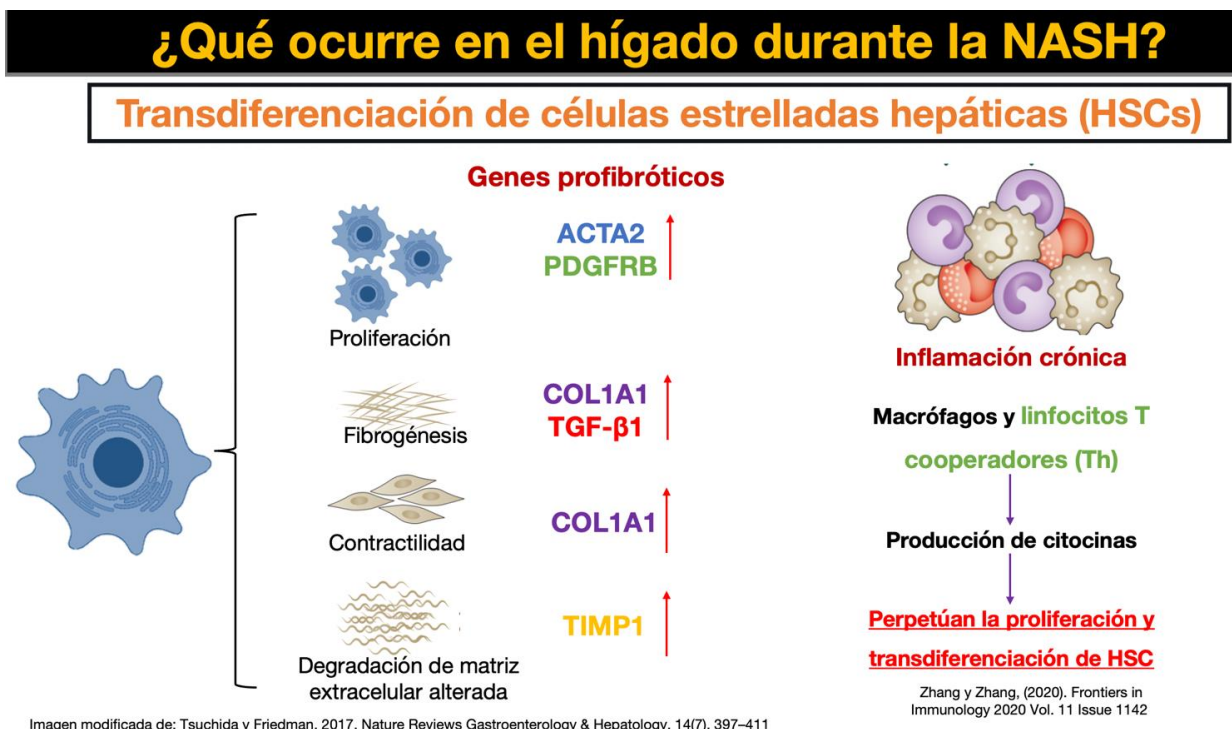
El progreso de la fibrosis puede ser lento o rápido, dependiendo de la patología y continua exposición a toxinas e inflamación crónica. Para medirlo se utiliza una escala del 0 al 4 (Schuppan and Afdhal, 2008). El estado 0 es un hígado sano, el 1 presenta inflamación en el tejido hepático, en el 2 disminuyen las funciones hepáticas ya que se presenta un depósito fibrótico y cicatrización, en el 3 hay una acumulación continua de tejido fibrótico, lo cual lleva a la pérdida de funciones normales hepáticas. Finalmente, se presenta la cuarta etapa crítica, conocida como cirrosis, en la que el hígado sufre de hipoproteïnemia porque no puede producir biomoléculas esenciales y se acumulan sustancias tóxicas en el cuerpo (Schuppan and Afdhal, 2008).

La importancia de tratar a las personas que presentan la NASH tiene un alto impacto clínico porque es el punto crítico para poder revertir el daño con la fibrosis tan pronto como en el estado 2 ó 3 de la escala, ya que es el punto ideal para evitar una pérdida mayor o total del hígado. Considerando la importancia fisiológica del hígado, para diseñar tratamientos terapéuticos efectivos contra la NASH y la fibrosis es necesario conocer la composición de este órgano y los factores causantes de la NASH y fibrosis.



### 1.1.2 Células del hígado

El hígado está compuesto principalmente por hepatocitos, las células que realizan la mayoría de las funciones del órgano. El resto del tejido hepático está conformado por las células estrelladas hepáticas (HSCs), células de Kupffer (KC, por sus siglas en inglés), células endoteliales sinusoidales del hígado (LSECs, por sus siglas en inglés), células epiteliales biliares y células hepáticas progenitoras. Las LSECs cuentan con fenestraciones para habilitar el paso de nutrientes hacia los hepatocitos a través de un espacio subendotelial conocido como el espacio de Disse (DS, por sus siglas en inglés). Los principales causantes de la fibrogénesis son los miofibroblastos, derivados típicamente del linaje de células mesenquimales mediante la transdiferenciación (reprogramación del linaje). A consecuencia de esta transdiferenciación, hay exceso de moléculas de ECM como el colágeno tipo I y III en el DS, así como otras proteínas contribuyentes al tejido fibroso, destacando la actina de músculo liso alfa ( $\alpha$ -SMA) y el inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP-1). Adicionalmente, las fenestraciones se vuelven más estrechas o cerradas y se detiene el suministro de nutrientes a los hepatocitos. Las HSCs, ubicadas en el DS, son las células mesenquimales residentes del hígado, por lo tanto, son precursores a miofibroblastos y su transdiferenciación, con base a la respuesta inmunológica, es la principal fuente de fibrogénesis en el órgano durante enfermedades crónicas (Figura 1). (Friedman, 2008; Higashi et al., 2017).

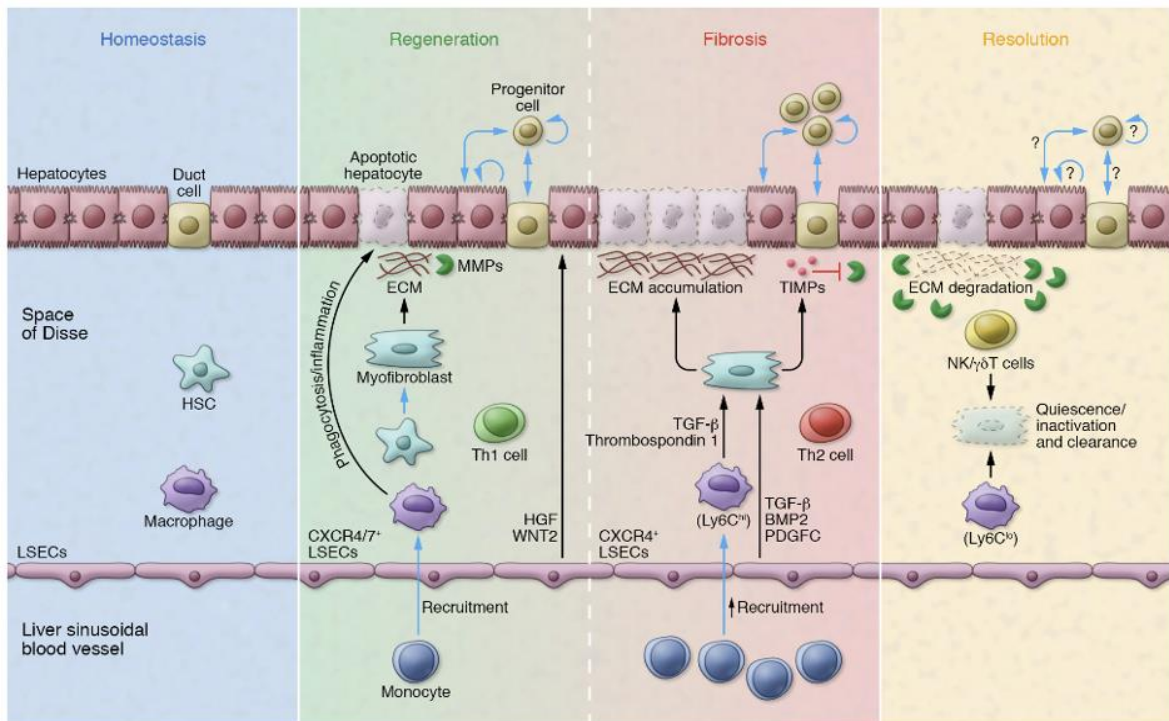


**Figura 1. Consecuencias de la transdiferenciación de células estrelladas hepáticas.** Imagen modificada de Tsuchida y Friedman, 2017; Zhang y Zhang, 2020.

### 1.1.3 Respuesta inmunológica

La respuesta inmunológica en el hígado es mediada principalmente por las KC y las mismas HSCs activadas, ambos tipos de células secretan citocinas y factores de crecimiento (Figura 2), como el factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ 1, el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- $\alpha$  y la Interleucina (IL)-6, los cuales activan vías de señalización que promueven la transdiferenciación de las HSCs, la transcripción de genes profibróticos y perpetúan el estado de fibrosis (Friedman and Arthur, 1989; Kamimura and Tsukamoto, 1995; Matsuoka and Tsukamoto, 1990; Selzner et al., 2003). En la respuesta inmunológica también se reclutan macrófagos derivados de monocitos, los cuales pueden liberar tromboespondina 1 para promover la activación de TGF- $\beta$ 1 (Ly6Chi) (Ramachandran et al., 2012) o promover la inactivación de las HSCs (Ly6Clo) (Taimr, 2003) dependiendo de su fenotipo. Otro linaje celular involucrado en la respuesta inmunológica en el hígado son los linfocitos T colaboradores (Th), en particular las subpoblaciones Th1 y Th2, que contribuyen a modular la respuesta inmune hepática (Cordero-Espinoza and Huch, 2018). Estas células se pueden aislar a partir de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés), las cuales dan una respuesta selectiva al sistema inmune ante la exposición a agentes químicos o daño celular (Pourahmad y Salimi, 2015). Las PBMCs están compuestas principalmente por linfocitos (70-90%) como CD3+ T y en menor medida por linfocitos B y células Natural Killer (NK). Además de linfocitos, incluye en menor medida monocitos (10-20%) y células dendríticas (1-2%). Los linfocitos CD3+ se componen por linfocitos CD4+ y CD8+ (citotóxicos). Ya que la mayoría de las PBMCs son vírgenes, pueden responder a estímulos del ambiente inflamatorio para realizar funciones efectoras. De esta manera, las células CD4+ se pueden activar y desarrollar a células colaboradoras como Th1, Th2, Th17, entre otros tipos de células reguladoras. Es por esto que los linfocitos Th son mediadores esenciales de la homeostasis inmune y la inflamación (Kleiveland, 2015). En el hígado, los linfocitos Th2 exacerbaban la fibrosis al secretar las citocinas IL-4 e IL-3, las cuales ocasionan que los macrófagos produzcan TGF- $\beta$ 1 y que los miofibroblastos depositen más ECM. Por otro lado, los linfocitos Th1 previenen la formación de tejido cicatricial al producir citocinas que contrarrestan la producción de TGF- $\beta$ 1 como el Interferón (IFN)- $\gamma$  y la IL-12. En el estado de resolución tanto los macrófagos como las células NK se encargan de deshacerse de las HSCs inactivadas (Figura 2) (Fichtner-Feigl et al., 2006; Marth et al., 1997; Tiggeleman et al., 1995).

Para poder tratar las HSCs transdiferenciadas es ideal el uso de un agente terapéutico con el tamaño adecuado para atravesar por las reducidas fenestraciones de las LSECs y se pueda dirigir directamente a las HSCs para inhibir su activación.



**Figura 2. Respuesta inmunológica del hígado y factores asociados en diferentes etapas.** Imagen tomada de Cordero-Espinoza y Huch, 2018.

#### 1.1.4 Nanopartículas de plata y puntos cuánticos de carbono

Las nanopartículas de plata (AgNPs) han sido utilizadas en aplicaciones como agentes antimicrobianos, vehículo para la entrega de fármacos y genes, así como en biosensores. Las AgNPs pueden ser entregadas a tejidos específicos y compartimentos subcelulares o células malignas en la circulación. Esta capacidad de ser entregadas se debe a que se puede modificar su carga de superficie y composición del material, lo que convierte a las AgNPs en un tratamiento terapéutico más seguro contra las HSCs para remediar la fibrosis hepática. Se han evidenciado los efectos citotóxicos de las AgNPs en HSCs cuyos resultados muestran: (1) una rápida internalización de AgNPs a HSCs y un efecto negativo en las HSCs en concentraciones bajas (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de AgNPs); (2) que AgNPs de 10 nm mostraron mayor inducción de apoptosis que de necrosis a comparación de tamaños más grandes como 30 y 50 nm; y (3) se alteró la secreción de metaloproteinasas de matriz 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9), lo cual contribuye a atenuar el microambiente de activación de HSCs (Sun et al., 2013). Adicionalmente, es posible recubrir las AgNPs con algún fármaco o agente terapéutico que contribuya a disminuir la inflamación, inhiba la producción de otras citocinas profibróticas y promueva un ambiente apto para la regeneración de hepatocitos. De acuerdo a reportes, un candidato prometedor es el ALA (El-Maadawy et al., 2020). Por otro lado, los puntos cuánticos de carbono (CD), los cuales son nanomateriales de carbono de alrededor de 10 nm, son un reciente candidato en el campo de la

nanomedicina, ya que tiene cualidades como biocompatibilidad, solubilidad en agua, pequeño tamaño, baja toxicidad y capaces de ser conjugados (Devi et al., 2019). Algunas de sus aplicaciones biomédicas son en biosensado, bioimagen, entrega de fármacos, entrega de genes, tratamiento para la inflamación y hasta en la terapia fotodinámica para tratar cáncer (Azam et al., 2021). Su uso en HSCs se ha demostrado en un estudio que bioconjugó ácido hialurónico con los CDs para la entrega dirigida a las HSCs en un modelo murino con cirrosis, demostrando potencial para la entrega dirigida de fármacos para enfermedades hepáticas como la NASH (Kim et al., 2010).

### 1.1.5 Ácido alfa lipoico y lactoferrina

El ácido alfa lipóico (ALA, ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico) es un compuesto ditiol natural que se sintetiza enzimáticamente a partir del ácido octanóico en la mitocondria. El ALA puede servir como un potente antioxidante mediante mecanismos como la neutralización de radicales libres, quelación de metales iónicos y regeneración de antioxidantes endógenos y exógenos. Dichas funciones del ALA son cruciales para la inactivación de HSCs ya que el estrés oxidativo causa la muerte de los hepatocitos y activa a las HSCs mediante la sobreproducción de ROS, segundos mensajeros para TGF- $\beta$ 1 y PDGF, los cuales son dos grandes factores fibróticos en el hígado. Por lo tanto, si se reduce la expresión de ROS es posible inhibir estas vías de señalización mediante ALA (Foo et al., 2011). Se ha evidenciado en un modelo de rata con fibrosis de estadio 2 que el ALA redujo significativamente la producción de PDGF, TGF- $\beta$ 1 y TIMP-1 en un 49%, 59% y 48%, respectivamente, a comparación de los niveles expresados en ratas con daño inducido por tioacetamina (TAA) (El-Maadawy et al., 2020). También se evidenció un declive en la activación de HSCs al reportar un 83% de reducción en los niveles de  $\alpha$ -SMA, un marcador común de la transdiferenciación de HSCs, debido a la inhibición de la autofagia en estas células. Al impedir el suministro de energía otorgado por la autofagia, las HSCs se volvieron susceptibles a la apoptosis, de manera que contribuye a la regresión de manera que contribuye a la regresión de la fibrosis hepática (El-Maadawy et al., 2020).

Por otro lado, la lactoferrina (LF) es una glicoproteína que se une al hierro que pertenece a la familia de las transferrinas. Es secretada por células glandulares pero también es encontrada en neutrófilos en la sangre periférica así como en tejidos inflamados ya que juega un papel importante en la respuesta inmune. Esto se ha evidenciado en un modelo de ratas Wistar en donde la LF ha demostrado tener efectos anti-inflamatorios, anti-oxidantes y hepatoprotectores (Farid et al., 2021). Mientras que otros estudios demuestran que los tratamientos con LF logran inhibir o al menos disminuir la transdiferenciación de las

HSCs, entre ellos se utiliza un modelo de estudio con ratas a las cuales se les indujo la enfermedad de NASH y se trataron con LF con la que lograron reducir los niveles de expresión de genes profibróticos y la secreción de citocinas inflamatorias (Aoyama et al., 2022; H. A. Chen et al., 2016; Tung et al., 2014). Estos resultados deben contrastarse con el trasplante de hígado, el cual es el tratamiento terapéutico más efectivo en etapas terminales como cirrosis y carcinoma hepatocelular (HCC). Sin embargo, como se documenta a continuación, tiene sus limitaciones para cubrir la alta demanda de órganos.

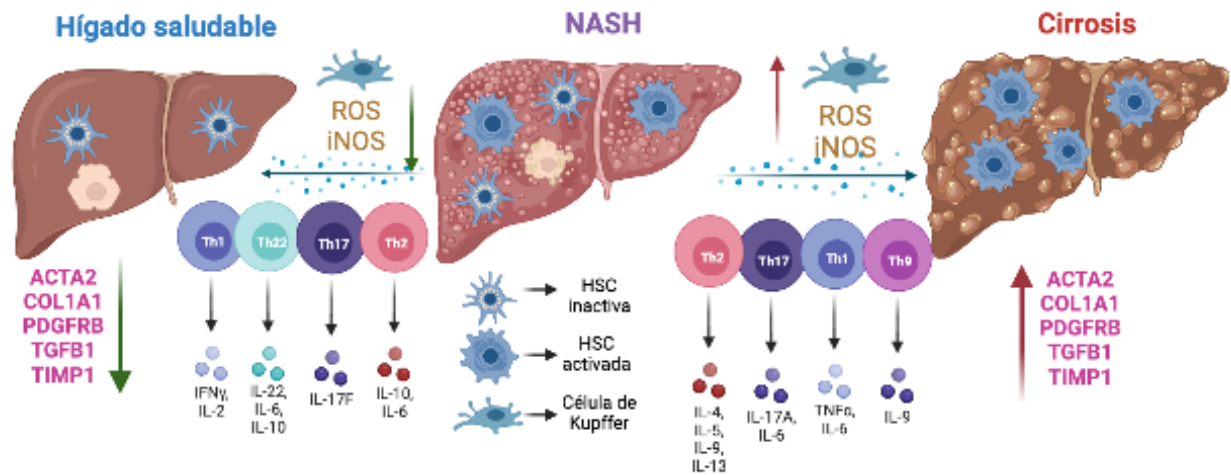
#### 1.1.6 Trasplante de hígado

Hasta la fecha, el trasplante hepático es el tratamiento más eficiente para las etapas avanzadas de enfermedades hepáticas con fibrosis, ya que tiene una alta incidencia de éxito con una tasa de supervivencia entre el 85% y el 75%, a cinco años tras el trasplante (UNOS, 2015). Sin embargo, el número de donadores es muy bajo con respecto a la cantidad de personas que mueren cada año en espera por un trasplante de hígado. En México, durante 2019, hubo 317 receptores en espera de un hígado, mientras que en ese mismo año se registraron 40,578 defunciones por enfermedades de hígado (CENATRA, 2020; INEGI, 2020). Existen otros problemas relacionados al trasplante de hígado como altos costos del procedimiento, tratamiento post-operatorio con medicamentos de inmunosupresión, riesgo de rechazo del implante y el posible paso de infecciones (Agarwal et al., 2019). Por dichas razones, se buscan tratamientos alternativos para controlar el progreso de enfermedades crónicas como la NASH y habilitar la regeneración de tejido hepático funcional, ya que la mayoría de los tratamientos alternativos para la NASH y la fibrosis hepática se enfocan en disminuir los síntomas de la inflamación pero no en acabar con la causa de raíz, las HSCs transdiferenciadas.

#### 1.1.7 AgNPs-ALA y CD-LF como tratamiento terapéutico contra la NASH

Debido a las estadísticas para el trasplante de hígado y la falta de tratamientos terapéuticos enfocados en acabar con la perpetuación de la fibrosis y habilitar la regeneración del hígado (Figura 3), las AgNPs conjugadas con ALA (AgNPs-ALA) y los puntos cuánticos de carbono conjugados con lactoferrina (CD-LF) jugarían un papel importante para desactivar a las HSCs. Los efectos de la combinación AgNPs-ALA han reportado resultados con posibles aplicaciones en la radioterapia de cáncer y como potenciador de la actividad anti-tumoral por radiación gamma debido a sus propiedades anti-inflamatorias y la neutralización de radicales libres de oxígeno (Ramachandran y Nair, 2011), por lo tanto, su uso en el

tratamiento de enfermedades hepáticas representa una oportunidad de investigación. Mientras que el uso combinado de CD-LF no se ha reportado hasta la fecha. Sin embargo, con reportes previos de la capacidad de conjugar los puntos cuánticos de carbono con agentes dirigidos a células hepáticas (Kim et al., 2010) y cargadas con fármacos para el tratamiento de cáncer (Wang et al., 2020), muestran potencial para el tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas como la NASH.



**Figura 3. Factores determinantes en el progreso de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH).** Imagen creada con Biorender.

## 1.2 Justificación

Las defunciones por enfermedades crónicas de hígado y complicaciones por cirrosis sumaron, en 2015, una cifra de un millón a nivel mundial. Las enfermedades crónicas del hígado contribuyen al desarrollo de fibrosis hepática, para lo cual el tratamiento más eficiente es el trasplante de hígado. Sin embargo, la cantidad de donadores es muy baja en comparación con el número de personas enfermas candidatos a recibir un trasplante. En México, en el 2019, hubo 317 receptores en espera de un trasplante de hígado, mientras que se registraron más de 40,578 defunciones por enfermedades hepáticas. Por lo cual, es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos. Alternativas experimentales emergentes tienen como objetivo inhibir la transdiferenciación de las HSCs, los principales causantes de la fibrogénesis en el hígado. Por lo tanto, se propone inhibir la activación de las HSCs al intervenir en sus vías de señalización profibróticas mediante un agente terapéutico que reduzca las ROS, los segundos mensajeros en la vía de señalización de PDGF, TGF- $\beta$ 1 y TIMP-1. Hasta la fecha, en el mercado no existen tratamientos enfocados en tratar enfermedades crónicas del hígado como la NASH o reducir la fibrosis. Las opciones disponibles

no tratan de raíz la causa de las múltiples enfermedades hepáticas, es decir, la transdiferenciación de las HSCs.

El propósito del proyecto es evaluar la capacidad de las NPs para modular la expresión de genes profibróticos y la liberación de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, lo cual ayudaría a restablecer el estado de resolución en el hígado. Para esto, se evaluaron los efectos de las nanopartículas (NPs) AgNPs-ALA, CD y CD-LF en células estrelladas hepáticas humanas de donadores con esteatohepatitis no alcohólica (HHSC-N).

### 1.3 Hipótesis

Las nanopartículas conjugadas con agentes antioxidantes modulan tanto la fibrosis, mediante alteraciones en la expresión de genes profibróticos en células hepáticas estrelladas humanas de donadores con NASH, como la producción de citocinas relacionadas con la fisiología de linfocitos T.

### 1.4 Objetivos

#### 1.4.1 Objetivo general

Determinar el efecto, *in vitro*, de nanopartículas recubiertas con agentes antioxidantes en células hepáticas estrelladas humanas de un donador con NASH (HHSC-N), co-cultivadas con leucocitos.

#### 1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de las nanopartículas en la actividad de TGF- $\beta$ .
- Determinar el efecto de HHSC-N tratadas con nanopartículas y co-cultivadas con PBMCs en la secreción de citocinas relacionadas a linfocitos T.
- Determinar los niveles de expresión de los genes profibróticos ACTA2, COL1A1, PDGFRB, TGFB1 y TIMP1 en HHSC-N, con y sin co-cultivo con PBMCs, tratadas con nanopartículas.

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Materiales

Las nanopartículas y concentraciones que evaluamos en este proyecto se encuentran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Nanopartículas y concentraciones evaluadas**

Nombre	Solvente de suspensión	Tamaño (nm)	Referencia	Abreviatura	Concentraciones (µg/mL)
Nanopartículas de plata recubiertas con ácido alfa lipoico	Agua (H <sub>2</sub> O)	60 (considerando el recubrimiento)	Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EUA, número de producto: 807370	<b>AgNPs-ALA</b>	6.25 12.5 17.5 25 37.5 175
Puntos cuánticos de carbono	Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)	1.11	(Guzmán-Uribe et al., 2022)	<b>CD</b>	5 50
Puntos cuánticos de carbono conjugados con lactoferrina		11.7		<b>CD-LF</b>	100 200 400 500
Nanopartículas de disulfuro de molibdeno recubiertas con ácido alfa lipoico (A)	100% etanol	15	Sintetizadas por la Dra. Mariela Flores Castañeda Dep. Óptica, CICESE	<b>MoS<sub>2</sub> a-ALA</b>	15.6 39 78 156 390 780
Nanopartículas de disulfuro de molibdeno recubiertas con ácido alfa lipoico (B)	80% etanol 20% glicerol	24	(Moniri and Hantehzadeh, 2021)	<b>MoS<sub>2</sub> b-ALA</b>	1.8 4.5 9 18 45 90

Ambas soluciones de nanopartículas de disulfuro de molibdeno con ácido alfa lipoico (MoS<sub>2</sub>-ALA) fueron donadas por el grupo de trabajo del Dr. Santiago Camacho López del Departamento de Óptica del CICESE. La síntesis de las MoS<sub>2</sub>-ALA se realizó el día 13 de Julio del 2021. Al momento de recibirlas, faltaba su caracterización para conocer su concentración. Por esta razón, en los ensayos utilizamos una muestra directa de la solución madre sin diluir y subsecuentemente en factores de dilución (FD) 2, 5, 10, 20 y 50 del grupo de nanopartículas MoS<sub>2</sub>-ALA. Dichas nanopartículas se diluyen con su respectivo solvente.



Sin embargo, después de la fase experimental recibimos los cálculos de concentraciones por parte de la Dra. Mariela Flores Castañeda, quien sintetizó las MoS<sub>2</sub>-ALA. Cabe destacar que las MoS<sub>2</sub> a-ALA están suspendidas en etanol, por lo que necesitan de un emulsificante para suspenderlas en un medio de cultivo celular acuoso. El Kolliphor-EL se utiliza para solubilizar sustancias insolubles en agua y se ha utilizado como vehículo para la entrega de fármacos en células. Con base en experimentos previos (Zertuche-Arias et al., 2021) se eligió la tasa de Kolliphor: 0.125:1, la cual se reportó ser menos citotóxica en sus experimentos, para los ensayos de viabilidad celular.

Los puntos cuánticos de carbono (CD) o recubiertos con Lactoferrina (CD-LF) en solución amortiguadora de fosfato (PBS) fueron donados por el M. en C. Carlos Guzmán del Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CNyN) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y la funcionalización con lactoferrina fue llevada a cabo por el ing. Marco Antonio Urióstegui Campos en el CNyN (Guzmán-Uribe et al., 2022).

Las nanopartículas de plata y disulfuro de molibdeno tienden a precipitarse y aglomerarse, por lo que se sometieron a sonicación por 30 minutos antes de tomar una muestra, con el propósito de garantizar la homogeneidad. De igual manera, las soluciones con puntos cuánticos de carbono se agitaron con vortex por 10 segundos previo a cualquier ensayo. Cada una de las diluciones se preparó en el respectivo solvente o medio de cultivo, según corresponda el experimento.

## **2.2 Ensayos colorimétricos para la selección de nanopartículas y concentraciones con mayor potencial de actividad hepatoprotectora**

### **2.2.1 Evaluación de la capacidad antioxidante de nanopartículas**

#### **2.2.1.1 ABTS**

Se hizo reaccionar la solución base 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (Roche, Basilea, Suiza. Producto: 11684302001) con persulfato de potasio (KPS) 0.87mM a una relación 1:1 (ABTS:KPS) (Re et al., 1999). Se dejó reposar la solución con el radical ABTS<sup>•+</sup> a temperatura ambiente en oscuridad por 18 h antes de ser utilizada. Se leyó la absorbancia del ABTS<sup>•+</sup> en placas de 96 pozos con

ayuda del espectrofotómetro de placas EPOCH (BioTek, Winooski, Vermont, Estados Unidos) a una longitud de onda de 734 nm y se ajustó la solución ABTS<sup>•+</sup> concentrada a una lectura de absorbancia de 0.7, un punto de partida que nos permite obtener lecturas confiables a 734 nm, con el respectivo solvente de cada nanopartícula. El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos en triplicados. A cada uno de los pozos vacíos se le agregaron 50 µL de muestra con nanopartículas con 150 µL de la solución ABTS<sup>•+</sup> ajustada. El control consta de 50 µL de solvente y 150 µL de solución ABTS<sup>•+</sup> ajustada. Se añadieron blancos que constaban de 50 µL de muestra y 150 µL de solvente para evitar el posible efecto del color introducido por las nanopartículas. Una vez preparados los pozos, se incubó la placa por 6 min en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se midió la densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 734 nm en el espectrofotómetro de placas EPOCH. Se obtuvo el porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación (1):

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{D.O._{\text{control}} - (D.O._{\text{muestra}} - D.O._{\text{blanco}})}{D.O._{\text{control}}} \times 100\% \quad (1)$$

donde: D.O.<sub>control</sub>, D.O.<sub>muestra</sub>, y D.O.<sub>blanco</sub> son las lecturas del control, muestra y blanco, respectivamente, a los 6 min a la longitud de onda especificada. La diferencia entre D.O.<sub>muestra</sub> y D.O.<sub>blanco</sub> proporcionan la lectura de la respectiva muestra de nanopartículas a la cual se le ha removido el valor de la coloración introducido por las nanopartículas. De manera que el valor obtenido es restado del valor de D.O.<sub>control</sub> para obtener una lectura final para convertir en porcentaje de inhibición.

#### 2.2.1.2 DPPH

Se preparó una solución 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) 60 mM con etanol absoluto (Huang et al., 2005). El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos en triplicados. Para cada uno de los pozos se agregaron 50 µL de muestra con 150 µL de la solución DPPH<sup>•</sup>. El control consta de 50 µL de solvente y 150 µL de solución DPPH<sup>•</sup>. Se añadieron blancos que constaban de 50 µL de muestra y 150 µL de solvente para evitar el posible ruido introducido por la coloración de las nanopartículas. Una vez preparados los pozos, se incubó la placa por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 517 nm en el espectrofotómetro de placas EPOCH. Nuevamente se utilizó la Ec. (1) para calcular el porcentaje de inhibición.

### 2.2.2 Capacidad de remoción de óxido nítrico (NO\*)

Se depositaron 33.6 µL de las muestras junto con 66.4 nitroprusiato de sodio (SNP) en una placa de 96 pozos. El control consta de 33.6 µL del respectivo solvente de las muestras. Los blancos constan de 33.6 µL de la muestra y 66.4 µL de H<sub>2</sub>O. Después se incubó la placa en luz por 60 min para permitir la liberación de NO\* en la muestra. Se posicionó la placa lo más cercano a una fuente de luz y se rotó 90° cada 15 min para asegurarse que la luz incidiera en todos los pozos, debido a que la fuente de luz no era directa. Una vez terminado el tiempo de incubación en luz, se añadieron 100 µL del reactivo de Griess 1X y se incubó por 15 min en la oscuridad a una temperatura de 22 °C. Se leyó la absorbancia a 540 nm después de 15 min en el espectrofotómetro de placas EPOCH. El porcentaje de remoción de óxido nítrico se determinó utilizando la ec. (2).

$$\text{Remoción de NO}^* (\%) = \frac{D.O.\text{control} - (D.O.\text{muestra} - D.O.\text{blanco})}{D.O.\text{control}} \times 100\% \quad (2)$$

donde: D.O.<sub>control</sub>, D.O.<sub>muestra</sub>, y D.O.<sub>blanco</sub> son las lecturas del control, muestra y blanco, respectivamente, a los 6 min a la longitud de onda especificada. La diferencia entre D.O.<sub>muestra</sub> y D.O.<sub>blanco</sub> proporcionan la lectura de la respectiva muestra de nanopartículas a la cual se le ha removido el valor de la coloración introducido por las nanopartículas. De manera que el valor obtenido es restado del valor de D.O.<sub>control</sub> para obtener una lectura final para convertir en porcentaje de inhibición.

### 2.2.3 Pruebas de viabilidad celular de MNPs-ALA, CD y CD-LF en fibroblastos de ratón L929

Se realizó el ensayo de viabilidad celular *in vitro* mediante el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, mejor conocido como MTT, con la línea celular L929 (ATCC, Manassas, Virginia, USA), la cual corresponde a fibroblastos de ratón. El ensayo MTT es utilizado para medir la actividad metabólica como un indicador de viabilidad, proliferación y citotoxicidad. El ensayo colorimétrico está basado en la reducción de la sal amarilla MTT a cristales púrpuras de formazan por medio de las enzimas oxidorreductasas mitocondriales succinato deshidrogenasa (NAD(P)H) en células metabólicamente activas. Los cristales de formazan son insolubles en agua, por lo que requieren de una solución solubilizadora para obtener una solución de color púrpura, que es cuantificada al medir la absorbancia

entre 500 a 600 nm utilizando un lector de placas multi-pozos. La cantidad de células es proporcional a la cantidad de formazan producido. Entre más oscura sea la solución, mayor el número de células viables y metabólicamente activas (Denizot and Lang, 1986; Mosmann, 1983). Ya que reportamos los resultados en porcentajes, necesitamos establecer un número como el umbral para considerar a un compuesto citotóxico. De acuerdo a lo establecido por la Organización Internacional de Normalización (ISO) en la ISO-10993-5 “Evaluación biológica de dispositivos médicos. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro*” (ISO, 2009) se consideran porcentajes <70% como citotóxicos.

Se sembraron 7,500 células por pozo en placas de 96 pozos en un volumen de 100 µL de medio completo conformado por Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina (Pen-Strep) y se dejaron adherir en la incubadora por 24 h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido este tiempo se removió el medio y se agregó la muestra a evaluar. Se añadieron 100 µL de la concentración de muestra de nanopartículas correspondiente a evaluar diluida en medio completo. Se incubó por 24 h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> para que el tratamiento hiciera su efecto. Después se añadieron 10 µL de solución MTT a una concentración de 5mg/mL. Se incubó a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> por tres horas para formar los cristales de formazan en presencia de células metabólicamente activas. Finalmente se añadieron 100 µL de ácido clorhídrico (HCl) 0.01M con dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% como solución solubilizadora y se incubó entre 18 a 24 h para posteriormente leer la densidad óptica a 570 nm en el espectrofotómetro de placas EPOCH.

El porcentaje de viabilidad celular se calculó mediante la siguiente ecuación (3):

$$Viabilidad (\%) = \frac{D.O_{muestra} - D.O_{blanco}}{D.O_{control}} \times 100\% \quad (3)$$

donde: D.O.<sub>muestra</sub>, y D.O.<sub>blanco</sub> son los valores de la muestra y blanco, respectivamente, a las 24 h. D.O.<sub>control</sub> corresponde al control que no se le aplicaron tratamientos. La diferencia entre D.O.<sub>muestra</sub> y D.O.<sub>blanco</sub> proporcionan la lectura de la respectiva muestra de nanopartículas a la cual se le ha removido el valor de la coloración de las nanopartículas.

#### 2.2.4 Ensayo indicador de SEAP en HEK-Blue TGF- $\beta$

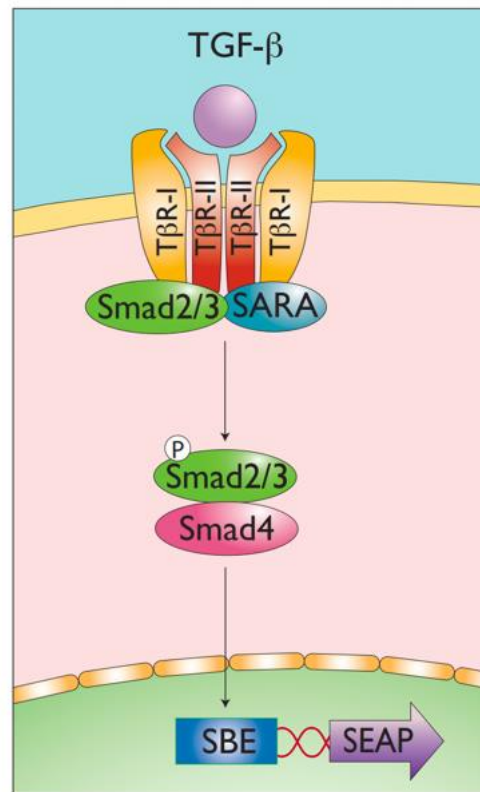
Se utilizó la línea celular HEK-Blue TGF- $\beta$  (InvivoGen, San Diego, California, USA) para evaluar *in vitro* la activación en la vía de señalización de TGF- $\beta$  mediante la secreción de SEAP (Figura 4). Las células se mantuvieron en medio completo, conformado por DMEM suplementado con 10% FBS, 1% Pen-Strep y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Normocina por los primeros dos pases. Después de dos pases se añadieron 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Blastidina, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Higromicina B Gold y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Zeocina™ como antibióticos de selección al medio completo.

Para el ensayo indicador de SEAP se siguieron las indicaciones del proveedor con algunas modificaciones. Se sembraron 45,000 células en 160  $\mu\text{L}$  de medio DMEM completo sin antibióticos de selección a una placa de 96 pozos, seguido de 20  $\mu\text{L}$  de TGF- $\beta$  a 10  $\text{ng}/\text{mL}$  para estimular a las células y 20  $\mu\text{L}$  del tratamiento a diferentes concentraciones. Se utilizaron dos controles de actividad celular: un control de células tratadas con TGF- $\beta$  a 10  $\text{ng}/\text{mL}$  y otro con células sembradas solo con DMEM, omitiendo el TGF- $\beta$ . También se añadieron blancos que contenían medio y las correspondientes muestras de nanopartículas, sin presencia de células. La placa se incubó por 18 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5%. Posteriormente se transfirieron 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada pozo a una nueva placa con 180  $\mu\text{L}$  de solución QUANTI-Blue por pozo y se incubó por 1 hora a 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  antes de leer la densidad óptica a 655 nm en el espectrofotómetro de placas EPOCH.

La actividad relacionada a TGF- $\beta$  se estimó utilizando la siguiente ecuación (4):

$$D.O._{TGF-\beta} = D.O._{muestra} - D.O._{blanco} \quad (4)$$

donde  $D.O._{TGF-\beta}$  corresponde a la lectura de la muestra ( $D.O._{muestra}$ ) menos la lectura del color que pudieran aportar las nanopartículas ( $D.O._{blanco}$ ). Dichos valores se compararon con respecto a la lectura del control. A la par con estos experimentos, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular mediante MTT con la misma cantidad de células, volúmenes y reactivos para evaluar la citotoxicidad de las muestras en células HEK-Blue TGF- $\beta$  y comprobar que los cambios en las lecturas de absorbancia no se deben a una reducción en la cantidad total de células.



**Figura 4. Vía de señalización de TGF-β en células HEK-Blue TGF-β.** La estimulación con TGF-β lleva a la formación del complejo Smad3/4 que culmina en la secreción de la fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP). Imagen tomada de manual de usuario de HEK-Blue™ TGF-β Cells, Version 19I04-MM, Invivogen.

### 2.3 Cultivo de células estrelladas hepáticas humanas de donadores esteatohepatitis no alcohólica (HHSC-N)

Se obtuvieron HHSC de un donador masculino de 41 años de edad con NASH (HHSC-N) (iXCells Biotechnologies, San Diego, USA). El criovial se encontraba en pase 3 al momento de realizar la compra. El cultivo primario se mantuvo de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Se utilizó medio basal de cultivo para células estrelladas hepáticas suplementado con 10% de FBS, 1% de Pen-Strep y 1 mL de suplemento de crecimiento para HHSC propietario de iXCells Biotechnologies. Las células se utilizaron en los pases 4-6 para todos los experimentos, sin exceder el límite de pases denotados en la hoja de datos del proveedor, en donde se menciona que se pueden trabajar hasta 3 pases más con resultados confiables. Posteriormente las células fueron adaptadas a crecer en Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), con el propósito de co-cultivarlas junto con células mononucleares de sangre periférica (PMBCs) utilizando el mismo medio.

## **2.4 Pruebas de viabilidad celular de MNPs-ALA, CD y CD-LF en HHSC-N y HepG2**

Se realizó el ensayo MTT con el cultivo primario de HHSC-N y con la línea celular de hepatocitos HepG2, la cual fue donada por el Dr. Pierrick Fournier en el Departamento de Innovación Biomédica del CICESE. En dos placas de 96 pozos se sembraron 4,000 células HHSC-N por pozo y 15,000 células HepG2 por pozo en un volumen de 100  $\mu$ L de IMDM completo y Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) completo y suplementado con 2mM de L-glutamina, respectivamente, y se dejaron adherir en la incubadora por 24 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido este tiempo se removió el medio y se añadieron 100  $\mu$ L de medio fresco con la concentración de muestra de nanopartículas correspondiente a evaluar. Se incubaron las células con el tratamiento por 24, 48 o 72 horas, en tres placas diferentes, a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> para que el tratamiento hiciera su efecto. Para las células HepG2 solo se realizó un ensayo a 24 h. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente de cada placa, se añadieron 10  $\mu$ L de solución MTT a una concentración de 5mg/mL. Se incubaron a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por tres horas para formar los cristales de formazan en presencia de células metabólicamente activas. Finalmente se añadieron 100  $\mu$ L de HCl 0.01M con SDS al 10% como solución solubilizadora y se incubó por 18 h para posteriormente leer la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro de placas EPOCH. La absorbancia relacionada a la viabilidad celular se calculó nuevamente mediante la ecuación (3).

## **2.5 Muestras de sangre periférica**

Las muestras de sangre periférica fueron donadas por el banco de sangre del Hospital General de Ensenada, Baja California, quienes recolectaron las muestras de donadores mediante el método de venopunción según la declaración de Helsinki y las leyes mexicanas, bajo consentimiento informado, con los siguientes criterios de inclusión: individuos de sexo masculino sanos de entre 18-40 años de edad. Proceso especificado en la Norma Oficial Mexicana (NOM)-253-SSA1-2012 para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.

## **2.6 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron aisladas utilizando un gradiente de densidad con Lymphopure™ de acuerdo con las instrucciones del proveedor (BioLegend, San Diego,

California, EUA). Después de aislar las PBMCs se mantuvieron en medio IMDM completo. La sangre periférica correspondía a donadores masculinos de 26 y 29 años de edad. Las muestras de sangre recolectadas para este experimento están concentradas, por lo que se utilizó una dilución 1:4 (sangre:PBS).

## **2.7 Co-cultivo de HHSC-N y PBMCs para posteriores tratamientos con nanopartículas**

Para este ensayo se utilizaron ambos cultivos primarios de HHSC-N y PBMCs. Los grupos para evaluar se dividieron en tres partes: la primera parte son los niveles de referencia de expresión génica, en donde se obtuvieron los resultados sin tratamientos de NPs tanto en los co-cultivos como en grupos individuales de células, así como en presencia o ausencia de los activadores para PBMCs. El segundo consta de los niveles de expresión de genes en la monocapa de HHSC-N tratadas con las NPs por 24 h. La última parte consta de los co-cultivos de HHSC-N y PBMCs tratadas con las NPs por 24 h y por 72 h.

Se sembraron 300,000 HHSC-N en placas de 6 pozos en un volumen de 2 mL. Se dejaron incubar por 24 h para permitir adhesión celular.

Al día siguiente se aislaron las PBMCs de sangre periféricas. Se cuentan las PBMCs y se siembran 3,600,000 células junto con las 300,000 HHSC-N en las placas de 6 pozos correspondientes, de manera que queden a una proporción de cultivo de 12 PBMCs : 1 HHSC-N. Dicha proporción fue modificada con base en la literatura (Beringer and Miossec, 2019; Michalski et al., 2007).

Las PBMCs están compuestas principalmente por linfocitos y monocitos, los cuales son capaces de secretar citocinas al medio de cultivo en el cual se encuentran, pero tienen que entrar en contacto con un estimulador. Por lo tanto, se utilizó la combinación de 25 ng/mL de 4-alfa-forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y 1 µg/mL de ionomicina para estimular las PBMCs (Ai et al., 2013). Junto con las PBMCs y la estimulación, también se agregaron los tratamientos con nanopartículas.

Se incubaron respectivamente por 24 h y 72 h para cada grupo antes de iniciar con la extracción de muestras. La extracción consistió en recolectar 1 mL de sobrenadante de cada pozo con células, el cual se analizó por medio de citometría de flujo. Después de esto se tripsinizaron y colectaron las células de cada pozo. Se realizaron lavados con PBS y centrifugaciones para obtener el precipitado celular, el cual se llevó



a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento y posterior extracción de ARN. La relación de muestras con su respectivo experimento y tratamiento se muestra el Anexo A.

## 2.8 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se utilizó el kit ISOLATE II RNA Mini Kit (Meridian Biosciences, Cincinnati, Ohio, EUA) para la extracción de ARN y se siguieron las instrucciones del proveedor. Las muestras biológicas son lisadas y homogeneizadas en la presencia de tiocianato de guanidina, una sal caotrópica que inmediatamente desactiva las ARNasas endógenas para asegurar la purificación del ARN intacto. Después de la homogeneización se añadió etanol a la muestra. Las muestras después se procesaron a través de una columna que contiene una membrana de sílice a la cual el ARN se une. La contaminación de ADN genómico es removida por una digestión mediante la adición de ADNasa I durante la preparación en la columna. Cualquier otra impureza tales como sales, metabolitos, y componentes celulares son removidos mediante pasos de lavado simples con dos diferentes soluciones amortiguadoras. Finalmente, el ARN total purificado de alta calidad obtenido es eluido en agua libre de nucleasas. Dicho ARN de cada muestra fue analizado por medio del espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para evaluar la calidad y cantidad de la extracción de ARN. Una vez obtenidos dichos resultados se sintetizó ADNc por medio del kit SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para cada tubo se añaden los siguientes componentes encontrados en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Volúmenes por tubo para sintetizar una muestra de ADNc con el kit de síntesis ADNc SuperScript VILO™

Componente	Cantidad
<b>Mezcla de reacción VILO™ 5X</b> Contiene cebadores aleatorios, dNTPs y $\text{MgCl}_2$	4 $\mu\text{L}$
<b>Mezcla de enzimas SuperScript™ 10X</b> Contiene retrotranscriptasa, inhibidores de ribonucleasas recombinantes y una proteína colaboradora	2 $\mu\text{L}$
<b>OligoDT</b> Cebador que se hibrida con la cola poli(A) de ARNm para garantizar la síntesis de ARNm maduros a cDNA. Se agregan 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
<b>ARNm</b> (correspondiente a 1 $\mu\text{g}$ )	(Entre 7-15 $\mu\text{L}$ , dependiendo de la cantidad de ARNm extraído por tubo)
<b>Agua tratada DEPC</b>	Lo necesario para llegar a un $V_f$ de 20 $\mu\text{L}$

Después se mezclaron los contenidos de los tubos y se introducen al termociclador de punto final (BioRad, Hercules, California, EUA). Primero se incubaron a 25 °C por 10 minutos, después se incubaron los tubos a 42°C por 60 minutos. Como parte final se terminó la reacción a 85 °C por 5 minutos.

Se analizaron los ADNc sintetizados nuevamente mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 para evaluar su calidad y cantidad. Como paso necesario en la estandarización de las reacciones en qPCR, se ajustaron las concentraciones de los ADNc a 100 ng/mL.

## 2.9 Reacciones de PCR en Tiempo Real (qPCR) de muestras tratadas

Para las reacciones de qPCR se analizaron los siguientes genes profibróticos encontrados en la Tabla 3.

**Tabla 3. Genes profibróticos evaluados en HHSC-N**

Gen	Asociación con fibrogénesis	Referencia
ACTA2	Expresa actina de músculo liso alfa ( $\alpha$ -SMA), marcador con expresión elevada en las HSC cuando son transdiferenciadas a células tipo miofibroblastos (activadas).	(Higashi et al., 2017)
COL1A1	Proteína de matriz extracelular (ECM) expresada para reparar daño hepático durante enfermedades agudas, o crónicas como NASH. Expresión excesiva y acumulación llevan a fibrosis.	(Higashi et al., 2017)
PDGFRB	Receptor beta de factor de crecimiento derivado de plaquetas. PDGF es una citocina encontrada en pacientes con daño hepático que favorece la expresión del gen TGFB1.	(Cordero-Espinoza y Huch, 2018)
TGFB1	Citocina principalmente involucrada en la respuesta inmunológica para perpetuar el estado de inflamación, ya que promueve la expresión de colágeno y la activación de las HSCs.	(Dewidar et al., 2019; Tsuchida and Friedman, 2017)
TIMP1	Es un inhibidor tisular de metaloproteinasas, el cual está expresado durante enfermedades crónicas o en un estado de fibrosis. Su función principal es inhibir la degradación de proteínas de ECM por parte de metaloproteinasas.	(Higashi et al., 2017)
HPRT1	Gen asociado al metabolismo de las purinas. Funciona como el gen de referencia, ya que el número de ciclo en el cual es expresado en HHSCs no varía o varía levemente con respecto a una patología o tratamiento	(Zárybnický et al., 2019)

Los oligonucleótidos sentido (F) y antisentido (R) fueron tomados de la literatura (ACTA2, COL1A1, PDGFRB, TIMP1, HPRT1) o diseñados (TGFB1). Las secuencias se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para qPCR en HHSC-N

Gen	Num. Acceso / Gene ID	Secuencias	Referencia
ACTA2	NM_001100.4	F: CTGTTCCAGCCATCCTTCAT R: TCATGATGCTGTTGTAGGTGGT	(Ploeger et al., 2013)
COL1A1	NM_000088.4	F: GCCTCAAGGTATTGCTGGAC R: ACCTTGTTTGCCAGGTTCAC	(Ploeger et al., 2013)
PDGFRB	Gene ID: 5159	F: GCCCTTATGTCGGAGCTGAAGA R: GTTGCGGTGCAGGTAGTCCA	(D. Zheng et al., 2020)
TGFB1	NM_000660.7	F: CACTCCCTCTCTCCCTCT R: AGTGCCCAAGGTGCTCAATA	Diseñados para experimento
TIMP1	Gene ID: 7076	F: TGTTGTTGCTGTGGCTGATAGC R: TCTGGTGCCCCACGAAGCTT	(D. Zheng et al., 2020)
HPRT1	NM_000194.2	F: TGGTCAGGCAGTATAATCCAAAGA R: TTCAAATCCAACAAAGTCTGGCT	(Zárybnický et al., 2019)

Para las reacciones de qPCR se utilizó el intercalante de ADN SYBR Green del kit GoTaq qPCR Master Mix SYBR Green (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), como reportero fluorescente en la reacción de qPCR. Previo a la amplificación mediante la qPCR de las muestras se realizaron las curvas estándar de cada uno de los genes con los pares de oligonucleótidos encontrados en la Tabla 4 con el propósito de obtener las eficiencias de amplificación y graficar los resultados mediante un método  $\Delta\Delta C_t$  mejorado que incorpora las eficiencias (Alvarez-Lee et al., 2020).

Se ajustó el ADNc de todas las 40 muestras a evaluar por qPCR a 100 ng/mL para normalizar las reacciones. El volumen final de reacción fue de 12.5  $\mu$ L. La mezcla de reacción, y cada triplicado se encuentran reportados en la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes para reacción qPCR de muestras con HHSC-N

Componente	Volumen por reacción	Volumen por triplicado
Master Mix SYBR Green	7.25 $\mu$ L	21.75 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	3.95 $\mu$ L	11.85 $\mu$ L
Mezcla equitativa de oligonucleótidos sentido y antisentido (concentración final de 0.4 $\mu$ M)	0.3 $\mu$ L	0.9 $\mu$ L
ADNc (concentración final de 0.1 ng/ $\mu$ L. Controles negativos "NTC" no llevan ADNc)	1 $\mu$ L	3 $\mu$ L
Volumen final	12.5 $\mu$ L	37.5 $\mu$ L

Se realizaron reacciones por triplicado en placas de reacción óptica MicroAmp™ de 96 pozos con la película adhesiva óptica MicroAmp™ y se corren placas en el Sistema de PCR en Tiempo Real 7500 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). El ciclo termal de la qPCR constó de una desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, después un ciclo de 95°C por 10 segundos y 62°C por 30 segundos durante 40 ciclos (45 ciclos en el caso de TGFB1, al ser un gen de expresión tardía). En el caso de HPRT1, el ciclo termal de la qPCR constó de una desnaturalización inicial de 95°C por 10 segundos, después un ciclo de 95°C por 10 segundos y 65°C por 30 segundos durante 40 ciclos. Las curvas de desnaturalización fueron monitoreadas sistemáticamente (temperatura de gradiente de 0.5°C cada 10 segundos desde 55 a 94°C) al final del último ciclo de amplificación para confirmar la especificidad de reacción de amplificación.

## **2.10 Detección de citocinas sobrenadantes en cultivos de HHSC-N y PBMCs por citometría de flujo**

La citometría de flujo es una técnica cuyo principio de funcionamiento es el esparcimiento de luz y la emisión de fluorescencia por células marcadas con sondas o anticuerpos fluorescentes específicos al pasar por un punto en donde incide un haz láser. Tiene diversas ventajas, como un análisis multiparamétrico de una sola célula. La citometría de flujo también permite separar las células en subpoblaciones, entre muchas otras aplicaciones (Manohar et al., 2021). Sin embargo, su análisis no se limita solamente a células. También es posible marcar otros componentes para su posterior evaluación por citometría de flujo, en este caso las citocinas. Las citocinas pueden detectarse experimentalmente mediante tinciones intracelulares o captándolas en el sobrenadante de cultivo celular. El medio de cultivo de todos los cocultivos HHSC-N y PBMCs, junto con las monocapas de HHSC-N, fueron evaluados mediante el kit de detección de citocinas Multi-Analyte Flow Assay Kit HU Th Cytokine Panel (12-plex) w/ FP V02 LEGENDplex®, con el cual es posible detectar y cuantificar la presencia de 12 citocinas de manera simultánea con una sola muestra de medio de cultivo. Esta técnica es un inmunoensayo basado en microperlas que utilizan los mismos principios básicos de los ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich, en los que un analito soluble es capturado entre dos anticuerpos. Hay dos grupos de perlas con tamaños diferentes y poseen un fluorocromo discriminador (APC) que emite una longitud de onda específica asignada para cada una de las 12 citocinas. Una combinación específica del tamaño de la perla y un nivel de fluorescencia para citocinas permite identificar la perla asociada a cada una de las 12 citocinas. Cada juego de perlas está conjugado con un anticuerpo específico, denominado anticuerpo de captura para el analito del cual se desea saber su concentración mediante la intensidad media de

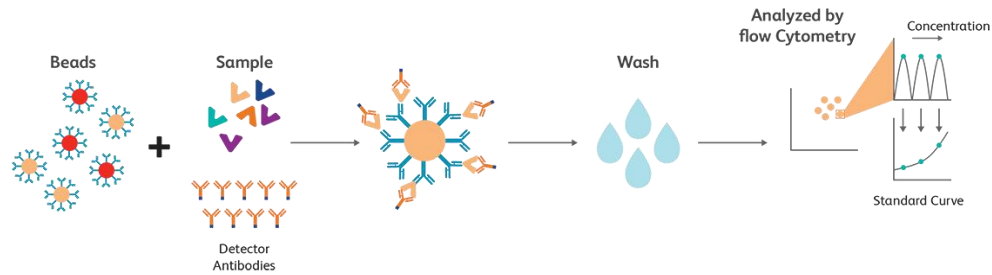
fluorescencia (IMF) del fluoroforo de detección (PE). La metodología consistió en mezclar e incubar la muestra con las perlas cargadas con los anticuerpos de captura, después se lavó y agregaron los anticuerpos de detección biotinilados para que cada anticuerpo de detección se uniera a su analito específico, unido a las perlas de captura. Es así como forma un complejo perla de captura-analito-anticuerpo de detección. Posteriormente se añadió la estreptavidina-ficoeritina (SA-PE), que se une a los anticuerpos de detección biotinilados, proporcionando una señal fluorescente con intensidades proporcionales a la cantidad de analito unido (Figura 5). Esta combinación permite que al pasar las muestras por el citómetro de flujo se pueda obtener una lectura simultánea de todas las citocinas presentes ya que la longitud de onda de emisión y tamaño de las perlas permiten discriminar una citocina de otra al momento de pasar la muestra por el punto de interrogación del citómetro de flujo y detectar la emisión de la longitud de onda y tamaño de la perla en los receptores.

Detectamos y cuantificamos las citocinas presentes en el sobrenadante de cultivo celular de los cultivos en monocapa de HHSC-N, los co-cultivos a las 24 h y a las 72 h mediante el panel de perlas de detección Multi-Analyte Flow Assay Kit HU Th Cytokine Panel (12-plex) w/ FP V02 LEGENDplex® (BioLegend, San Diego, California, EUA). En la Tabla 7 se describen los diferentes linfocitos colaboradores (Th) con base a la producción de citocinas detectadas.

**Tabla 6.** Citocinas evaluadas asociadas a poblaciones de linfocitos Th que las producen. Tomado del manual de Multi-Analyte Flow Assay Kit HU Th Cytokine Panel (12-plex) V02

Linfocitos Relacionados Citocina Blanco	Th	Th1	Th2	Th17	Th1/Th2	Th9	Th22
	IL-5	✓		✓		✓	
IL-13	✓		✓		✓		
IL-2	✓	✓			✓		
IL-6	✓	✓	✓	✓	✓		✓
IL-9	✓					✓	
IL-10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
IFN- $\gamma$	✓	✓		✓	✓		
TNF- $\alpha$	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
IL-17A	✓			✓			
IL-17F	✓			✓			
IL-4	✓		✓		✓		
IL-22	✓			✓			✓

La lectura de muestras se llevó a cabo en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune® (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Se registraron 4,000 eventos por muestra, de los cuales se tomaron en cuenta los eventos registrados en un umbral de detección ajustado para las perlas, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Pevio a leer las muestras se realizó una curva estándar con la cual se determinó la concentración de un analito particular. Los cálculos se realizaron mediante el programa de análisis de datos propietario de LEGENDplex™ (LEGENDplex, 2022).



**Figura 5. Diagrama del ensayo para detección de citocinas solubles.** Tomado de BD Biosciences.

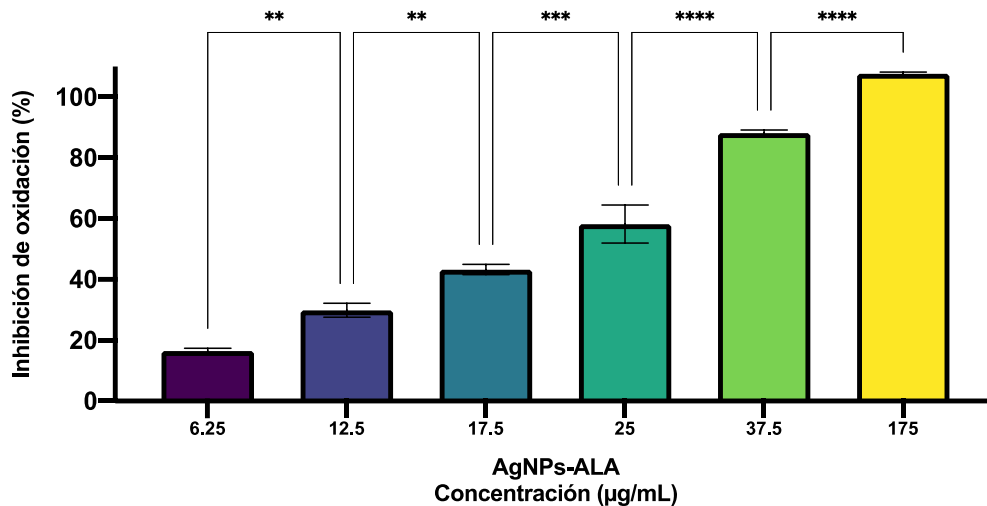
## 2.11 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el software Prism GraphPad 9.0 (La Jolla, California, EUA). Los resultados fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía o dos vías con comparación múltiple de Dunnet, Tukey o Šidák, según la figura correspondiente. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (SD) ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo, para los resultados de las barras. Las barras verticales de los resultados en la expresión de genes representan el error medio estándar (SEM) ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo, para los resultados de las barras. Las diferencias entre resultados se consideraron estadísticamente significativos con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $< 0.0002$  (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

## Capítulo 3. Resultados

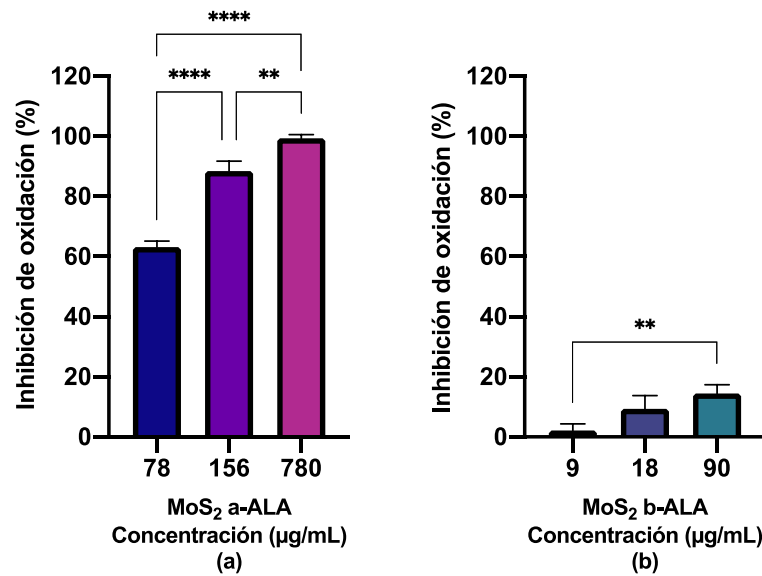
### 3.1 Evaluación de la capacidad antioxidante de nanopartículas

Se realizaron los ensayos espectrofotométricos basados en ABTS y DPPH para comparar las capacidades antioxidantes de las nanopartículas, ya que se encuentran en diferentes solventes y puede afectar la toma de lecturas por el espectrofotómetro de placas EPOCH. Las muestras de nanopartículas se prepararon a las concentraciones indicadas en la metodología y se sonicaron previo a la toma directa de la solución madre para asegurar la homogeneidad de la muestra. Primero se realizaron experimentos para comparar los resultados entre el método ABTS y el método DPPH con las nanopartículas AgNPs-ALA (Figura 6), MoS<sub>2</sub> a-ALA y MoS<sub>2</sub> b-ALA (Figura 7), a las cuales se les denomina nanopartículas metálicas con ácido alfa lipoico (MNPs-ALA). El propósito de estos primeros procedimientos fue elegir un método para ensayos posteriores con los CD y CD-LF (Figura 9).



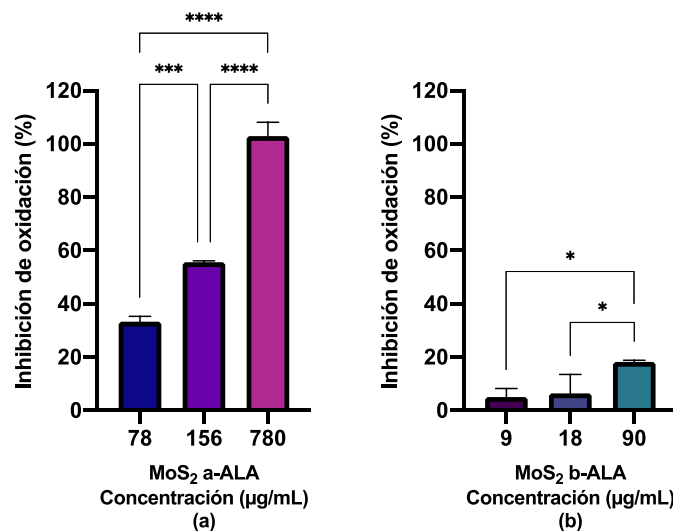
**Figura 6. Inhibición de oxidación de AgNPs-ALA mediante el ensayo de capacidad antioxidante por medio de ABTS.** La concentración de las AgNP-ALA es directamente proporcional al porcentaje de inhibición de oxidación. Los porcentajes se calcularon con respecto a la muestra control. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Dunnet con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $<0.0002$  (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*).

La concentración de las MNPs-ALA es directamente proporcional al porcentaje de inhibición de oxidación en el ensayo de capacidad antioxidante mediante ABTS. Mientras que el grupo MoS<sub>2</sub> b-ALA obtuvo los porcentajes de inhibición de oxidación más bajos.



**Figura 7. Inhibición de oxidación de MoS<sub>2</sub> a-ALA y MoS<sub>2</sub> b-ALA mediante el ensayo de capacidad antioxidante por medio de ABTS.** El grupo MoS<sub>2</sub> b-ALA (b) obtuvo significativamente menor porcentaje que MoS<sub>2</sub> a-ALA. Los porcentajes se calcularon con respecto a la muestra control. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Šidák con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*), <0.0002 (\*\*\*) y <0.0001 (\*\*\*\*).

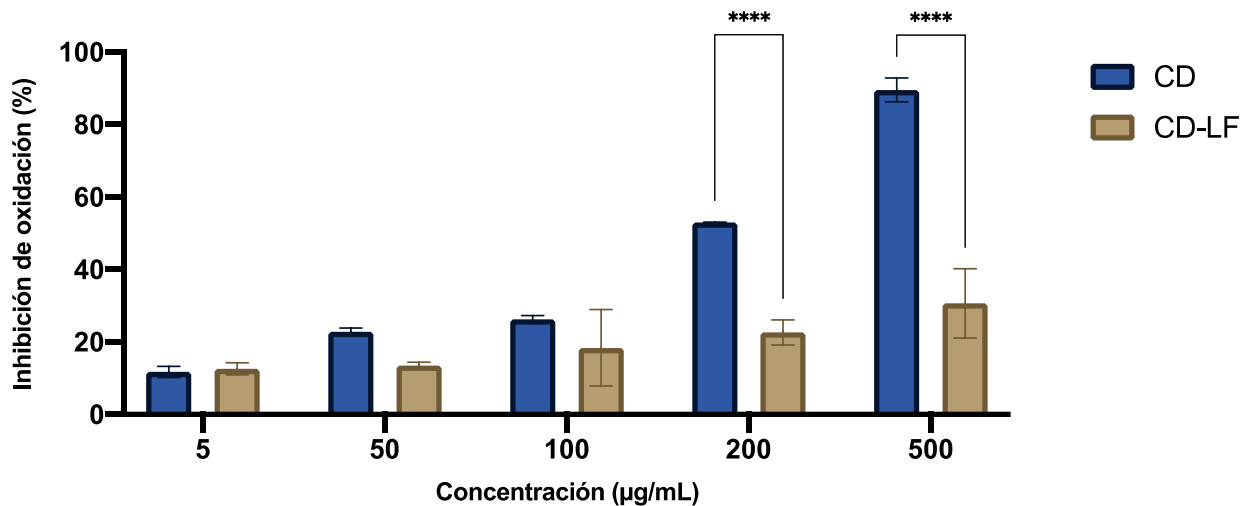
Para corroborar los resultados obtenidos, y cerciorarse que no fuese un problema del solvente donde están suspendidas con el reactivo ABTS, se realizó el ensayo DPPH (Figura 8)



**Figura 8. Inhibición de oxidación de MoS<sub>2</sub> a-ALA y MoS<sub>2</sub> b-ALA mediante el ensayo de capacidad antioxidante por medio de DPPH.** Los resultados son comparables a su contraparte por medio de ABTS. Los porcentajes se calcularon con respecto a la muestra control. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Šidák con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*), <0.0002 (\*\*\*) y <0.0001 (\*\*\*\*).



El método por medio de DPPH presentó porcentajes de inhibición inferiores con respecto a los resultados del método por medio de ABTS en AgNPs-ALA. Mientras que MoS<sub>2</sub> a-ALA presentó porcentajes similares en ambos ensayos. Las nanopartículas MoS<sub>2</sub> b-ALA obtuvieron los menores porcentajes de inhibición en ambos ensayos, comparado con su versión sin glicerol, logrando un máximo de apenas 20% en la concentración sin diluir. Con base en los resultados obtenidos se decidió proceder con el método ABTS para evaluar la capacidad antioxidante de los CD y CD-LF.

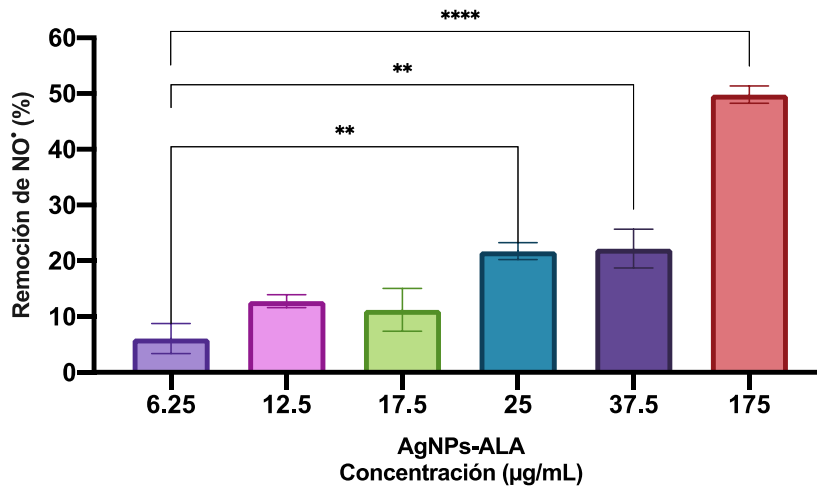


**Figura 9. Inhibición de oxidación de CD y CD-LF mediante el ensayo de capacidad antioxidante por medio de ABTS.** Los porcentajes se calcularon con respecto a la muestra control. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Šidák con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $<0.0002$  (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*).

Esperábamos que la lactoferrina, al ser un agente con capacidad antioxidante, tuviera un efecto de inhibición mayor comparado con su contraparte sin lactoferrina. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran un resultado opuesto a lo que esperábamos, al obtener casi un 100% de inhibición en la concentración más alta de 500 µg/mL de CD con 30% en CD-LF de la misma concentración.

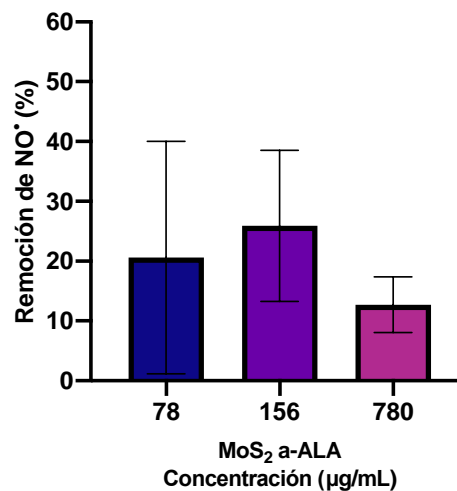
### 3.2 Evaluación de la remoción del radical óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) de nanopartículas

Se evaluó la capacidad de remover NO<sup>•</sup>. Los resultados se muestran en valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos del espectrofotómetro de placas a 540 nm. Se espera que las lecturas sean menores que el control, ya que eso indica una reducción de NO<sup>•</sup>. Se obtuvieron los porcentajes de inhibición de MNPs-ALA.



**Figura 10. Remoción de NO\* por parte de las AgNPs-ALA.** Los porcentajes se calcularon con respecto a la muestra control. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Dunnet con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $<0.0002$  (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*).

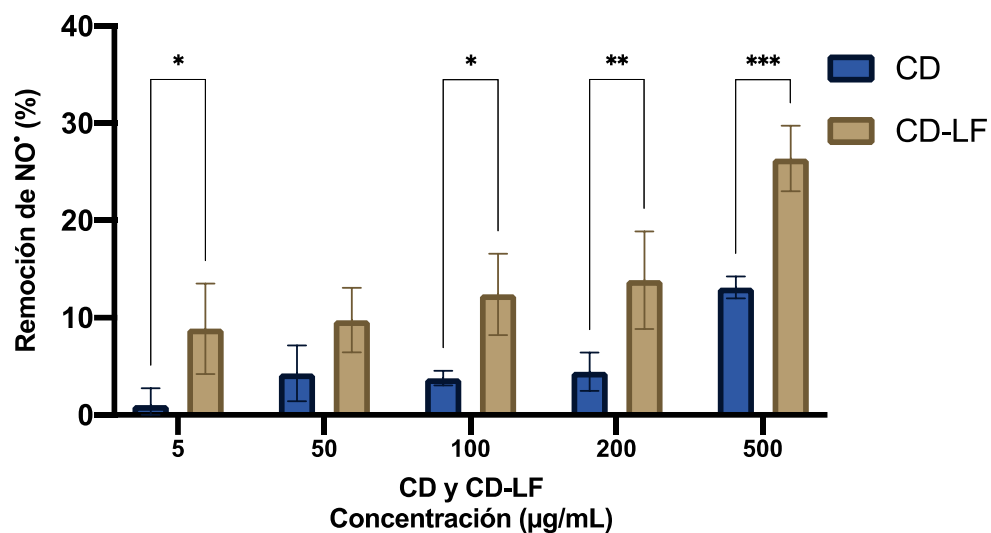
Se puede apreciar una respuesta escalonada, en donde incrementa el porcentaje de remoción de NO\* con respecto al incremento de concentración. Se puede apreciar que la concentración más baja también remueve NO\*. Las concentraciones de 12.5 y 17.5 µg/mL presentan un porcentaje similar entre sí, alrededor del 10%. Lo mismo sucede entre las concentraciones 25 y 37.5 µg/mL. Mientras que la concentración más alta de 175 µg/mL, 10 veces más concentrada que la concentración de 17.5 µg/mL, no presenta un incremento lineal ya que llega hasta un 50% de remoción de NO\*.



**Figura 11. Remoción de NO\* por parte de las nanopartículas MoS<sub>2</sub> a-ALA.** Los porcentajes se calcularon con respecto a la muestra control. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Tukey con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $<0.0002$  (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*).

Al momento de realizar los ensayos de remoción de  $\text{NO}^*$  con las nanopartículas correspondientes a las NPs de  $\text{MoS}_2$  a-ALA se apreció en los pozos que el color de la solución estaba afectando considerablemente la lectura de D.O., mientras que la solución de  $\text{MoS}_2$  b-ALA se tornó turbia probablemente por la diferencia de densidad entre el glicerol y el agua. Debido al aspecto turbio provocado por las  $\text{MoS}_2$  b-ALA no se pudo obtener una lectura confiable. Por otro lado las NPs de  $\text{MoS}_2$  a-ALA no muestran un comportamiento dependiente de la concentración.

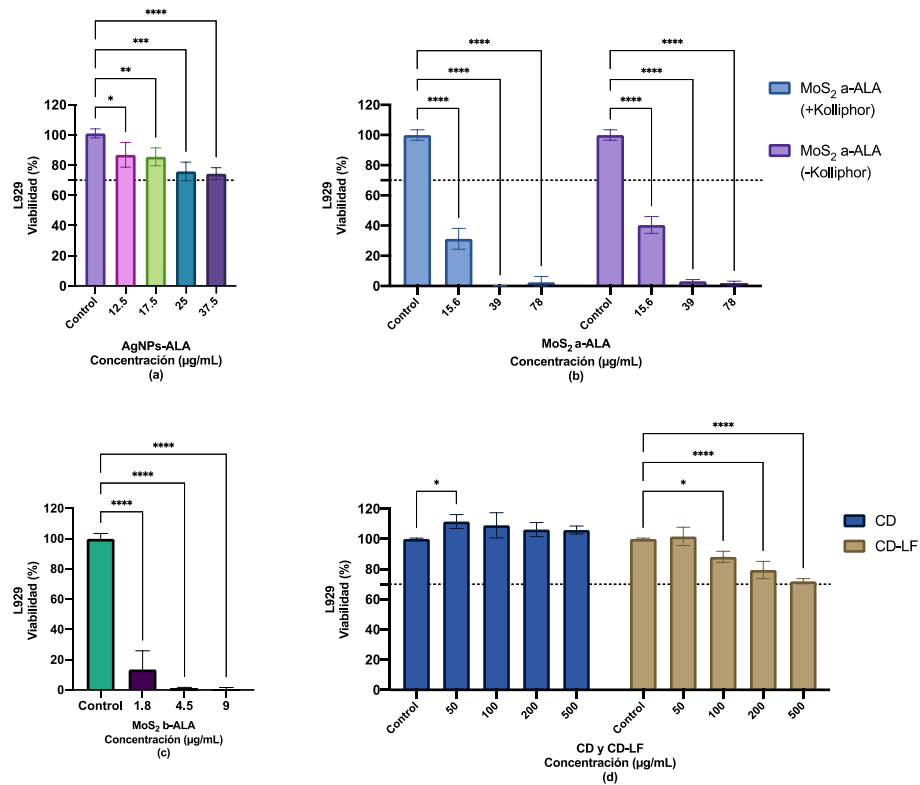
Por otro lado, los resultados con los CD y CD-LF muestran una remoción de  $\text{NO}^*$  dependiente de la concentración (Figura 12).



**Figura 12. Remoción de  $\text{NO}^*$  por parte de los CD y CD-LF.** Los CD-LF tuvieron un mayor porcentaje de remoción, a comparación de su contraparte sin lactoferrina. Los porcentajes se calcularon con respecto a la muestra control. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Šidák con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $< 0.0002$  (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

### 3.3 Pruebas preliminares de viabilidad celular en línea celular L929

Las pruebas preliminares con la línea celular de fibroblastos de ratón L929 funcionaron como un cribado de concentraciones a probar en los subsecuentes ensayos con cultivos celulares, ya que, después del análisis estadístico, se seleccionaron valores cuya reducción en la viabilidad de la línea celular no fue menor del 70% con respecto a la muestra control, considerada como el 100%. El porcentaje de 70% fue elegido de acuerdo con lo establecido por la Organización Internacional de Normalización, en la norma ISO 10993-5, documento que indica que los materiales que reduzcan la viabilidad celular por debajo del 70%, mediante el ensayo colorimétrico MTT, se consideran citotóxicos.



**Figura 13. Viabilidad celular en fibroblastos de ratón L929 a las 24 h.** Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de (a) AgNPs-ALA, (b) MoS<sub>2</sub> a-ALA, (c) MoS<sub>2</sub> b-ALA o (d) puntos cuánticos de carbono (CD) o con lactoferrina (CD-LF) por 24 h. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (±), n=3 por grupo. ANOVA de una vía para (a) AgNPs-ALA y (c) MoS<sub>2</sub> b-ALA y ANOVA de dos vías para (b) MoS<sub>2</sub> a-ALA y (d) CD y CD-LF con comparación múltiple de Dunnet con p<0.05, donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*), <0.0002 (\*\*\*) y <0.0001 (\*\*\*\*) con respecto a la muestra control.

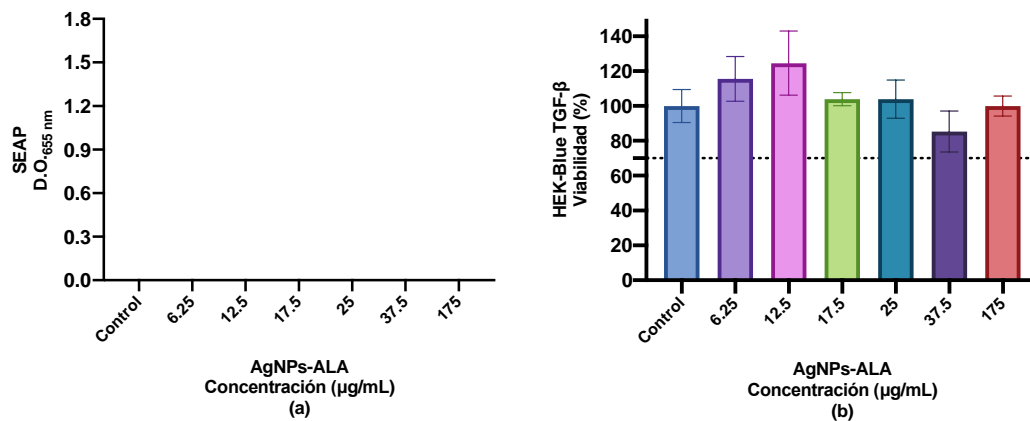
Como se aprecia en la Figura 13 se presentan diferencias significativas en los porcentajes de viabilidad celular con las concentraciones de 25 µg/mL y 37.5 µg/mL de AgNPs-ALA, con respecto al control. Todos los porcentajes de viabilidad se encuentran por encima del 70%, por lo que todas las concentraciones de AgNPs-ALA son aptos para posteriores ensayos en cultivos celulares. Para las muestras de nanopartículas de MoS<sub>2</sub>-ALA se realizaron un par de modificaciones. Ya que la muestra se encontraba en una concentración sin determinar al momento de realizar las pruebas, se decidió diluir diez veces más las diluciones previamente probadas en los ensayos ABTS y Remoción de NO\*, de manera que las concentraciones probadas fueron para las MoS<sub>2</sub> a-ALA: 78, 39 y 15.6 µg/mL; mientras que para las MoS<sub>2</sub> b-ALA fueron: 9, 4.5 y 1.8 µg/mL. Las MoS<sub>2</sub> a-ALA contienen etanol, por lo tanto, se les agregó el emulsificante Kolliphor EL con el propósito de distribuir de manera homogénea las NPs en un medio acuoso. Los porcentajes de viabilidad celular de todas las células tratadas con los grupos de nanopartículas MoS<sub>2</sub>-ALA se encuentra por debajo de 50%. La presencia de Kolliphor EL a las MoS<sub>2</sub>a-ALA logró porcentajes

de viabilidad celular ligeramente menores que en ausencia de este. Mientras que las células L929 tratadas con MoS<sub>2</sub> b-ALA obtuvieron los resultados de viabilidad celular más bajos. Con base en los resultados de viabilidad celular inferiores a 70% con las muestras MoS<sub>2</sub>-ALA diluidas 50 veces y los de remoción de óxido nítrico, se decidió descartar del proyecto el uso de ambos grupos de nanopartículas de MoS<sub>2</sub>-ALA.

### 3.4 Ensayo indicador de la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) en la línea celular HEK-Blue TGF-β

Una vez establecidos los ensayos preliminares de viabilidad celular con L929, se procedió a realizar ensayos con la línea celular HEK-Blue TGF-β, con la cual se puede determinar la actividad de algún tratamiento para intervenir en la vía de señalización de TGF-β mediante la secreción de la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) al medio por parte de las células HEK-Blue y la posterior detección colorimétrica por el reactivo QUANTI-Blue. Los resultados se presentan en términos de D.O., lo cual fue calculado con la ecuación (4).

#### 3.4.1 Tratamientos con AgNPs-ALA: Detección de SEAP por QUANTI-Blue y viabilidad celular

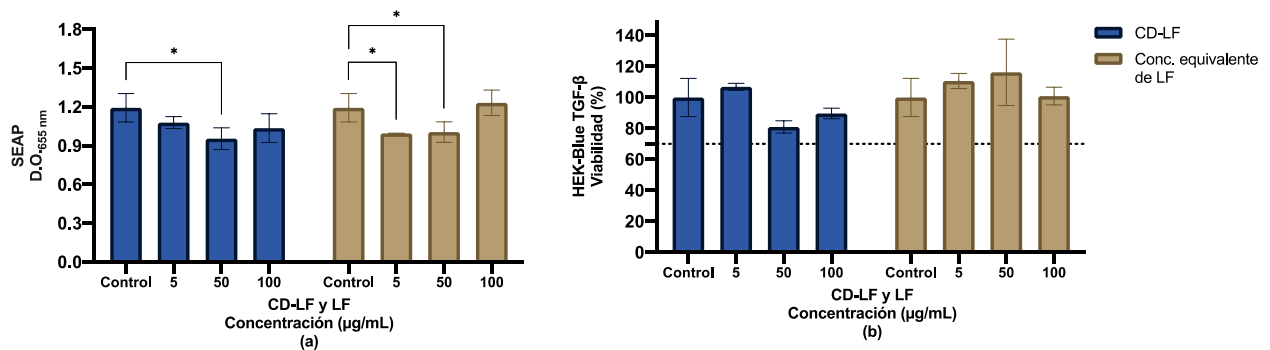


**Figura 14. Fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) detectada por QUANTI-Blue y porcentajes de viabilidad celular en células HEK-Blue TGF-β tratadas con AgNPs-ALA.** (a) Efecto de diferentes concentraciones de AgNPs-ALA para inhibir la producción de SEAP en células HEK-Blue TGF-β y (b) viabilidad celular 18 h después de tratamientos en células HEK-Blue TGF-β. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Dunnett con  $p<0.05$ , no se presentaron diferencias significativas con respecto a la muestra control.

Ninguna de las concentraciones de AgNPs-ALA evaluadas en este trabajo bajo nuestras condiciones logró reducir la producción de SEAP de manera estadísticamente significativa (Figura 14 a). Para corroborar que las variaciones en las lecturas de D.O. no se debían a una disminución significativa en los porcentajes de viabilidad celular, se realizó un ensayo con MTT en la línea celular HEK-Blue TGF- $\beta$ . Los resultados en la Figura 14 b muestran que todas las concentraciones de AgNPs-ALA en las células HEK-Blue TGF- $\beta$  obtuvieron arriba de un 70% de viabilidad celular, por lo que no afecta los resultados obtenidos en el ensayo indicador de SEAP con el reactivo QUANTI-Blue.

### 3.4.2 Tratamientos con CD-LF y LF: Producción de SEAP y viabilidad celular

Con respecto a los puntos cuánticos de carbono (CD), se evaluaron varias concentraciones que disminuyeron la cantidad de SEAP liberada al medio, pero a la vez inhibieron la viabilidad celular de las células HEK-Blue TGF- $\beta$  a menos de 70% con una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , cuando la misma concentración en células L929 mantenía la viabilidad celular ligeramente encima del 100%. Por lo tanto, se decidió probar las CD con lactoferrina (CD-LF), ya que al estar conjugados con el agente antioxidante podría suponer una mejor viabilidad al tener el grupo carboxilo conjugadas a la LF, y ésta a su vez aumenta la probabilidad de intervenir en la vía de señalización de TGF- $\beta$ . Se probaron las 3 concentraciones más bajas de CD-LF, así como la concentración equivalente de LF conjugada a los CD-LF.



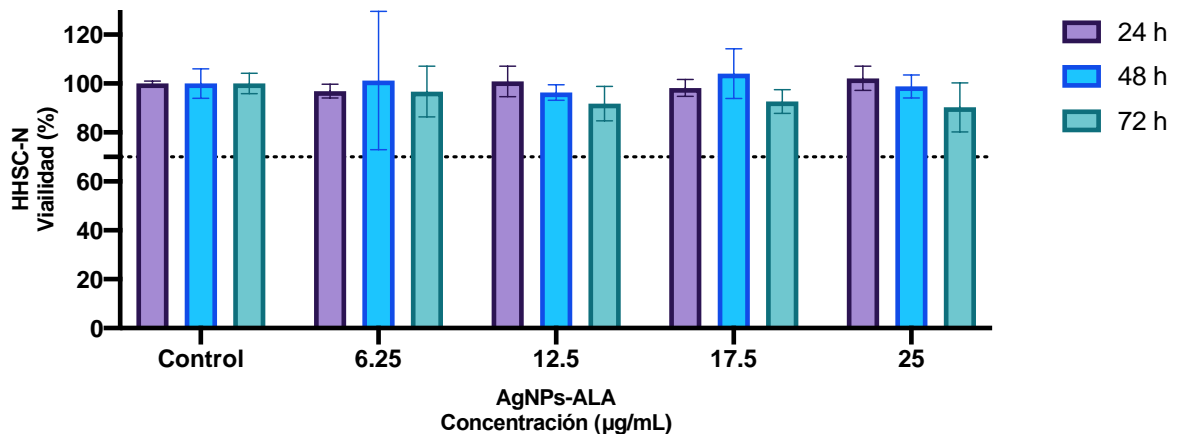
**Figura 15. Fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) detectada por QUANTI-Blue y porcentajes de viabilidad celular en células HEK-Blue TGF- $\beta$  tratadas con CD-LF y LF.** (a) Efecto de diferentes concentraciones de CD-LF y LF para inhibir la producción de SEAP en células HEK-Blue TGF- $\beta$  y (b) viabilidad celular 18 h después de tratamientos en células HEK-Blue TGF- $\beta$ . Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Dunnet con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $<0.0002$  (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*) con respecto a la muestra control.

Los resultados en la Figura 15 (a) muestran que tanto la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CD-LF como la concentración equivalente de LF disminuyeron la presencia de SEAP en ambos casos. Mientras que en las lecturas de viabilidad celular en la Figura 15 (b) se aprecia que ninguna de las concentraciones va debajo del 70% y ninguna de las comparaciones muestra diferencias significativas.

### 3.5 Pruebas de viabilidad celular en células estrelladas hepáticas humanas de un donador con NASH (HHSC-N) y en hepatocitos HepG2

Una vez comprobada la viabilidad tanto en células L929 como en las células HEK-Blue TGF- $\beta$ , se procedió a realizar pruebas de viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico MTT con las células estrelladas hepáticas humanas de donadores con NASH (HHSC-N). Se realizaron 3 ensayos MTT de cada una de las concentraciones, con el propósito de establecer la viabilidad de las células a las 24, 48 y 72 h de incubación.

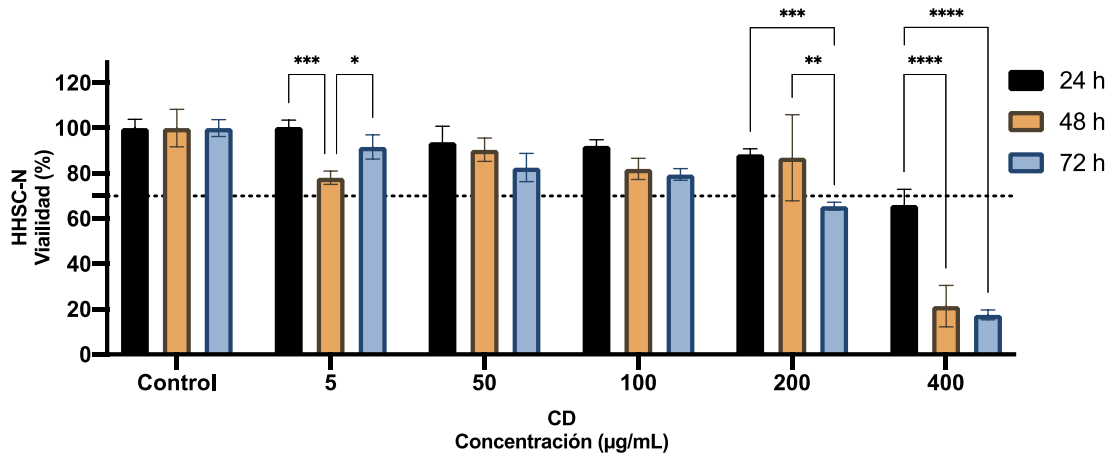
#### 3.5.1 Evaluación de la viabilidad celular de las AgNPs-ALA por 24, 48 y 72 h



**Figura 16. Viabilidad celular en células HHSC-N tratadas con diversas concentraciones de AgNPs-ALA.** Los tratamientos mantuvieron la actividad metabólica de las HHSC-N arriba del 90%. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Tukey con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $< 0.0002$  (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

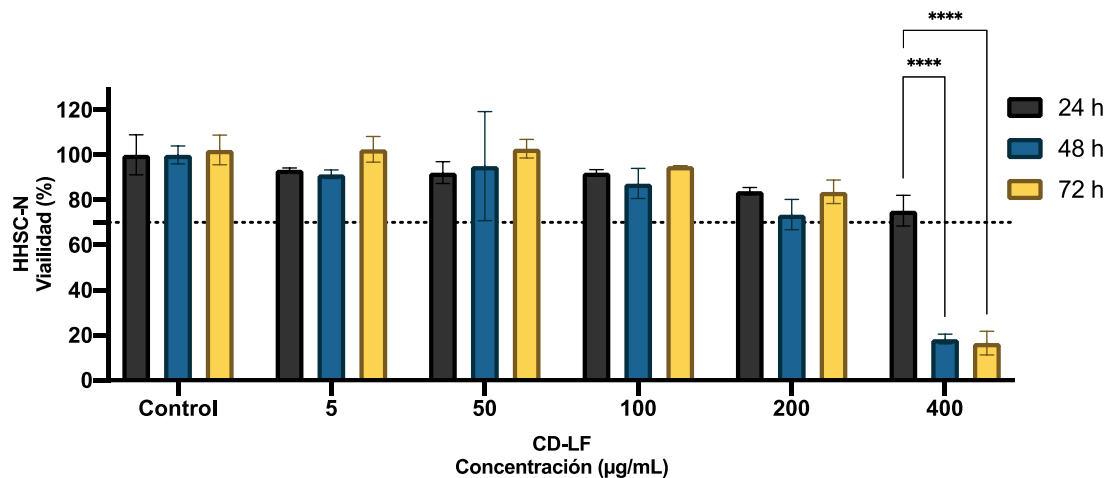
Todas las concentraciones de AgNPs-ALA mantuvieron la actividad metabólica de las HHSC-N arriba del 90%, a las 24 h, 48 h y 72 h.

### 3.5.2 Evaluación de la viabilidad celular con los CD por 24, 48 y 72 h



**Figura 17. Viabilidad celular en células HHSC-N tratadas con diversas concentraciones de CD.** La concentración más alta de 400 µg/mL obtuvo menor porcentaje de viabilidad. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Tukey con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $<0.0002$  (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*).

### 3.5.3 Evaluación de la viabilidad celular con los CD-LF por 24, 48 y 72 h



**Figura 18. Viabilidad celular en células HHSC-N tratadas con diversas concentraciones de CD-LF.** Las HHSC-N tratadas con 400 µg/mL obtuvieron el menor porcentaje de viabilidad celular. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Tukey con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $<0.0002$  (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*).

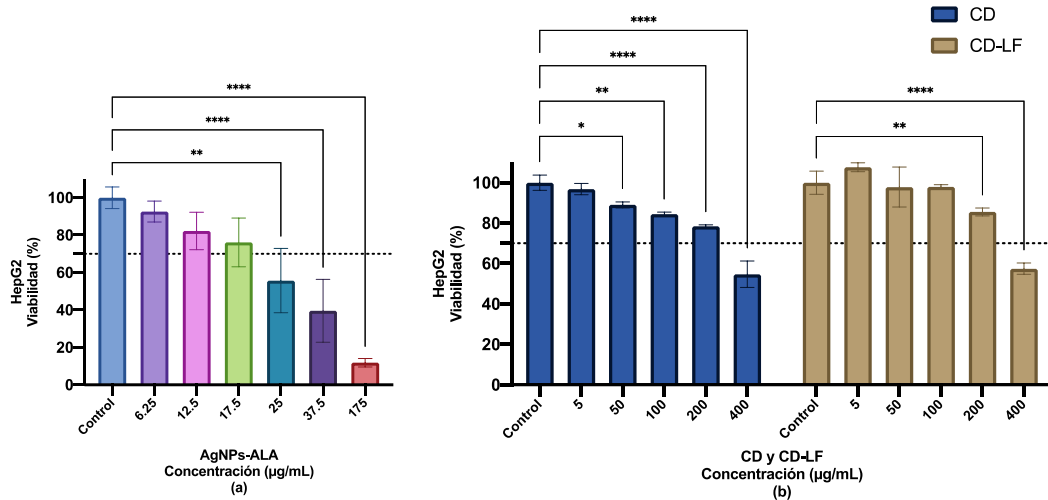
Los resultados de la Figura 17 y de la Figura 18 muestran que la concentración de 400µg/mL obtuvo los menores porcentajes de viabilidad celular a las 48 h y a las 72 h al compararse con la misma concentración



a las 24 h ya que se encuentran muy por debajo del 70% a las 48 h y 72 h. Dicho resultado puede ser obra de la reducida cantidad de medio completo añadido junto con el tratamiento al pozo de la placa, ya que solo se contaba con una muestra madre de CD y CD-LF de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS de para los ensayos.

### 3.5.4 Tratamientos de AgNPs-ALA, CD y CD-LF en línea celular de hepatocitos HepG2

Se realizaron pruebas de viabilidad celular en una línea celular HepG2 de hepatocitos derivados de un paciente con hepatocarcinoma celular. Los hepatocitos HepG2 retienen muchas de las funciones hepáticas, además de ser una línea celular inmortalizada que tiene alta proliferación y provee resultados consistentes.



**Figura 19. Viabilidad celular en células HepG2 tratadas con diversas concentraciones de AgNPs-ALA, CD y CD-LF.** Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de (a) AgNPs-ALA o (b) puntos cuánticos de carbono (CD) o con lactoferrina (CD-LF) por 24 h. A diferencia de las HHSC-N, se obtuvieron concentraciones citotóxicas en las AgNPs-ALA y la misma concentración citotóxica en CD y CD-LF se retiene en las HepG2. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de una vía en (a) y de dos vías en (b) con comparación múltiple de Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $< 0.0002$  (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*) con respecto a la muestra control.

Los resultados muestran que los hepatocitos HepG2 tienen una viabilidad celular debajo del 70% tras ser tratados con concentraciones de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 37.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 175  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AgNPs-ALA (Figura 19 a), a diferencia de las HHSC-N que no muestran porcentajes debajo de 70% en las concentraciones probadas. La pérdida de hepatocitos sería contraproducente para la resolución de la NASH, por lo que concentraciones arriba de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AgNPs-ALA se consideraron como citotóxicas y se descartaron para

subsecuentes ensayos de co-cultivos. Mientras que la concentración de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tanto en CD como en CD-LF sigue presentando porcentajes de viabilidad por debajo del 70%, tanto en HepG2 como HHSC-N, por lo que también quedó descartada (Figura 19 b).

### 3.6 Expresión de genes profibróticos en co-cultivos de células estrelladas hepáticas humanas de donadores con NASH (HHSC-N) y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Se realizó el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para cuantificar la expresión de genes profibróticos en co-cultivos de células estrelladas hepáticas humanas de donadores con NASH (HHSC-N) y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Los resultados se normalizaron al gen de referencia HPRT1, el cual fue elegido con base en los resultados presentados en la literatura para la elección de un gen de referencia en células hepáticas (Zárybnický et al., 2019; Wang y Xu, 2010). Para poder graficar los resultados primero se obtuvieron las curvas de eficiencia de amplificación y se utilizó una variación del método  $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$  que utiliza las eficiencias de amplificación del par de oligonucleótidos del respectivo gen de interés (Alvarez-Lee et al., 2020). Debido a que la muestra con la cual se realizaron las curvas de eficiencia corresponde a un cultivo primario se presentó una gran variabilidad con los resultados al momento de realizar las diluciones seriadas de concentración de HHSC-N. Por lo tanto, se tomaron los datos previamente obtenidos de las curvas de eficiencia realizadas en el laboratorio y se asumieron las eficiencias al 100% para las siguientes representaciones de expresión relativa con respecto a una muestra control y normalizados a HPRT1 (Tabla 7).

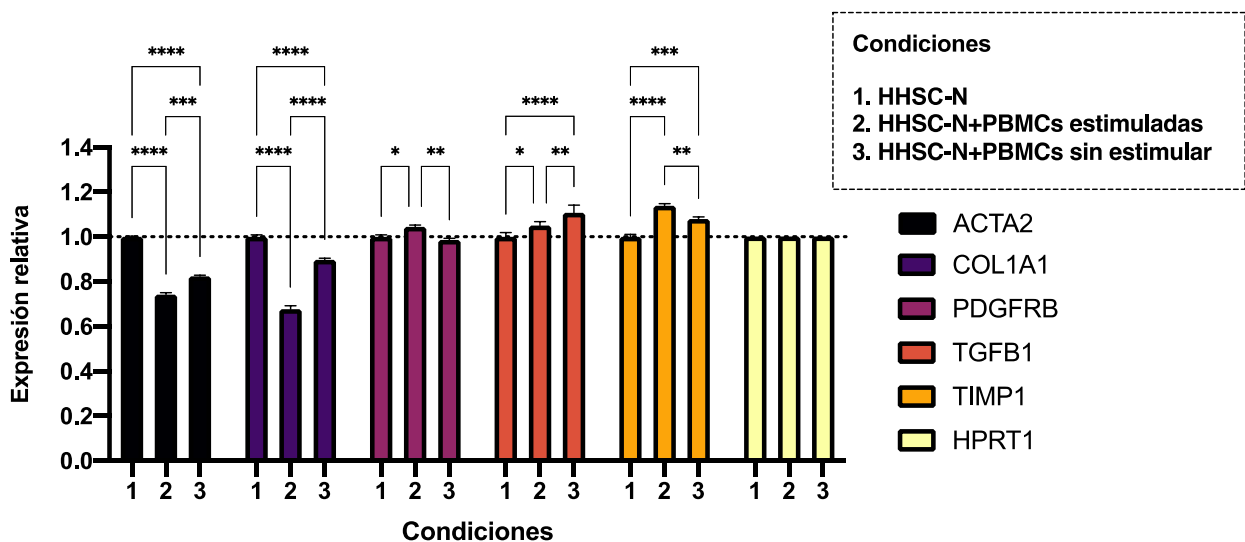
**Tabla 7. Eficiencias de amplificación para graficar expresión relativa de genes profibróticos.**

Gen	Eficiencia (%)	m	b
ACTA2	100	-3.32	35.955
COL1A1	100	-3.32	31.104
PDGFRB	100	-3.32	36
TGFB1	100	-3.32	35.9
TIMP1	100	-3.32	34.17
YWHAZ	102	-3.2635	33.259
HPRT1	101	-3.3299	36.085

Los resultados se dividieron en 3 partes: la primera parte son los niveles de referencia de expresión génica, en donde se obtuvieron los resultados sin tratamientos de NPs tanto en los co-cultivos como en grupos individuales de células, así como en presencia o ausencia de los activadores para PBMCs. El segundo consta de los niveles de expresión de genes en la monocapa de HHSC-N tratadas con las NPs por 24 h. La última parte consta de los co-cultivos de HHSC-N y PBMCs tratadas con las NPs por 24 h y por 72 h.

### 3.6.1 Niveles de referencia de expresión de genes profibróticos

Primero se presentan los niveles de referencia de las HHSC-N con el propósito de conocer si dichos niveles son afectados por un co-cultivo de PBMCs estimuladas (Figura 20).

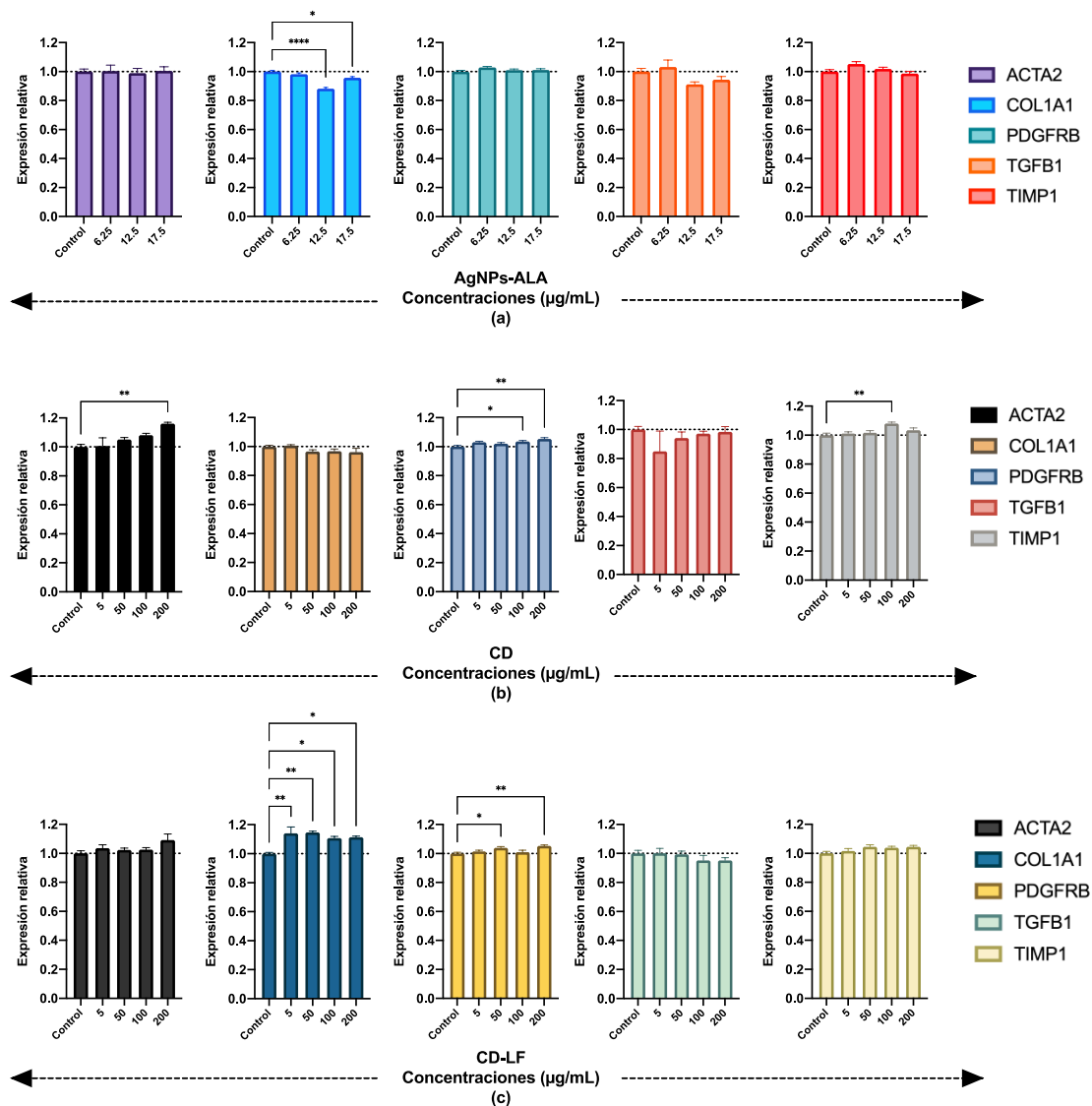


**Figura 20. Niveles de referencia de expresión de genes profibróticos en HHSC-N en monocapa y co-cultivadas con PBMCs.** La presencia de PBMCs, estimuladas o no, en co-cultivo con las HHSC-N logra un efecto en todos los niveles de referencia de expresión de genes profibróticos en HHSC-N. Las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Tukey con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $< 0.0002$  (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

Como todos los genes son considerados profibróticos, ya que su expresión en las células HHSC-N está elevada, se espera que los niveles de expresión relativa sean menores que el respectivo control de cada gen. Los niveles de referencia muestran que la presencia de PBMCs, estimuladas o no, en co-cultivo con las HHSC-N logra un efecto en todos los niveles de expresión de los genes profibróticos. En el caso de ACTA2 y COL1A1 se reducen efectivamente los niveles de expresión relativa. Sin embargo, en el caso de TGFB1 y TIMP1 se aprecia un incremento en presencia de las PBMCs con y sin estimular.

### 3.6.2 Tratamientos con AgNPs-ALA, CD y CD-LF en monocapa de HHSC-N por 24 h

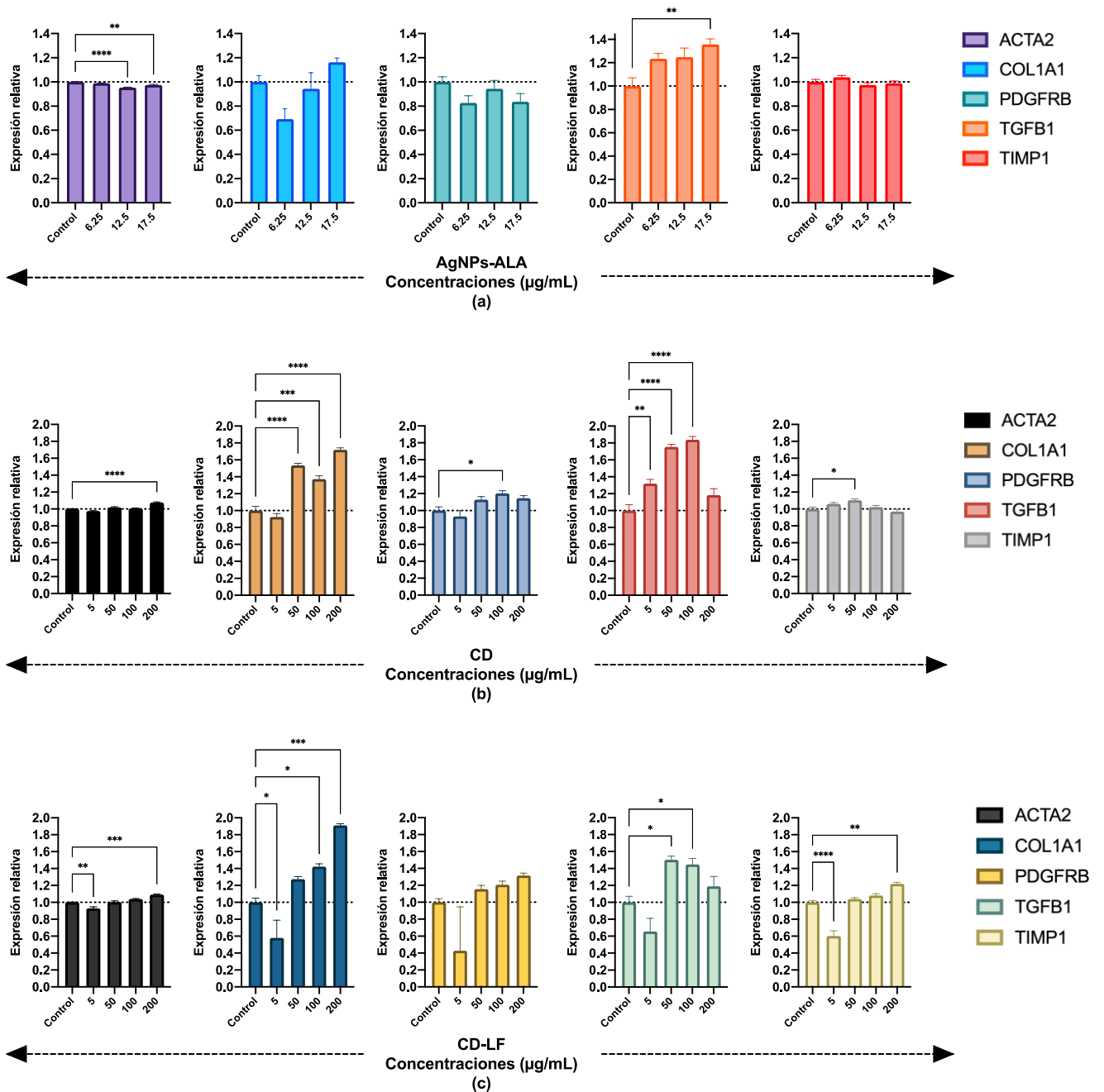
Se evaluaron los efectos de las nanopartículas en la monocapa de células HHSC-N, es decir sin co-cultivo, para saber si las NPs por sí solas son capaces de manipular la expresión de genes profibróticos sin la presencia de las PBMCs a las 24 h. De acuerdo con el análisis estadístico, los niveles de expresión de la mayoría de los genes evaluados no fue alterada por el tratamiento de las NPs (Figura 21). Sin embargo, el mayor descenso en la expresión relativa presentado fue a 0.9 veces en COL1A1 con 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AgNPs-ALA (Figura 21 a) y un aumento a casi 1.2 veces en COL1A1 con las CD-LF (Figura 21 c).



**Figura 21. Niveles de expresión de genes profibróticos en monocapa de HHSC-N con diferentes tratamientos durante 24 h.** Las células fueron tratadas con (a) AgNPs-ALA, (b) CD y (c) CD-LF a diversas concentraciones. No se afectó en su mayoría la expresión relativa de genes. Las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $< 0.0002$  (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

## 3.6.3 Tratamientos con AgNPs-ALA, CD y CD-LF en co-cultivo HHSC-N y PBMCs por 24 h

h



**Figura 22. Niveles de expresión de genes profibróticos en co-cultivo de HHSC-N y PBMCs con diferentes tratamientos durante 24 h.** Las células fueron tratadas con (a) AgNPs-ALA, (b) CD y (c) CD-LF a diversas concentraciones. Se aprecian aumentos en los niveles de expresión relativa de genes como TGFB1 y COL1A1 en CD y CD-LF. Las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Tukey con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $< 0.0002$  (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

Los resultados de los co-cultivos de HHSC-N y PBMCs tratadas con nanopartículas por 24 horas muestran que los niveles de expresión de la mayoría de las muestras se encuentran cercanas a su respectivo control.

Los niveles de expresión de ACTA2 se mantienen cercanos al control ante todos los tratamientos de nanopartículas, a todas las concentraciones. Sin embargo, las concentraciones más altas de todos los grupos de NPs marcan diferencias significativas en los niveles de expresión de ACTA2.

Mientras que en COL1A1 los niveles de expresión relativa se vieron incrementados con las concentraciones más altas de las NPs, de manera que la concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se expresa alrededor de 1.7 veces más con respecto al control de COL1A1 en CD y hasta 1.9 veces en CD-LF y se presentan diferencias significativas. Las concentraciones más bajas de las NPs redujeron los niveles de expresión de COL1A1, sin embargo solo presentan diferencias significativas en CD-LF 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 22 a-c).

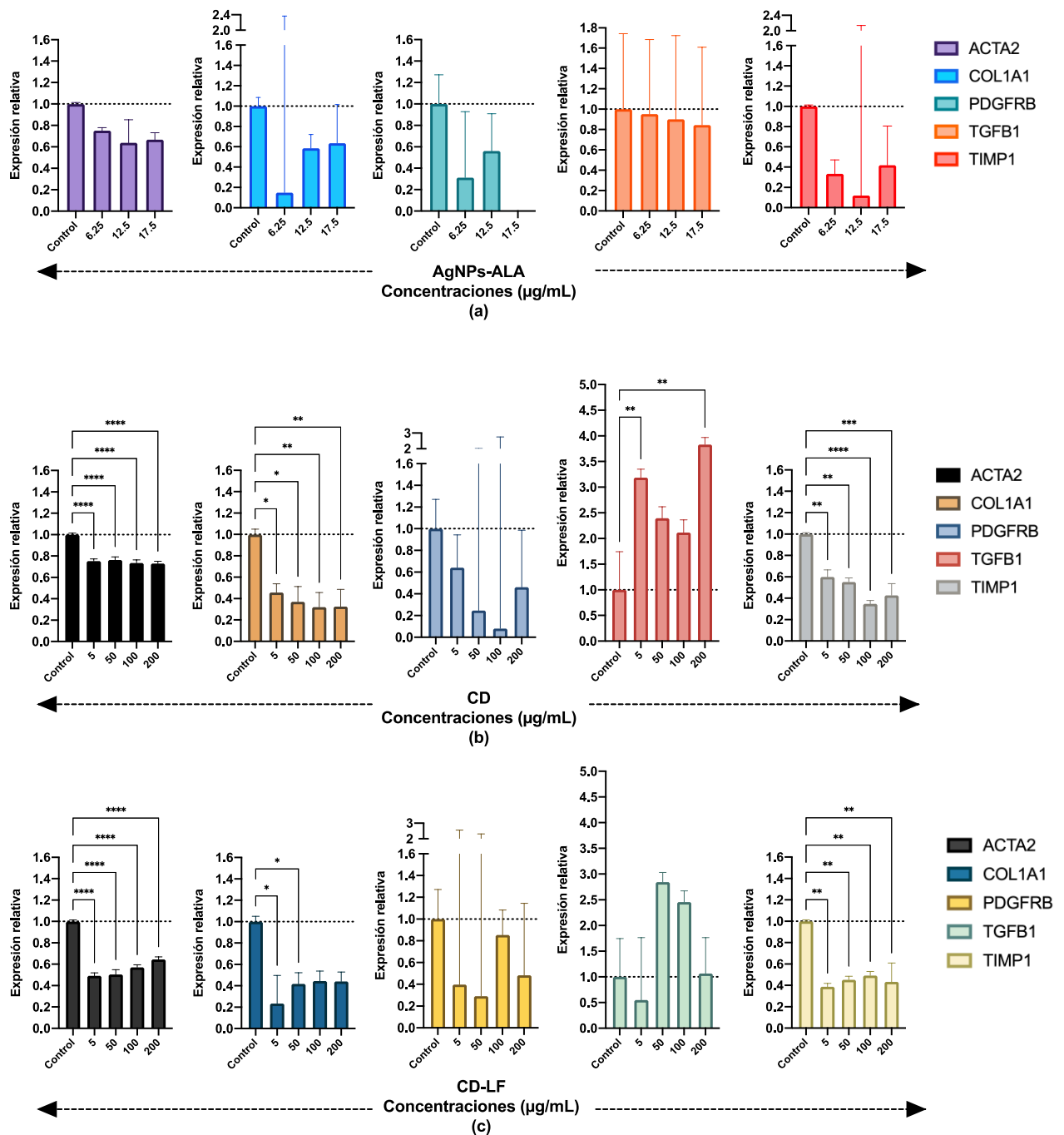
Los niveles de expresión de PDGFRB también presentan un descenso en la concentración más baja de las NPs y un incremento en los niveles de expresión dependiente de la concentración tras ser tratados con las NPs. Sin embargo, dicho comportamiento no se observa con las células tratadas con AgNPs-ALA y CD, debido a que la concentración más alta de 17.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, disminuye los niveles de expresión relativa con respecto a su concentración anterior (Figura 22 a-c).

En el caso de TGFB1 se aprecia un aumento en los niveles de expresión relativa conforme aumenta la concentración en AgNPs, CD y CD-LF a excepción de la concentración más alta de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CD y CD-LF, en donde se aprecia una disminución con respecto a la muestra anterior de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CD muestran niveles de expresión relativa de TGFB1 de 1.7 y 1.8 veces, respectivamente. Mientras que en las CD-LF los niveles de expresión relativa más altos de TGFB1 se mantienen cercanos a 1.5 veces (Figura 22 b y c).

Finalmente los niveles de expresión relativa de TIMP1 no se ven afectados por las AgNPs-ALA y levemente por los CD. Sin embargo, la concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CD-LF disminuye el nivel de expresión relativa a 0.6, mientras que la concentración más alta de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la aumenta a 1.2 veces los niveles de expresión (Figura 22 a-c).

## 3.6.4 Tratamientos con AgNPs-ALA, CD y CD-LF en co-cultivo HHSC-N y PBMCs por 72

h



**Figura 23. Niveles de expresión de genes profibróticos en co-cultivo de HHSC-N y PBMCs con diferentes tratamientos durante 72 h.** Las células fueron tratadas con (a) AgNPs-ALA, (b) CD y (c) CD-LF a diversas concentraciones. Diferentes concentraciones de todos los tratamientos no lograron afectar de manera contundente la expresión relativa de genes. Las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Dunnet con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (\*), 0.002 (\*\*),  $<0.0002$  (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*).

Los resultados de los co-cultivos a las 72 h muestran que todos los tratamientos de AgNPs-ALA, CD y CD-LF disminuyeron en promedio los niveles de expresión de los genes ACTA2, COL1A1 y TIMP1 con diferencias significativas (Figura 23). No obstante, las AgNPs-ALA no lograron diferencias significativas en los niveles de expresión a ninguna de sus concentraciones (Figura 23 a).

Los niveles de expresión relativa de ACTA2 en las HHSC-N fueron reducidos con los tratamientos de CD por un 25% y en CD-LF hasta en un 50%. En AgNPs-ALA lo más bajo que se obtuvo fue una reducción en los niveles de expresión relativa de aproximadamente 30% con 17.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Mientras que los niveles de expresión relativa de COL1A1 en las HHSC-N se alcanzó una disminución de aproximadamente un 60% por el tratamiento con las CD y CD-LF en sus concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Mientras que los resultados con AgNPs-ALA muestran altos valores del error estándar de la media (SEM) sin diferencias significativas.

Mientras que los niveles de expresión relativa de PDGFRB fueron disminuidos en promedio por todas las concentraciones de las NPs, sin embargo, muestran altos niveles de varianza en todos los tratamientos, evidenciado por el SEM que va por encima del nivel control. Por lo tanto, el análisis estadístico no muestra diferencias significativas (Figura 23 a-c). La muestra de ADNc que fue tratada con la concentración de 17.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AgNPs-ALA no logró registrar amplificación del gen PDGFRB, probablemente porque necesitaba más de los 40 ciclos a los cuales se programó el termociclador para ser amplificada y detectada (Figura 23 a).

Por otro lado, los niveles de expresión relativa de TGFB1 son los más altos en todo el estudio. En CD a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se aprecia un nivel de expresión relativa arriba de 3.5 veces, el valor más alto detectado. En el caso de CD no se aprecia un aumento en los niveles de expresión relativa de TGFB1 con respecto a la concentración de CD, ya que en 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se aprecia un nivel de expresión relativa alrededor de 3.2 veces, sin embargo, en 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se ve un descenso escalonado entre 2.5 y 2.0 veces, respectivamente, hasta llegar a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  donde la expresión relativa vuelve a subir. Dicho comportamiento no se aprecia en las células tratadas con CD-LF en donde el promedio de expresión de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se encuentra debajo del control. La concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de los CD-LF ve un aumento en el nivel de expresión relativa cercano a 3.0 veces, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve un descenso a 2.5 veces y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  presenta un comportamiento similar al control (Figura 23 b y c).



Finalmente los niveles de expresión relativa de TIMP1 disminuyeron con todas las concentraciones de CD y CD-LF. Se alcanzó una disminución de hasta un 60% con 100 µg/mL de CD y en CD-LF con 5 µg/mL. Los resultados con las AgNPs-ALA no mostraron diferencias significativas (Figura 23 a-c).

### **3.7 Detección de citocinas solubles en co-cultivos de células estrelladas hepáticas humanas de un donador con NASH (HHSC-N) y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)**

Detectamos las citocinas solubles en los medios de los co-cultivos. Primero obtuvimos las lecturas de referencia para conocer los niveles de producción de citocinas de las HHSC-N y si la producción de citocinas es afectada por un co-cultivo de PBMCs con y sin activador, de manera que las condiciones se dividieron en cinco grupos: el primer grupo consta de un cultivo de solo HHSC-N. El segundo consta de un co-cultivo con HHSC-N y PBMCs que fueron activadas. El tercero consta de un co-cultivo de HHSC-N y PBMCs sin activar. El cuarto consta de un cultivo de PBMCs activadas. El último grupo consta de un cultivo de PBMCs sin activar.

Una vez obtenidos estos valores de referencia realizamos lecturas de los tratamientos a las 24 h y 72 h. Adicionalmente obtuvimos valores de referencia de la monocapa de HHSC-N a las 24 h para conocer si los tratamientos lograban modular la producción de citocinas sin la presencia de las PBMCs. Por lo tanto, dividimos los resultados en tres grupos: el primero son los valores de referencia de cultivos de monocapa de HHSC-N que fueron tratados por 24 h. El segundo consta de co-cultivos de HHSC-N con PBMCs activadas que fueron tratados por 24 h. El último grupo consta de co-cultivos de HHSC-N con PBMCs activadas que fueron tratados por 72 h

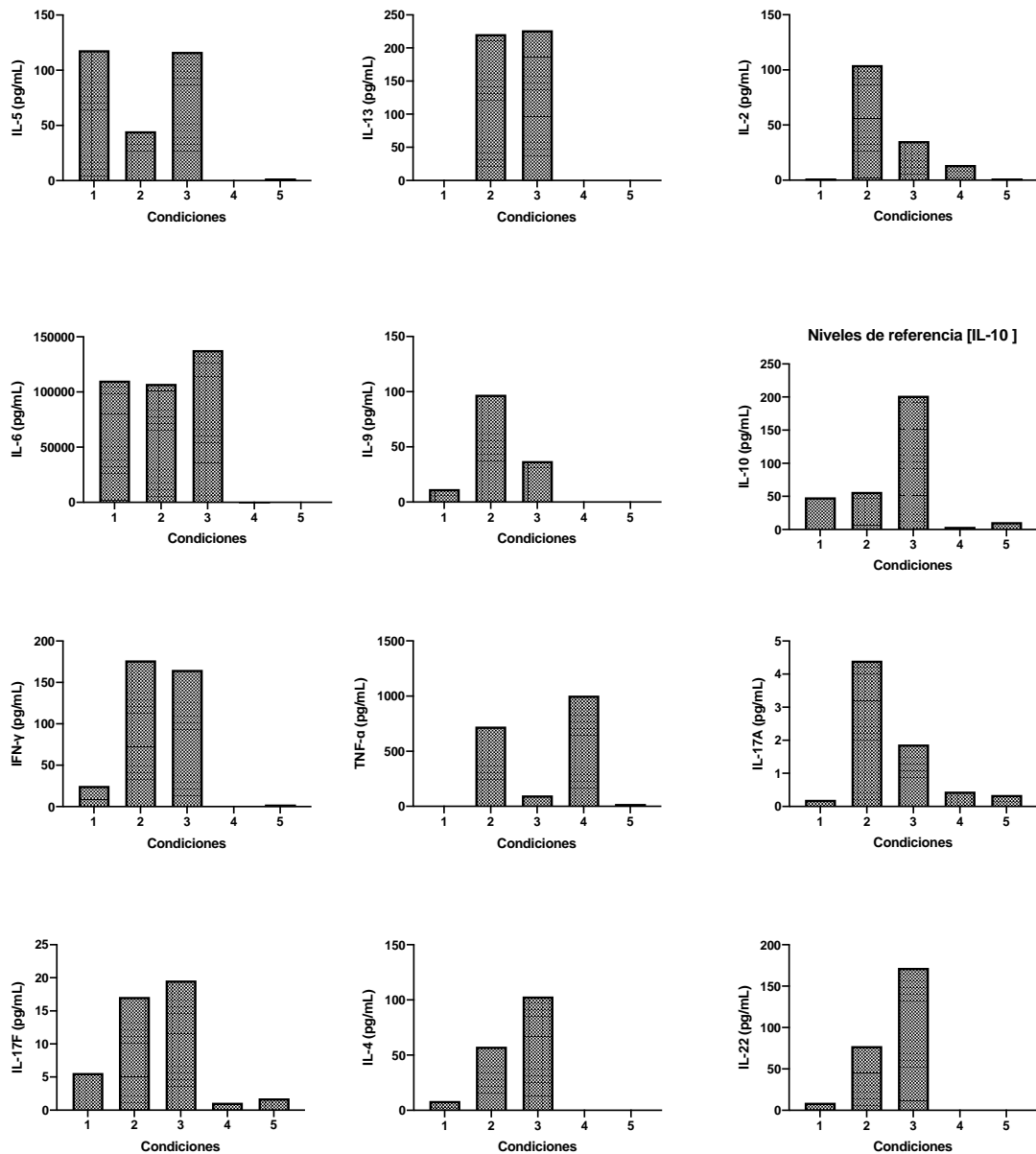
#### **3.7.1 Niveles de referencia de citocinas sin tratamientos en cultivos con HHSC-N y PBMCs**

Los resultados de los niveles de referencia de citocinas sin tratamientos permiten dar una idea sobre la producción de citocinas por obra de las HHSC-N, la aportación de las PBMCs, activadas o no, por sí solas y el comportamiento en conjunto una vez que se siembran en co-cultivo. Por lo tanto, se puede analizar los resultados por categorías como las citocinas que se expresan en PBMCs, o en HHSC-N y citocinas que

aumentan su producción en presencia de PBMCs con y sin activador. Cabe mencionar que de estos experimentos, al igual que los resultados de qPCR, se obtuvieron del análisis de una muestra biológica.

#### Condiciones

1. HHSC-N
2. HHSC-N + PBMCs estimuladas
3. HHSC-N + PBMCs sin estimular
4. PBMCs estimuladas
5. PBMCs sin estimular



**Figura 24. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs sin tratamientos.** Se detectaron las concentraciones de 12 citocinas en cultivos con las siguientes condiciones: (1) Monocapa de HHSC-N, (2) HHSC-N + PBMCs activadas (3) HHSC-N + PBMCs sin activar, (4) PBMCs activadas y (5) PBMCs sin activar. Las PBMCs, con y sin activador, tienen la menor cantidad de citocinas producidas (con excepción de TNF- $\alpha$ ), mientras que la combinación de co-cultivo con HHSC-N aumenta las concentraciones de todas las citocinas. Los datos corresponden a la lectura de un experimento independiente en donde el citómetro de flujo registró 4,000 eventos por muestra a un umbral de detección ajustado a las perlas de detección.

La producción de citocinas en los cultivos de PBMCs, con y sin activador, tienen en la mayoría de los casos las menores concentraciones detectadas por cada grupo de citocinas con respecto a los grupos que tienen HHSC-N, a excepción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el cual muestra su valor más alto en el cultivo de PBMCs activadas.

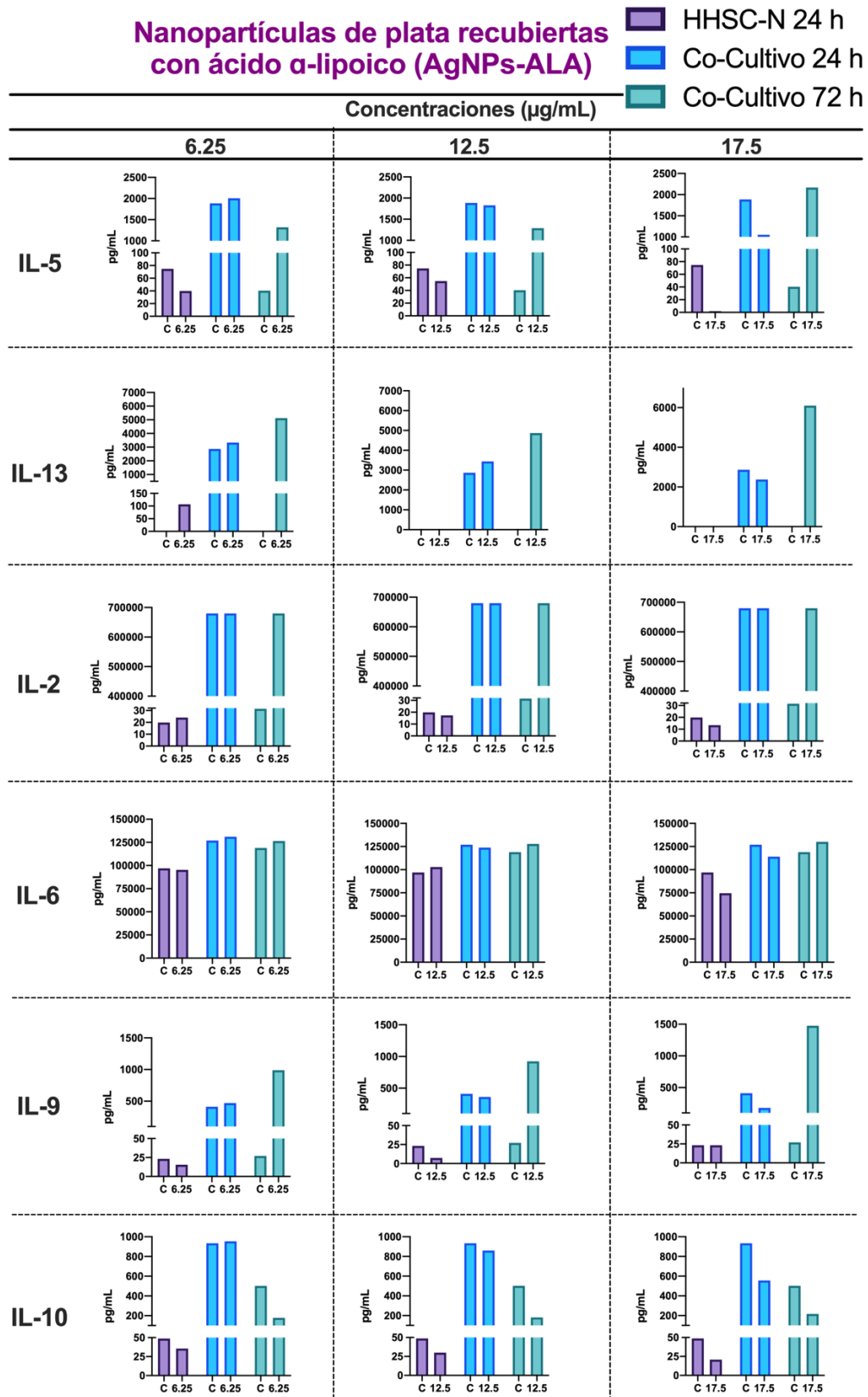
Por otro lado, se aprecia que las interleucinas (IL)-13, IL-2, IL-17A, IL-17F y TNF- $\alpha$  muestran concentraciones muy cercanas a cero en los cultivos de monocapa de HHSC-N. Sin embargo, dichas concentraciones de citocinas se ven incrementadas en la presencia de PBMCs con y sin activador. Se aprecia una mayor concentración de citocinas en co-cultivo de PBMCs activadas en casi todos los casos a comparación de las que no están activadas, con excepción de IL-17F e IL-13 las cuales tienen concentraciones similares entre el co-cultivo con y sin activar.

Se puede apreciar que las HHSC-N producen bajos niveles IL-9, IL-10, interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-4 e IL-22, los cuales se ven incrementados entre 5 a 10 veces más con respecto a la concentración en monocapa de HHSC-N. Las citocinas IL-22, IL-4, e IL-10 presentan una mayor concentración en co-cultivo con PBMCs sin activar, mientras que IFN- $\gamma$  e IL-9 presentan una mayor concentración en presencia PBMCs activadas.

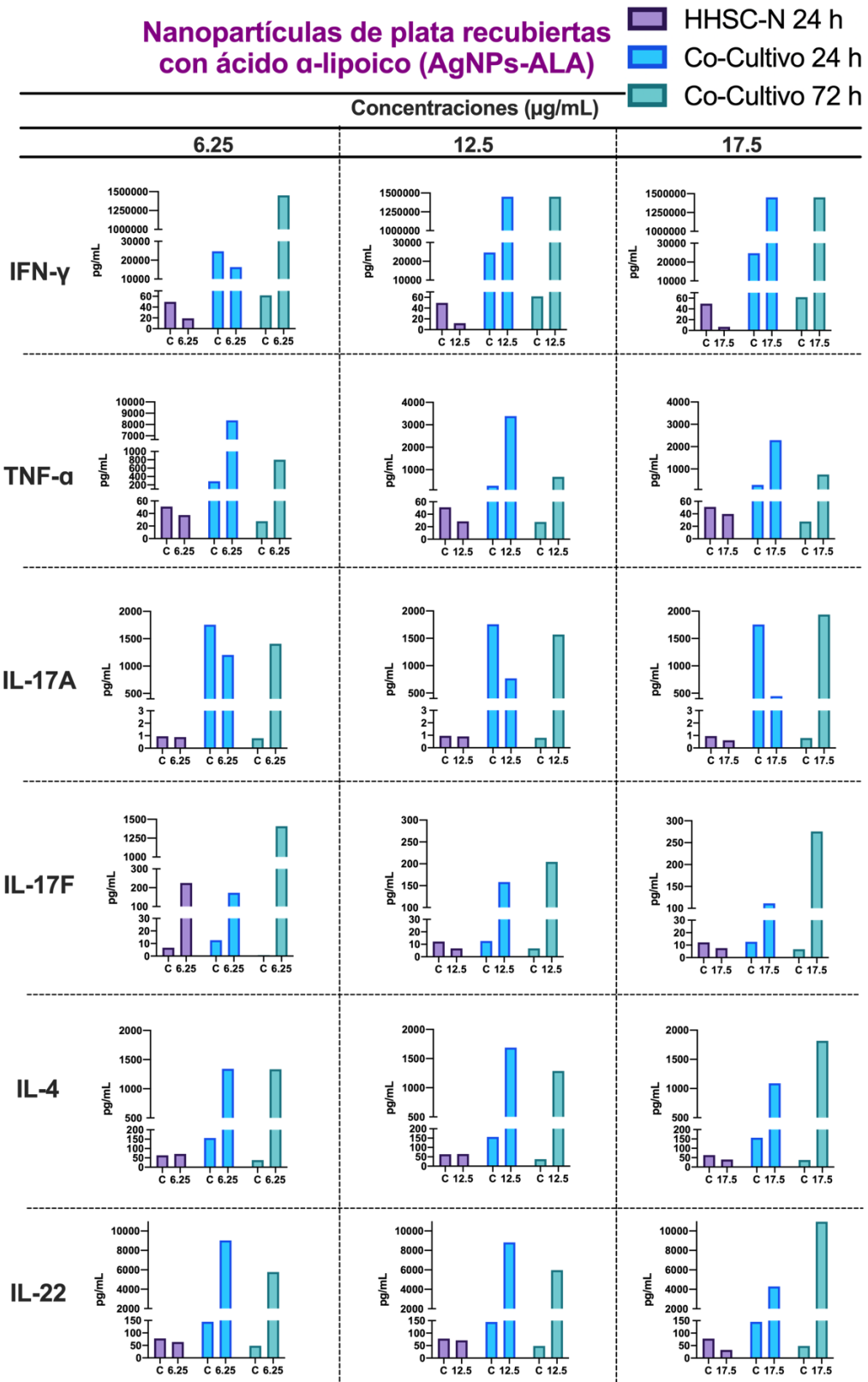
Finalmente destacan IL-5 e IL-6 que tienen una alta producción en la monocapa de HHSC-N. IL-6 presenta la mayor concentración basal de todas las citocinas en HHSC-N, con un valor cercano a 110,000 pg/mL. Dicho valor de IL-6 se mantiene en co-cultivo con PBMCs activadas, mientras que el co-cultivo con PBMCs sin activar muestra la concentración más alta de todos los cultivos realizados con un valor cercano a 130,000 pg/mL.

### 3.7.2 Citocinas solubles detectadas en co-cultivos con HHSC-N y PBMCs tratados con AgNPs-ALA por 24 h y 72 h

Se evaluaron las concentraciones de citocinas solubles en los cultivos de los tres grupos previamente mencionados que fueron tratados con AgNPs-ALA. En las columnas se aprecia la concentración con las cuales fueron tratadas, mientras que en las filas se aprecia la citocina que fue evaluada. En los gráficos se aprecian los resultados del control contra la concentración evaluada en cada uno de los 3 grupos de experimentos.



**Figura 25. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs tratados con AgNPs-ALA [1/2].** Se detectaron las concentraciones de 12 citocinas solubles en tres grupos. Se muestran las concentraciones registradas de las citocinas IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9 e IL-10. Los datos corresponden a la lectura de un experimento independiente en donde el citómetro de flujo registró 4,000 eventos por muestra a un umbral de detección ajustado a las perlas de detección.



**Figura 26. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs tratados con AgNPs-ALA [2/2].** Se detectaron las concentraciones de 12 citocinas solubles en tres grupos. Se muestran las concentraciones registradas de las citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-17F, IL-4 e IL-22. Los datos corresponden a la lectura de un experimento independiente en donde el citómetro de flujo registró 4,000 eventos por muestra a un umbral de detección ajustado a las perlas de detección.

Las concentraciones en 11 citocinas, sin contar IL-6, en la monocapa de HHSC-N a las 24 h se encuentran en niveles relativamente bajos en comparación con las concentraciones alcanzadas en los co-cultivos a las 24 h y 72 h.

Las HHSC-N mantienen una concentración elevada de IL-6 por sí solas, como se apreció en los resultados de los niveles de referencia (Figura 24). Los tratamientos con AgNPs-ALA mantienen muy cercano al control los valores de IL-6, a excepción de la concentración 17.5 µg/mL la cual redujo en aproximadamente 25,000 pg/mL la concentración de IL-6. Mientras que los co-cultivos a las 24 h y 72 h mantienen la concentración del control de IL-6 entre 125,000 pg/mL y 115,000 pg/mL (Figura 25).

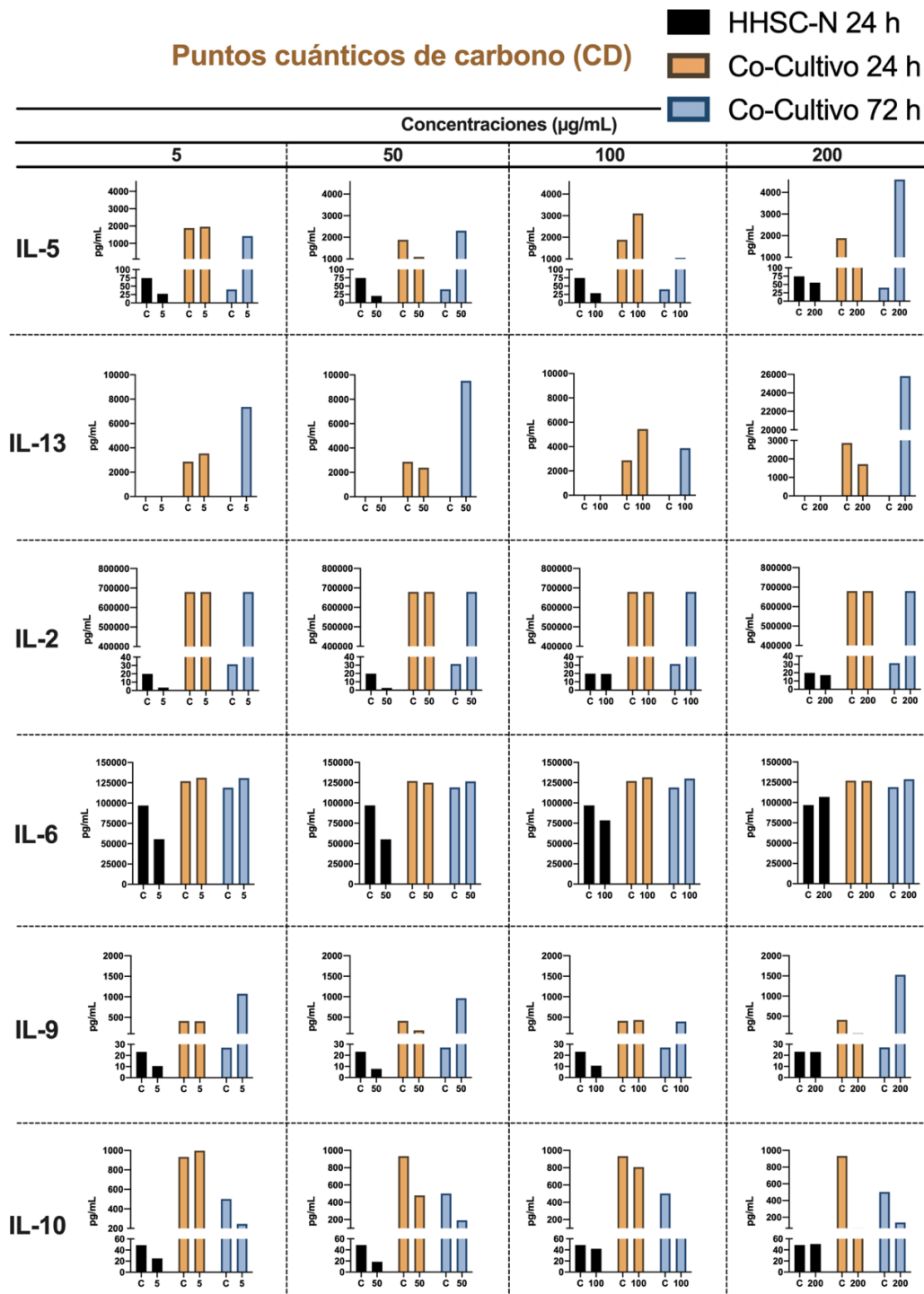
La citocina IL-13 presenta valores de 0 pg/mL en los controles de los grupos de monocapa HHSC-N 24 h y co-cultivo 72 h. Sin embargo, en la presencia de las AgNPs-ALA, se aprecia un aumento, entre 5,000 y 6,000 pg/mL a las 72 h en todas las concentraciones. Por otro lado, los co-cultivos a las 24 h muestran concentraciones de IL-13 de aproximadamente 3,000 pg/mL tanto en el control como en los tratamientos (Figura 25).

Se detectaron dos citocinas en altas concentraciones a comparación de las demás citocinas: IL-2 e IFN-γ. Se detectó 700,000 pg/mL de IL-2 en el control del co-cultivo a las 24 h y en las tres concentraciones de AgNPs-ALA a las 24 h y a las 72 h. Por otro lado, IFN-γ fue la citocina con mayor concentración detectada. Los controles de IFN-γ en el co-cultivo se mantuvieron entre 25,000 pg/mL y 60 pg/mL en los co-cultivos de 24 h y 72 h, respectivamente. Mientras que en los co-cultivos tratados con 12.5 µg/mL y 17.5 µg/mL de AgNPs-ALA se detectaron concentraciones de casi 1,500,000 pg/mL (Figura 25 y Figura 26).

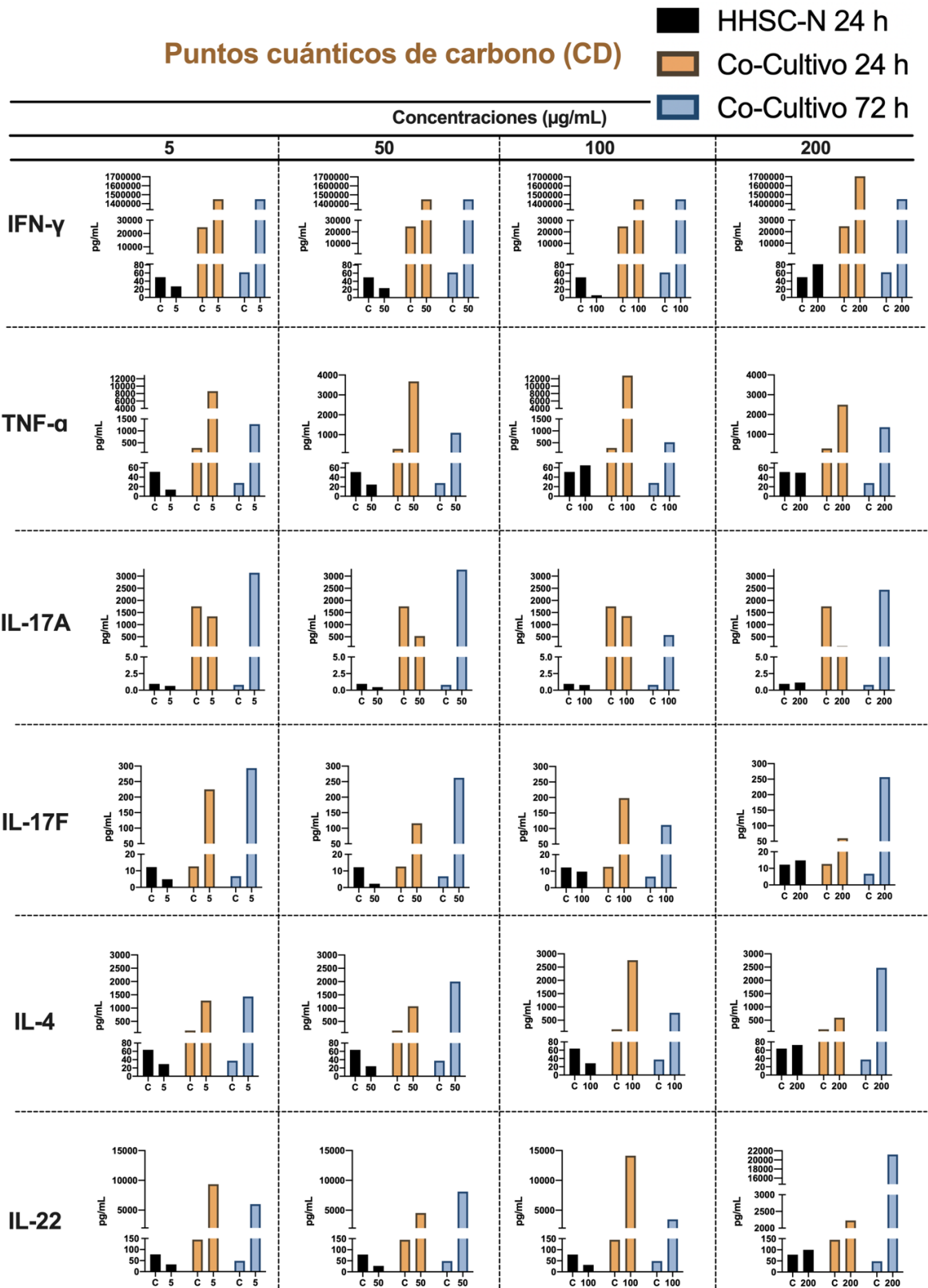
En los co-cultivos a 24 h y 72 h se aprecia que citocinas como IL-4, IL-22, IL-17F, TNF-α e IL-9 tienen un aumento en sus concentraciones detectadas con todos los tratamientos. Mientras que citocinas como IL-17A e IL-5 presentan un descenso en el co-cultivo a las 24 h, pero a las 72 h presentan un aumento de concentración.

Finalmente la concentración de IL-10 tiene una respuesta dependiente de la concentración de AgNPs-ALA en el co-cultivo a las 24 h, mientras que en el co-cultivo a las 72 h se aprecia una concentración inferior al control cercana a 200 pg/mL (Figura 25 y Figura 26).

### 3.7.3 Citocinas solubles detectadas en co-cultivos con HHSC-N y PBMCs tratados con CD por 24 h y 72 h



**Figura 27. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs tratados con CD [1/2].** Se detectaron las concentraciones de 12 citocinas solubles en tres grupos. Se muestran las concentraciones registradas de las citocinas IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9 e IL-10. Los datos corresponden a la lectura de un experimento independiente en donde el citómetro de flujo registró 4,000 eventos por muestra a un umbral de detección ajustado a las perlas de detección.



**Figura 28. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs tratados con CD [2/2].** Se detectaron las concentraciones de 12 citocinas solubles en tres grupos. Se muestran las concentraciones registradas de las citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-17A, IL-17F, IL-4 e IL-22. Los datos corresponden a la lectura de un experimento independiente en donde el citómetro de flujo registró 4,000 eventos por muestra a un umbral de detección ajustado a las perlas de detección.



Las concentraciones en 11 citocinas, sin contar IL-6, en la monocapa de HHSC-N a las 24 h se encuentran en niveles relativamente bajos en comparación con las concentraciones alcanzadas en los co-cultivos a las 24 h y 72 h.

Las HHSC-N mantienen una concentración elevada de IL-6 por sí solas, como se apreció en los resultados de los niveles de referencia (Figura 24) y en los tratamientos con AgNPs-ALA (Figura 25). Detectamos 100,000 pg/mL de IL-6 en el control en la monocapa de HHSC-N a las 24 h. Los CD a concentraciones de 5 y 50 µg/mL disminuyeron las concentraciones de la monocapa HHSC-N a la mitad, a 50,000 pg/mL. Mientras que la concentración 100 µg/mL parece haber reducido por un cuarto la concentración de IL-6, a 75,000 µg/mL. Por otro lado, la concentración más alta de 200 µg/mL de CD aumentó la concentración detectada a aproximadamente 110,000 pg/mL. Ninguno de los tratamientos con CD logró reducir la concentración de IL-6 en co-cultivo de 24 h ni a las 72 h (Figura 27).

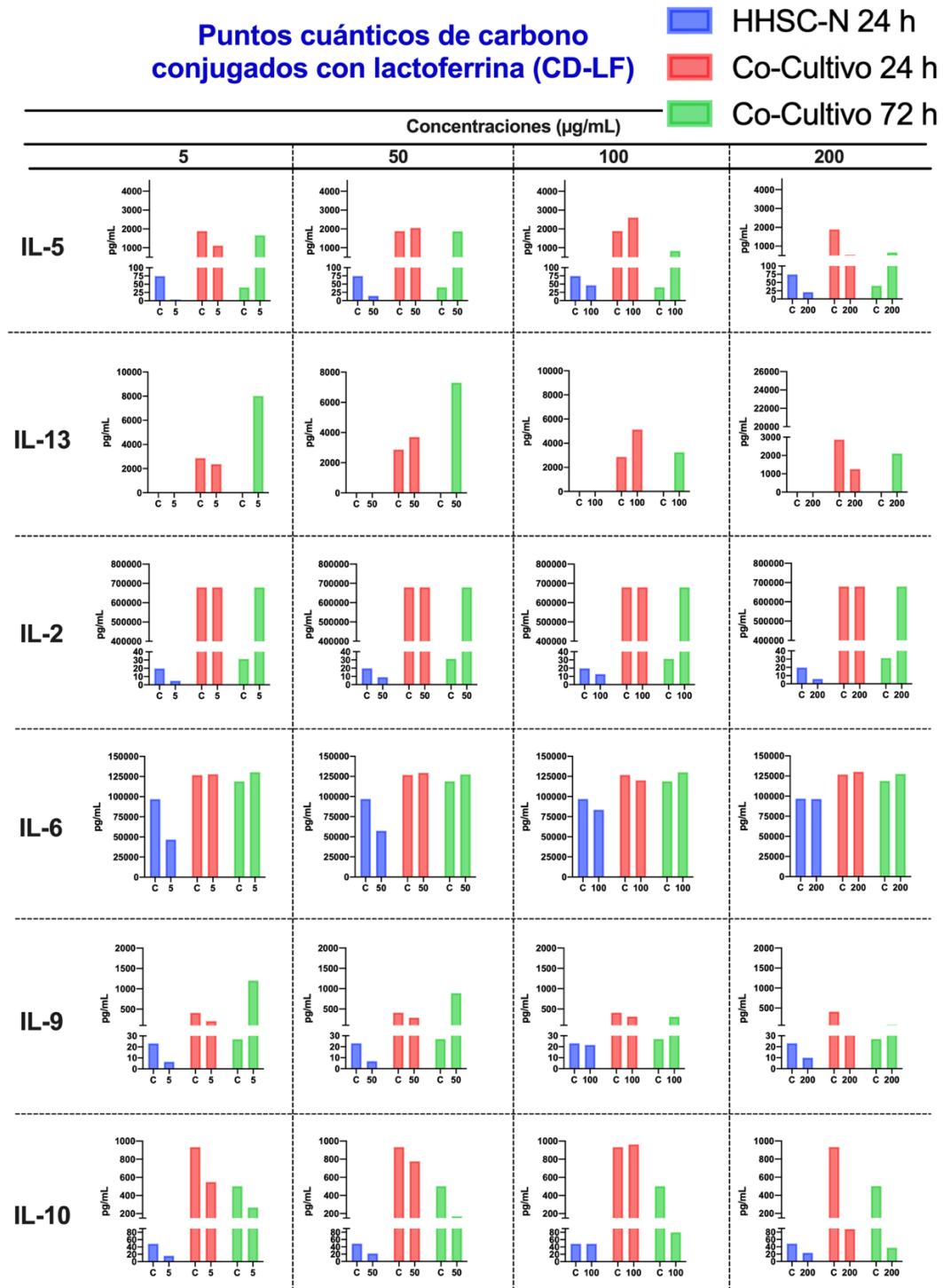
La citocina IL-13 presenta una respuesta similar a los tratamientos con AgNPs-ALA (Figura 25). Con 50 µg/mL y 200 µg/mL de CD detectamos concentraciones de casi 10,000 pg/mL y 26,000 pg/mL de IL-13, respectivamente, en los co-cultivos a las 72 h. Los co-cultivos a las 24 h muestran concentraciones de IL-13 de aproximadamente 3,000 pg/mL tanto en el control como en los tratamientos con CD, con excepción de 100 µg/mL en el co-cultivo a las 24 h que registró aproximadamente 5,500 pg/mL (Figura 27).

En los co-cultivos de IL-2 se detectaron casi 700,000 pg/mL tanto en el control a las 24 h como en las tres concentraciones de CD a las 24 h y a las 72 h. IFN-γ se comporta casi exactamente igual que en los tratamientos con AgNPs-ALA, donde la diferencia más notoria es que se alcanzan casi 1,700,000 pg/mL a 200 µg/mL de CD en co-cultivo a las 24 h (Figura 27 y Figura 28).

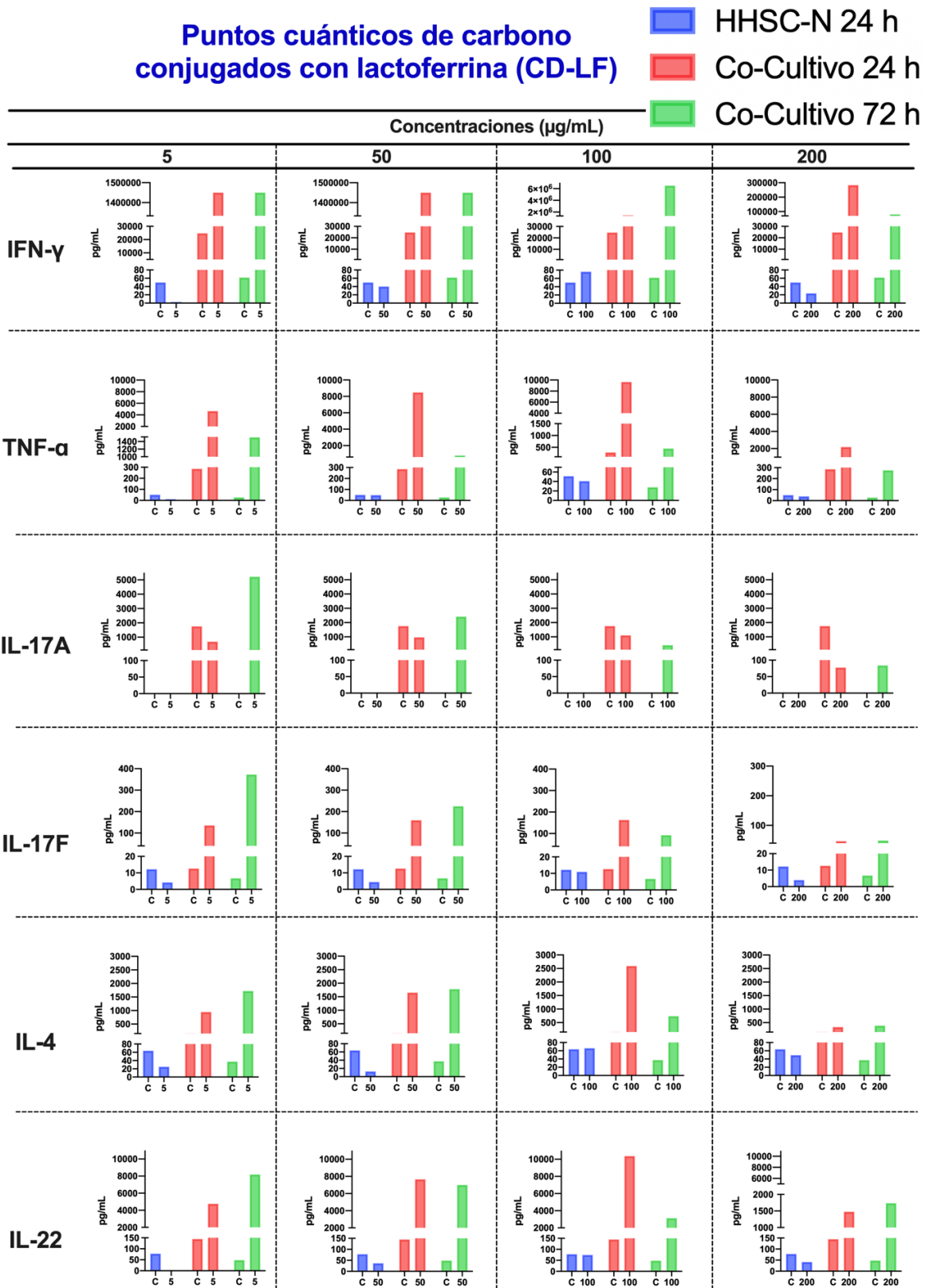
IL-4, IL-22, IL-17F, TNF-α e IL-9 presentaron un aumento en sus concentraciones detectadas con todos los tratamientos. Los tratamientos con CD en IL-17A e IL-5 presentan un aumento de concentración en el co-cultivo a las 72 h, mientras que 100 µg/mL de CD en el co-cultivo a las 24 h aumenta 1,000 pg/mL de IL-5.

Finalmente IL-10 presenta un ligero aumento a las 24 h con la concentración de 5 µg/mL, sin embargo, para todas las demás concentraciones, ya sea en co-cultivo a las 24 h o 72 h, se aprecia una disminución en la concentración detectada de IL-10 (Figura 27 y Figura 28).

3.7.4 Citocinas solubles detectadas en co-cultivos con HHSC-N y PBMCs tratados con CD-LF por 24 h y 72 h



**Figura 29.** Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs tratados con CD-LF [1/2]. Se detectaron las concentraciones de 12 citocinas solubles en tres grupos. Se muestran las concentraciones registradas de las citocinas IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9 e IL-10. Los datos corresponden a la lectura de un experimento independiente en donde el citómetro de flujo registró 4,000 eventos por muestra a un umbral de detección ajustado a las perlas de detección.



**Figura 30. Concentraciones de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-N y PBMCs tratados con CD [2/2].** Se detectaron las concentraciones de 12 citocinas solubles en tres grupos. Se muestran las concentraciones registradas de las citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-17F, IL-4 e IL-22. Los datos corresponden a la lectura de un experimento independiente en donde el citómetro de flujo registró 4,000 eventos por muestra a un umbral de detección ajustado a las perlas de detección.

En la monocapa de HHSC-N se detectaron concentraciones bajas a comparación con las concentraciones alcanzadas en los co-cultivos a las 24 h y 72 h, como se ha visto en los grupos de tratamiento con AgNPs-ALA y CD (Figura 25 a Figura 28). Las HHSC-N mantienen una concentración elevada de IL-6 por sí solas. Los controles de la monocapa de HHSC-N de IL-6 tienen una concentración detectada de 100,000 pg/mL. Los CD-LF a concentraciones de 5 y 50 µg/mL disminuyeron los niveles de la monocapa HHSC-N a la mitad, a 50,000 µg/mL. Mientras que la concentración 100 µg/mL disminuyó la concentración por un cuarto, a 75,000 µg/mL, una respuesta básicamente idéntica al de los tratamientos con CD (Figura 27). La concentración más alta de 200 µg/mL no presentó cambios. No se logró reducir la concentración detectada de IL-6 en los co-cultivo de 24 h ni a las 72 h con CD-LF.

La citocina IL-13 presenta una respuesta similar a los tratamientos con CD (Figura 27). Sin embargo, en los co-cultivos a las 72 h con 200 µg/mL de CD-LF no se detectó una concentración alta de 26,000 pg/mL, sino una de 2,000 pg/mL (Figura 29). IFN-γ presentó la concentración más alta ante los tratamientos, tal y como se apreció en previos tratamientos con AgNPs-ALA y CD. Los pozos tratados con CD-LF a 5 µg/mL y 50 µg/mL detectaron 1,500,000 pg/mL de IFN-γ. Sin embargo, en 100 µg/mL de CD-LF se detectó 6,500,000 pg/mL de IFN-γ. Esto podrían deberse a un error en la lectura o los cálculos realizados por el software LEGENDplex propietario de BioLegend del cual se extrajeron los datos. Lo mismo pudo haber sucedido en la concentración de 200 µg/mL, la cual detectó una concentración inferior de 300,000 pg/mL a comparación de las demás (Figura 29).

IL-4, IL-22, IL-17F, y TNF-α presentaron un aumento en sus concentraciones detectadas con todos los tratamientos en todos los co-cultivos (Figura 30). IL-9 parece disminuir su concentración ante los tratamientos en el co-cultivo a las 24 h, sin embargo, a las 72 h se aprecia un aumento en la concentración con todos los tratamientos (Figura 29). Los tratamientos con CD-LF en IL-17A presentan un aumento de concentración en el co-cultivo a las 72 h, con la excepción de que su concentración en el co-cultivo a las 72 h con 200 µg/mL de CD-LF es de menos de 100 pg/mL a comparación de los 3,000 pg/mL detectados con CD a la misma concentración (Figura 28). Finalmente IL-10 presenta concentraciones más bajas con todos los tratamientos de CD-LF, con la excepción del co-cultivo a las 24 h en donde no se presentaron cambios con CD-LF a 100µg/mL.

## Capítulo 4. Discusión

---

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son producidas en grandes cantidades durante enfermedades hepáticas, como la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Estas moléculas contribuyen al deterioro de la función hepática debido a la relación con la respuesta inmunológica que provoca inflamación crónica. Nuestras nanopartículas (NPs) están conjugadas con agentes anti-oxidantes y anti-inflamatorios, por lo tanto, la evaluación de sus capacidades hepatoprotectoras a diferentes concentraciones nos dió una mejor idea de la eficacia para tratar a las células estrelladas hepáticas de donadores con NASH (HHSC-N). Para evaluar las características consideradas como hepatoprotectoras de nuestros grupos de nanopartículas, realizamos dos ensayos:

- El ensayo de inhibición del radical ABTS<sup>•+</sup> permite relacionar la capacidad anti-oxidante de las nanopartículas utilizadas en este proyecto, y asociarla a la inhibición de ROS.
- El ensayo con el reactivo de Griess, que permite relacionar la capacidad anti-inflamatoria asociada a la remoción del radical óxido nítrico (NO<sup>•</sup>).

Con el ensayo de radical libre, ABTS<sup>•+</sup>, se puede medir la actividad antioxidante de algún compuesto. El radical ABTS<sup>•+</sup> se genera al mezclar un fuerte agente oxidante con la sal ABTS. La oxidación de ABTS por parte del persulfato de potasio (KPS) provoca la emisión de un electrón de un átomo de nitrógeno, lo cual da lugar al radical libre ABTS<sup>•+</sup>. La reducción del radical ABTS<sup>•+</sup> verde-azul a un color transparente debido a los antioxidantes donadores de hidrógeno se mide con la supresión de su característico espectro de absorción de onda a 734 nm (Ratnavathi and Komala, 2016). Además de realizar el ensayo del radical libre ABTS<sup>•+</sup> también se realizó el ensayo del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>), una solución preparada en etanol que toma un color violeta, la cual se reduce cuando ocurre una transferencia de electrones. El radical libre DPPH<sup>•</sup> es estable a temperatura ambiente y se reduce a 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo en la presencia de moléculas antioxidantes. Esto da lugar a una solución en etanol con un leve color amarillento casi incoloro medible a una longitud de onda de 517 nm (Huang et al., 2005). Ambos tipos de ensayos son estándar para evaluar la capacidad antioxidante, sin embargo, cada grupo de nanopartículas se encuentra en diferentes solventes. El ensayo de capacidad antioxidante mediante ABTS tiene la ventaja sobre el ensayo de capacidad antioxidante mediante DPPH ya que es posible analizar muestras tanto en medios acuosos como solventes orgánicos como etanol (Bedlovičová et al., 2020). Por esta razón todas las NPs fueron evaluadas por el ensayo ABTS. Sin embargo, para corroborar los resultados

también se evaluaron las MoS<sub>2</sub>-ALA, las cuales contienen etanol, con el ensayo DPPH que se utiliza con muestras que contengan solventes orgánicos.

Al momento de analizar los primeros resultados de los ensayos colorimétricos se presentó un inconveniente con la coloración inherente de las nanopartículas, especialmente para las nanopartículas de MoS<sub>2</sub>-ALA cuyo color era similar a un gris oscuro, lo cual resultaba en valores de densidad óptica (D.O.) más altos que los establecidos por el control. Para remover este efecto de coloración aportado por las NPs, se incorporaron “blancos”, los cuales contenían el mismo tamaño de muestra (50 µL) y el resto del respectivo solvente (150 µL) en vez de la solución ABTS<sup>••</sup> o DPPH<sup>•</sup>. Restar el valor del blanco a las lecturas del ensayo ABTS o ensayo DPPH ayudó a dar una lectura certera al calcular los porcentajes de inhibición de oxidación.

El ensayo de capacidad antioxidante mediante ABTS muestra que las nanopartículas de plata recubiertas con ácido alfa lipoico (AgNPs-ALA) presentan una respuesta dependiente de la concentración. Se ha demostrado que las AgNPs por sí solas pueden aumentar la producción de ROS (Bedlovičová et al., 2020), sin embargo, al recubrirlas con ALA no se aprecia producción de ROS (Hajtuch et al., 2022). El ALA se produce en órganos con alta actividad metabólica como el hígado. Su actividad antioxidante se debe a su capacidad directa de eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS), pero además de eso tiene la capacidad de regenerar especies antioxidantes endógenas como glutatión, Vitamina C o Vitamina E. Por lo tanto, el ALA tiene capacidad de regular el nivel de enzimas antioxidantes, y de prevenir el estrés oxidativo y las respuestas inflamatorias hepáticas (Fayez et al., 2018; Stanković et al., 2014). Su capacidad para remover las ROS en modelos *in vivo* con enfermedades inducidas como la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) se ha demostrado en estudios previos (El-Maadawy et al., 2020; Foo et al., 2011; Stanković et al., 2014).

Las MoS<sub>2</sub>-ALA se evaluaron mediante dos métodos, ya que contenían etanol. Los resultados de la Figura 7 y Figura 8 muestran porcentajes similares de oxidación entre sí. Las MoS<sub>2</sub>-ALA obtuvieron los porcentajes más altos de inhibición con 100% en sus respectivas concentraciones más altas en ambos ensayos de ABTS y DPPH. Sin embargo, en las subsecuentes diluciones se obtuvieron menores porcentajes en el ensayo DPPH en comparación con el ensayo ABTS. Mientras que para las MoS<sub>2</sub> b-ALA, las cuales estaban suspendidas en un medio con la proporción 80% etanol:20% glicerol, no hubo cambios entre un método y otro. Debido a que las MNPs de MoS<sub>2</sub>-ALA necesitaban mayores estudios de caracterización al momento de realizar los ensayos, no se conocía la concentración sino hasta después de concluir la parte experimental, es por eso que los valores numéricos de las NPs de MoS<sub>2</sub>-ALA pueden parecer arbitrarios y no comparables entre sí. Adicionalmente, el glicerol añade viscosidad al medio en el cual están suspendidas las MoS<sub>2</sub> b-ALA, es probable que al momento de pipetear dicha muestra contengan una

cantidad más baja de NPs, además de la ya baja concentración utilizada, y por ende se obtienen porcentajes de inhibición más bajos. La concentración de ALA presente en la solución de síntesis de las NPs de MoS<sub>2</sub>-ALA fue de 0.08 mM al momento de sintetizarlas, sin embargo al momento de la síntesis no se calculó la cantidad de ALA presente en la superficie de las NPs de MoS<sub>2</sub>-ALA, por lo que no se podría aseverar que la capacidad antioxidante sea obra del ALA. Por último, los resultados de capacidad antioxidante de las NPs de MoS<sub>2</sub> a-ALA probablemente se deben al uso de una concentración más alta de 156 µg/mL como por acción de las NPs de MoS<sub>2</sub> por sí solas ya que un estudio con NPs de MoS<sub>2</sub> reporta que a una concentración de 100 µg/mL fueron capaces de proteger a cardiomiocitos H9c2 de daño por estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, así como promover la proliferación de las células (Gao et al., 2020).

Los puntos cuánticos de carbono (CD) y los puntos cuánticos de carbono conjugados con lactoferrina (CD-LF) presentan un porcentaje de inhibición de oxidación dependiendo de la concentración. Se esperaba que los CD-LF obtuvieran un mayor porcentaje, por la adición de LF en su superficie, un agente con actividad antioxidante reportada en modelos de NASH (Farid et al., 2021). Sin embargo, se puede apreciar que los CD sin LF obtuvieron un mayor porcentaje de inhibición. Una posible explicación es que los CD son sintetizados a partir de ácido cítrico, el cual tiene capacidad antioxidante (Abdel-Salam et al., 2016), lo cual les otorga grupos carboxilo (-COOH) conjugados en la superficie. Los grupos -COOH ayudaban a formar un enlace amida para que se uniera la lactoferrina a los CD, sin embargo, al dejarlos expuestos y sin conjugar, los grupos carboxilos tienen capacidad de neutralizar radicales libres catiónicos (Sachdev and Gopinath, 2015; Xu et al., 2020). El hecho de que haya obtenido un menor porcentaje de inhibición de oxidación con CD-LF por la falta de grupos carboxilo en la superficie demuestra que efectivamente los CD-LF están funcionalizados con LF. Con base en los resultados del ensayo ABTS, se aprecia que todos los grupos de MNPs-ALA, CD y CD-LF evaluados tienen una respuesta dependiente de la concentración para inhibir al radical ABTS<sup>•+</sup> oxidado con KPS.

El ensayo de remoción de óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) mediante el nitroprusiato de sodio y el reactivo de Griess permiten evaluar la capacidad de las nanopartículas para eliminar el NO<sup>•</sup>. El principio de funcionamiento se basa en la reacción de Griess y la presencia de NO<sup>•</sup>. El SNP es un agente que produce NO<sup>•</sup>, el cual reacciona con el reactivo de Griess para generar un complejo de color rosa-rojizo. La presencia de agentes con capacidad de eliminar el NO<sup>•</sup> causa una interrupción en la formación del complejo por lo que se aprecia una reducción en las lecturas de D.O. medidas a 540 nm (Kavoosi and Amirghofran, 2017). Uno de los mediadores de la fisiología hepática es el óxido nítrico (NO<sup>•</sup>). Entre los productores de NO<sup>•</sup>, dos tipos de sintasas de óxido nítrico (NOS) destacan en la biología hepática: las NOS endoteliales (eNOS) y las NOS

inducidas (iNOS). Las eNOS mantienen la homeostasis del hígado e inhiben condiciones patológicas, además de ser mayormente producidas en las células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSECs). Por otro lado, las iNOS pueden ser producidas por casi todas las células hepáticas, incluidas las HSCs. El problema es que las iNOS son la fuente de uno de los factores contribuyentes al daño hepático: las especies reactivas de nitrógeno (RNS), las cuales pueden ocasionar daño al ADN, lípidos y a proteínas (Iwakiri and Kim, 2015). Por lo tanto se espera que la capacidad de las NPs para disminuir el  $\text{NO}^*$  ayude a la resolución de la NASH.

Los resultados con las AgNPs-ALA, CD y CD-LF nuevamente muestran una respuesta dependiendo la concentración. El porcentaje de remoción de  $\text{NO}^*$  más alto obtenido por las AgNPs-ALA fue de 50% a una concentración de 175  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de 22% a 37.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como se puede apreciar en la Figura 10. Mientras que los CD y CD-LF a una concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  obtuvieron una remoción de  $\text{NO}^*$  de 13% y 26%, respectivamente, como se puede apreciar en la Figura 12. Sin embargo, al momento de evaluar al grupo de  $\text{MoS}_2$ -ALA se obtuvieron lecturas directas del espectrofotómetro de placas de D.O. mucho más elevadas con respecto al control. A simple vista los datos podrían suponer que hubo un aumento en la producción de  $\text{NO}^*$ , sin embargo, al momento de realizar el cálculo del porcentaje de remoción de  $\text{NO}^*$  mostrado en la ecuación (2), la cual involucra restar el valor del blanco, se obtuvieron porcentajes más congruentes en  $\text{MoS}_2$  a-ALA. En el caso de  $\text{MoS}_2$  b-ALA parece que la presencia de glicerol ocasionó que los pozos se volvieran turbios y por lo tanto no se pudo obtener una medición confiable.

La importancia de reducir tanto las ROS como las RNS se debe a que el  $\text{NO}^*$  es capaz de reaccionar rápidamente con las ROS y a su vez producir aún más RNS. Los productos de dichas reacciones inician nuevas reacciones de radicales que provocan daños a las biomoléculas, cambia la permeabilidad de la membrana celular y daño al ADN (Bedlovičová et al., 2020). Se ha reportado en estudios previos que el ALA tiene efectos hepatoprotectores en ratas a través de la disminución de  $\text{NO}^*$  debido a que ALA redujo los niveles de mRNA y de la proteína de iNOS (Tanaka et al., 2015). Dados los resultados reportados en la Figura 10 es posible elucidar que las AgNPs-ALA puedan tener una respuesta anti-inflamatoria asociada a la disminución de iNOS en un modelo *in vivo*. Mientras que los resultados en la Figura 12 muestran que los CD-LF removieron una mayor cantidad de  $\text{NO}^*$ , datos que coinciden con otros estudios que reportan la capacidad antioxidante de la LF en ratas (Farid et al., 2021). Usman et al. (2020) reporta que los CD sintetizados de ácido cítrico no producen  $\text{NO}^*$ . También menciona que los CD sintetizados de ácido cítrico confieren una carga negativa debido a los grupos  $-\text{COOH}$  en su superficie y no reaccionarían fácilmente con el radical neutro  $\text{NO}^*$ , lo cual podría justificar los porcentajes de remoción de  $\text{NO}^*$  más bajos en CD (Radi, 2018).



Una vez obtenidos los resultados de capacidad antioxidante y de remoción de  $\text{NO}^*$ , el siguiente paso fue evaluar si las concentraciones son citotóxicas para cultivos celulares. Por lo tanto, realizamos de manera preliminar el ensayo de viabilidad celular *in vitro* mediante el reactivo MTT. El ensayo MTT es utilizado para medir la actividad metabólica como un indicador de viabilidad, proliferación y citotoxicidad.

La Figura 13 muestra los porcentajes de viabilidad celular que obtuvimos con todas las concentraciones de las NPs disponibles en este proyecto en la línea celular de fibroblastos de ratón L929. Todas las concentraciones de AgNPs-ALA y todas las concentraciones de CD y CD-LF lograron obtener porcentajes por encima del 70%. Por lo tanto, de acuerdo con lo establecido en la ISO-10993-5 "Evaluación biológica de dispositivos médicos. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro*", no las consideramos como citotóxicas y las utilizamos en ensayos subsecuentes. Estudios muestran que las AgNPs-ALA no presentan citotoxicidad en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) hasta concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Hajtuch et al., 2022). Mientras que estudios con CD muestran que en células HUVEC, HepG2 y MCF-7 concentraciones de hasta 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mantienen los porcentajes de viabilidad celular arriba del 90% (Zheng et al., 2015) y en macrófagos RAW 264.7 se mantienen arriba de 80% a 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Usman et al., 2020). Sin embargo las  $\text{MoS}_2$ -ALA presentaron los porcentajes de viabilidad celular más bajos entre todas las NPs evaluadas. Cabe mencionar que al momento de evaluar la viabilidad celular se diluyeron las concentraciones iniciales de  $\text{MoS}_2$  a-ALA y  $\text{MoS}_2$  b-ALA por 50, 20 y 10 veces de sus respectivas soluciones madre. Aunado al hecho de que las NPs contenían etanol, no se encontraron antecedentes de viabilidad celular con  $\text{MoS}_2$  conjugadas con ALA. Todas las concentraciones obtuvieron resultados por debajo del 70%. Los más bajos fueron aquellos con  $\text{MoS}_2$  b-ALA, que contenían glicerol. El propósito del glicerol era evitar la aglomeración de las NPs por medio de ablación láser, esto para lograr una síntesis más eficaz. En el aspecto biológico, se pensaba que el glicerol podría evitar la aglomeración de NPs y distribuirlas de manera homogénea en un medio acuoso. Sin embargo, el glicerol también suele utilizarse para evitar la formación de cristales de hielo intracelulares en la criopreservación celular. Ya que las células no fueron criopreservadas, es posible que las concentraciones de soluto intracelular hayan aumentado y ocasionado la muerte de la mayoría de las células (Whaley et al., 2021). En futuras aplicaciones se podría liofilizar las  $\text{MoS}_2$ -ALA para remover el solvente de etanol o etanol:glicerol y resuspenderlas en medio de cultivo. Tomando en cuenta todos los resultados, decidimos descartar las  $\text{MoS}_2$ -ALA para futuros ensayos y solo proceder con las AgNPs-ALA, CD y CD-LF.

Debido a que  $\text{TGF-}\beta 1$  es uno de los mayores contribuyentes a la transdiferenciación de las células estrelladas hepáticas (HSC) y perpetuador del estado de inflamación crónica (Dewidar et al., 2019; Zhang et al., 2021), se realizó un ensayo reportador de SEAP asociadas a la activación de la vía de señalización de

TGF- $\beta$  con la línea celular HEK-Blue TGF- $\beta$ . Dicha línea celular fue generada mediante una transfección estable de células HEK293 con genes humanos TGFBR1, Smad3 y Smad4. Las células también expresan un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) bajo el control del promotor mínimo de  $\beta$ -globina fusionada a tres elementos de unión a Smad3/4 (SBE). La estimulación de la línea celular HEK-Blue TGF- $\beta$  con TGF- $\beta$  induce la activación de la vía de señalización dependiente de las Smad, efecto que lleva a la formación del complejo Smad3/Smad4. Este heterocomplejo entra al núcleo y se une a los sitios SBE lo cual induce la producción de SEAP (Figura 4). La cantidad de SEAP secretada en el sobrenadante puede ser medida en un ensayo colorimétrico utilizando la solución QUANTI-Blue, un reactivo de detección de SEAP, mediante un espectrofotómetro de placas (InvivoGen, 2022).

Como se puede apreciar en la Figura 14, ninguna de las concentraciones de AgNPs-ALA logró disminuir la producción de SEAP relacionada a la activación de la vía canónica de TGF- $\beta$  de manera significativa. A su vez, ninguna de las concentraciones fue citotóxica para las células HEK-Blue TGF- $\beta$ . Mientras que en la Figura 15 solo la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CD-LF logró cambios significativos. A la par se analizaron las concentraciones equivalentes de LF de las tres concentraciones de CD-LF evaluadas, de las cuales las dos concentraciones más bajas de LF lograron diferencias significativas. Las células HEK-Blue se mantuvieron por encima del 70% de actividad metabólica, evidenciado por los resultados del ensayo MTT. Como se aprecia en la Figura 4, la vía canónica de activación de TGF- $\beta$  es dependiente de la familia de las proteínas SMAD. Cuando TGF- $\beta$  llega a su receptor, SMAD2/3 es fosforilado, lo cual llama a la SMAD reguladora conocida como SMAD4. El complejo SMAD2/3 junto con SMAD4 es entonces capaz de traslocar al núcleo y habilitar la expresión de los genes correspondientes, entre ellos TGF- $\beta$ 1. Estudios previos han demostrado que ALA es capaz de intervenir en la vía de señalización y disminuir la expresión de la proteína SMAD3 fosforilada, por lo tanto se reducen los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 en un modelo de ratas con cirrosis inducida (G. Liu et al., 2019). En otro estudio se utiliza lactoferrina en ratones con fibrosis hepática y propensos a lupus con lo que logran reducir la expresión de la proteína SMAD2/3 fosforilada (H. A. Chen et al., 2016). Por lo tanto, los resultados del ensayo indicador de SEAP mediante QUANTI-BLUE indican que las AgNPs-ALA y CD-LF no son capaces de intervenir en la vía de señalización de TGF- $\beta$  *in vitro* bajo las condiciones en las cuales las evaluamos y podrían necesitar de un microambiente *in vivo* para evitar la fosforilación de la proteína SMAD2/3. Una posible recomendación a futuro con este ensayo sería utilizar un inhibidor de la vía de señalización de TGF- $\beta$ , usando el galunisertib (LY2157299) como control positivo y valor de referencia para cuantificar la capacidad de intervención en la vía de señalización de TGF- $\beta$ .

Los ensayos de ABTS, remoción de NO\*, MTT y el indicador de SEAP funcionaron como un cribado para seleccionar las NPs y concentraciones a utilizar en futuros ensayos. Ya culminada esta parte, procedemos

a realizar ensayos en células hepáticas. Las células estrelladas hepáticas humanas (HHSC) son las principales células involucradas en el progreso del daño hepático y de la fibrosis hepática en enfermedades crónicas como NASH. Las HHSC provenientes de donadores con la enfermedad NASH (HHSC-N) presentan un fenotipo de HHSC transdiferenciadas o activadas, lo cual incluye niveles de expresión elevados de genes profibróticos y producción de citocinas relacionadas con un perfil inflamatorio (Zisser et al., 2021). Antes de proceder con ensayos de expresión de genes y detección de citocinas, fue necesario evaluar la viabilidad celular de las NPs seleccionadas en HHSC-N.

La Figura 16 muestra que todas las concentraciones de AgNPs-ALA lograron mantener la actividad metabólica de las HHSC-N arriba del 70% hasta por 72 h. A la fecha no hay estudios de viabilidad celular que utilicen AgNPs conjugadas con ALA en HSCs. Hay estudios que demuestran que las AgNPs, sin conjugar, en HSCs de ratas tienen un efecto citotóxico dependiendo de la concentración y del tamaño de las nanopartículas. Los resultados muestran que las AgNPs, a tamaños de 10 nm y a concentraciones de hasta 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inducen apoptosis de las HSC, mientras que tamaños más grandes de 30-50 nm inducen necrosis a bajas concentraciones, y apoptosis en concentraciones cercanas a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y en ensayos de hasta 96 h (Sun et al., 2013). La capacidad citotóxica de las AgNPs también ha sido reportada como agente antitumoral en varios estudios. Un estudio realizado por An et al. (2021) sobresale, ya que trataron células pancreáticas humanas cancerosas con AgNPs de 9.04 nm a concentraciones de 0.7, 1.4 y 2.1 partes por millón (PPM) y 0.5 mM y 1mM de ALA. Los resultados demostraron que las AgNPs lograron inducir apoptosis en las células cancerosas. Sin embargo, las AgNPs disminuyeron los porcentajes de viabilidad en células benignas, entre ellas la línea celular humana LX-2 de HSC. No obstante, los autores añadieron ALA a los medios de cultivo de las células para abolir la citotoxicidad en células benignas como las HSC pero se mantuvo el efecto citotóxico en células cancerosas. Los autores mencionan que el ALA tiene la capacidad de formar complejos con las AgNPs debido a las propiedades quelantes del ALA, de manera que un cotratamiento con ALA ayuda a disminuir la internalización de AgNPs en células benignas pero no en células pancreáticas (An et al., 2021). Con base en los trabajos previamente citados, se puede corroborar que las AgNPs-ALA utilizadas en nuestro proyecto no presentan citotoxicidad.

Los CDs se han reportado en años recientes en aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad y baja citotoxicidad. Algunos de los puntos cuánticos basados en carbono son los CDs, los puntos cuánticos de grafeno (GQD) y los puntos cuánticos de óxido de grafeno (GOQDs) (Devi et al., 2019; Huang y Tang, 2021). Estudios reportan el uso de CDs conjugados con ácido hialurónico (HA) para la entrega dirigida a HSC-T6 y a células HepG2 como un sistema de entrega de fármacos, los cuales prevalecían en el hígado fibrótico hasta 8 días después y fueron removidos en 3 días por el hígado sano sin ocasionar daño (Kim et

al., 2010). Otro estudio utiliza GQD a concentraciones entre 1-1000  $\mu\text{g}/\text{L}$  en la línea celular LX-2 de HSCs, en donde demuestran que los GQD tienen un efecto despreciable en las HSCs (Chen et al., 2022). Como se aprecia en la Figura 17 y Figura 18 también se corrobora la baja citotoxicidad presentada por los CDs en las células tratadas con la mayoría de las concentraciones, con la excepción de la más alta de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo cual se puede deber a que solo una quinta parte de la solución final era de medio de cultivo en ambos casos, ya que la solución madre de la cual se realizaron las diluciones era de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La LF parece haber incrementado los porcentajes de viabilidad de las HHSC-N en todos los casos, probablemente atribuido a sus capacidades anti-oxidantes y anti-inflamatorias (Farid et al., 2021).

Finalmente, también se realizaron experimentos de viabilidad celular en hepatocitos de carcinoma HepG2, los cuales son una alternativa a hepatocitos primarios por retener la mayoría de las funciones de hepatocitos primarios pero en una línea celular inmortalizada (Donato et al., 2015; Jennen et al., 2010).

Como se aprecia en la Figura 19, la viabilidad celular es dependiente de la concentración en células HepG2. El ALA no podría ser el mayor contribuyente a esta disminución en viabilidad, ya que tiene potencial de proteger ante estrés oxidativo y promover la expresión de glutatión, otro anti-oxidante, en HepG2 (Xu et al., 2015). También tiene la capacidad de inducir la expresión de la lipasa de triglicéridos adiposos, lo cual ayuda a disminuir los lípidos intracelulares y a la resolución de la NASH (Kuo et al., 2012). Una posible explicación sería la naturaleza de la plata de las AgNPs-ALA y su posible acumulación intracelular en las vesículas de las HepG2, causando autofagia e inflamación (Mishra et al., 2016).

Por lo tanto, los resultados de viabilidad celular en HHSC-N nos permitieron descartar las concentraciones de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 37.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AgNPs-ALA, mientras que de CD y CD-LF se descartó la concentración de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en futuros ensayos de expresión de genes y detección de citocinas solubles.

Una vez determinadas las NPs y concentraciones a evaluar mediante todos los ensayos previamente mencionados, se procedió a realizar los co-cultivos con HHSC-N y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Las PBMCs son células del sistema inmunitario con núcleo redondo y consisten principalmente de linfocitos (células T, B o NK) así como monocitos. Aproximadamente el 80% de las células encontradas en las PBMCs son linfocitos-T y 10% monocitos, las cuales tienen la capacidad de secretar citocinas al medio sobrenadante en la presencia de un estimulante. La combinación de 4-alfa-forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e ionomicina estimula a las PBMCs para producir citocinas, proteínas que participan principalmente en la regulación de respuestas inmunológicas e inflamatorias. El perfil de estos mensajeros puede influir en la diferenciación de linfocitos T vírgenes a un determinado tipo de

linfocitos T colaboradores (Th) (Ai et al., 2013). Para separar los linfocitos de la sangre periférica se utilizó Lymphopure™ ( $d=1.077 \pm 0.001$  g/mL), la cual es una solución filtrada lista para utilizarse y se emplea para el aislamiento de células mononucleares de una suspensión de células. La solución forma un gradiente de densidad que permite la separación de las células mononucleares de otras células tales como granulocitos y eritrocitos, los cuales se sedimentan después de la centrifugación (Böyum, 1968). Se decidió utilizar sangre de donadores masculinos, ya que la sangre de donadores femeninos podría proveer inconsistencias en los resultados debido al perfil hormonal de las mujeres dependiente de la edad y el ciclo menstrual (Klein and Flanagan, 2016). Cabe mencionar que las PBMCs se extraen y se utilizan en el mismo día, ya que, además de ser un cultivo primario, puede cambiar la respuesta en la producción de citocinas si se trabajase uno o días después de la extracción.

Las reacciones de PCR en Tiempo Real (qPCR) dan un resultado que permite cuantificar y evaluar la calidad de los productos amplificados a través de una gráfica que monitorea la respuesta de amplificación de cada gen a través de cada ciclo, de manera que al final se observe una curva sigmoidea. Al final de los ciclos también se monitorea una curva de desnaturalización que permite visualizar el tamaño del producto para asegurarse que corresponda al amplicón de interés y que la señal no tenga ruido de algún otro producto o contaminación en la muestra.

Se realizó un estudio bioinformático de cada una de las secuencias de oligonucleótidos mediante múltiples herramientas disponibles en línea. Algunas de las acciones que destacan son:

- Primer BLAST mediante el portal de NCBI (análisis de E-Value, especificidad para la especie de interés, porcentaje de cobertura, tamaño y ubicación del amplicón).
- Presencia de homodímeros y heterodímeros (si hay, que los valores de  $\Delta G$  sean mayores a -9.0), temperatura de alineamiento ( $T_m$ ), porcentaje de citosinas y guaninas (%CG) y longitud de los primers con Thermo Fisher Multiple Oligo Analyzer y OligoAnalyzer Tool de IDT
- Predicción de las curvas de desnaturalización mediante el programa en línea uMelt Quartz

Antes de iniciar con los tratamientos con NPs se registraron los niveles de referencia de expresión génica ante circunstancias con HHSC-N en monocapa, HHSC-N co-cultivadas con PBMCs estimuladas y sin estimular. La Figura 20 muestra que tan solo la presencia de las PBMCs estimuladas o no modifica los niveles de expresión relativa en todos los genes.

Los niveles de ACTA2 y COL1A1 se redujeron en mayor medida, en aproximadamente un 25% y 30%, respectivamente, en presencia de PBMCs activadas. ACTA2 es el gen encargado de producir la actina de músculo liso tipo alfa ( $\alpha$ -SMA) en las HSC.  $\alpha$ -SMA es considerado un marcador de transdiferenciación o activación hacia el fenotipo de células tipo miofibroblasto asociadas al progreso de fibrosis, las cuales producen excesivamente proteínas de matriz extracelular (ECM), como Colágeno tipo I, cuyo gen asociado es COL1A1 (de Minicis et al., 2007). Por lo tanto, la disminución de ambos genes por obra de las PBMCs estimuladas, y sin tratamiento, es un indicador de la mejora por obra de las citocinas producidas. Tomando en consideración las citocinas producidas, es posible que haya aumentado la inducción de dos genes asociados a citocinas involucradas en la respuesta inflamatoria, PDGFRB y especialmente TGFB1, cuya expresión relativa se vio aumentada en 1.05 veces en presencia de PBMCs estimuladas. TGFB1 es uno de los principales genes asociados a la activación de las HSC, no obstante, la citocina factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) cumple múltiples funciones en el cuerpo humano, entre ellos inducir apoptosis, mantenimiento de ECM y evitar la formación de tumores (Derynck and Budi, 2019). Acoplado con el hecho de que los niveles de expresión del marcador de activación ACTA2 fueron reducidos, es posible que las HHSC-N a las 24 h presenten una respuesta inflamatoria en progreso a la resolución. Por último, los niveles de TIMP1 aumentaron a 1.13 veces en presencia de PBMCs estimuladas. TIMP1 es el gen encargado de producir el inhibidor tisular de metaloproteinasas 1, cuya función es inhibir la capacidad de las metaloproteinasas (MMPs) de degradar las proteínas de ECM como Colágeno I. Y como puede apreciarse en la Figura 20, la producción de COL1A1 disminuyó en presencia de PBMCs estimuladas. Con base en los resultados, las PBMCs, de donadores sanos, estimuladas con PMA e ionomicina en co-cultivo con HHSC-N pueden modular la expresión de genes. Por otro lado, un estudio por Gupta y colaboradores muestra que el sobrenadante de PBMCs infectadas con el virus de inmunodeficiencia humano (HIV-1) también logra modular la actividad fibrogénica de las HSC (Gupta et al., 2014).

Una vez determinado el utilizar PBMCs estimuladas para los co-cultivos, lo siguiente que hicimos fue evaluar la capacidad de los tratamientos con NPs a concentraciones que no indujeran citotoxicidad en las HHSC-N, para disminuir los niveles de expresión sin presencia de las PBMCs estimuladas. Como se aprecia en la Figura 21, los tratamientos con NPs no lograron diferencias significativas en la mayoría de los niveles de expresión de los genes profibróticos, evaluados mediante qPCR. Esta respuesta indica que los tratamientos de NPs no tienen un efecto directo significativo en los niveles de expresión de genes profibróticos por sí solas, lo cual sugiere que la presencia de las citocinas secretadas por las PBMCs estimuladas es necesaria para progresar en la respuesta inflamatoria presentada por la enfermedad NASH. Como ya se comprobó que las PBMCs estimuladas modulan la expresión de genes profibróticos, los datos presentados en la Figura 22 y Figura 23 muestran los datos de expresión génica relativa del co-cultivo de

HHSC-N y PBMCs estimuladas junto con los tratamientos de NPs a las 24 h y a las 72 h, respectivamente. En el caso de ACTA2 todos los niveles no cambiaron en gran medida a las 24 h con todos los tratamientos, pero a las 72 h se aprecia una disminución de hasta 40%, 25% y 50% con tratamientos de AgNPs-ALA, CD y CD-LF, respectivamente. Favez y colaboradores utilizaron 60 mmol/kg de ALA por 5 días en ratas Wister albino a las cuales se les indujo daño hepático por metotrexano. Los niveles de ACTA2 detectados en el tejido hepático fueron reducidos de un nivel de expresión relativa de  $3.8 \pm 0.25$  (dañado) a  $2.3 \pm 0.21$  (tratado con ALA), es decir una reducción del casi 40% (Favez et al., 2018). Otro estudio con lactoferrina muestra una reducción de hasta un 37% en los niveles de expresión de ACTA2 en ratas Sprague Dawley con daño hepático inducido por dimetilnitrosamina (DMN) que fueron tratadas con 100 mg/kg de LF por 4 semanas (Tung et al., 2014). Por lo tanto, los niveles de expresión obtenidos son similares en nuestra implementación *in-vitro* a las 72 h.

Mientras que los resultados de COL1A1 se vieron aumentados a las 24 h hasta casi 2.0 veces con 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CD-LF en la Figura 22 c. Sin embargo, en la Figura 23 se aprecia que todos los niveles de expresión de COL1A1 disminuyeron hasta en un 60% con CD y CD-LF. Por otro lado, no se presentaron diferencias significativas con AgNPs-ALA. Sin embargo, hay reportes del ALA reduciendo los niveles de expresión de COL1A1 en tejidos de hígados con daño inducido por tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) de ratas Sprague-Dawley a una concentración de 100 mg/kg de ALA después de 8 semanas de tratamiento (G. Liu et al., 2019). Si comparamos las 8 semanas de tratamiento con las 72 h evaluadas en nuestro estudio, la diferencia de tiempo es amplia, lo cual podría explicar porque no apreciamos diferencias significativas en nuestro estudio. Mientras que en el mismo estudio por Tung y colaboradores logran reducir los niveles de expresión de COL1A1 a los niveles de referencia de hígados sin daño (Tung et al., 2014). Otros estudios reportan una disminución de COL1A1 en un modelo murino con NASH al utilizar extractos de almeja por 21 semanas (Watanabe et al., 2016). También se debe tener en cuenta los niveles de expresión de TIMP1, ya que están correlacionados con los de COL1A1. Como se mencionó previamente, TIMP1 inhibe la degradación de proteínas de ECM como COL1A1. Como se puede apreciar en la Figura 22, los niveles de expresión de TIMP1 no se ven afectados en gran medida por los tratamientos de NPs, salvo con las CD-LF que a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se ve disminuido el nivel de expresión en aproximadamente un 40% mientras que a una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se apreció un aumento de 21.9%, lo cual podría explicar porque se aprecia una respuesta similar en COL1A1 con CD-LF a las 24 h, en donde la concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  obtuvo también una disminución del 40% mientras que la concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aumentó en un 91% los niveles de expresión de COL1A1. Por otro lado, a las 72 h se aprecia una disminución en los niveles de expresión de TIMP1 en co-cultivos tratados con CD y CD-LF que se pueden correlacionar con la disminución de los niveles de expresión de COL1A1, ya que ambos genes mantienen en un rango similar

de disminución entre el 70% y 40% en los niveles de expresión relacionados a la concentración utilizada. Sin embargo, las AgNPs-ALA brindaron valores sin diferencias significativas, por lo tanto no se puede aseverar un resultado certero en la disminución de los niveles de expresión relativa de genes profibróticos. Por lo tanto, los niveles obtenidos de expresión relativa de ACTA2, COL1A1 y TIMP1 en co-cultivos tratados con CD y CD-LF en nuestro experimento muestran una respuesta prometedora para coadyuvar en el progreso de la NASH al disminuir los niveles de expresión de genes profibróticos.

Mientras que PDGFRB y TGFB1 son dos genes importantes asociados con la proliferación, diferenciación y migración de células estrelladas hepáticas. Las citocinas factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y TGF- $\beta$ 1 pueden ser secretadas por los macrófagos o linfocitos T cooperadores (Th) y son capaces de transdiferenciar las HSC a células tipo miofibroblastos y por ende estimulan la producción y depósito de colágeno. Además de ambos ser mediadores de la respuesta inflamatoria. El gen PDGFRB expresa el receptor en la superficie de las HSC que se puede unir a su ligando, la citocina PDGF- $\beta$ , mientras que el gen TGFB1 produce la citocina TGF- $\beta$ 1, la cual en un ambiente proinflamatorio suele participar como una citocina reguladora. La producción regular de dichas citocinas no es necesariamente dañina al hígado, ya que señalizan a las HSC a reparar daño presentado a la matriz celular con la producción de proteínas. Sin embargo, en ciertas enfermedades donde hay producción de ROS y NOS, dichas citocinas son expresadas excesivamente, lo cual lleva a las HSC a ser activadas o transdiferenciadas (Ghoreschi et al., 2003; Hammerich and Tacke, 2014; Veldhoen and Stockinger, 2006). Ya que las HSC expresan receptores de TGF- $\beta$ 1 y PDGF en su superficie, las citocinas llegan a la superficie y promueven la proliferación y transdiferenciación de las HSC. Las HSC activadas también son capaces de producir TGF- $\beta$ 1, lo cual crea una respuesta autócrina, un ciclo que sigue promoviendo la proliferación y activación de las HSC, y por ende promoviendo un estado de inflamación crónica. Otra característica de las enfermedades hepáticas crónicas es la muerte de los hepatocitos, los cuales al momento de morir por apoptosis o necrosis liberan cantidades de TGF- $\beta$ 1 en su interior hacia los macrófagos, linfocitos Th y HSCs (Dewidar et al., 2019; Foo et al., 2011; Higashi et al., 2017b; Ying et al., 2017). Múltiples reportes demuestran que tratamientos con ALA o LF logran reducir los niveles de expresión de PDGFRB y/o TGFB1 en una línea celular inmortalizada de rata HSC-T6 con tratamientos de ALA (Foo et al., 2011) o con LF en modelos de NASH o daño hepático en ratas (Aoyama et al., 2022; Tung et al., 2014). Sin embargo, nuestros resultados presentados en la Figura 22 y Figura 23 parecen haber incrementado la expresión de TGFB1 y PDGFRB, lo cual parece lograr el efecto contrario a lo que esperabamos. Los niveles de expresión de PDGFRB parecen haber disminuido en promedio pero el valor del SEM indica un nivel de incertidumbre mayor que en otros genes para dar conclusiones concretas. Sin embargo, una posible razón por la cual se ve aumentada la producción de TGF- $\beta$ 1 se puede deber a las múltiples funciones que ejerce la citocina a diversos niveles moleculares. TGF- $\beta$ 1



es la principal citocina involucrada en la transdiferenciación de las HSC a células tipo miofibroblasto en el hígado, pero también cumple funciones como la inducción de la apoptosis, así como capacidades anti-tumorigénicas. El hecho de que una citocina pueda tener funciones diferentes, lo cual depende de los receptores y de la línea celular a la cual esté afectando, se conoce como pleiotropismo, por lo que la expresión aumentada bajo las condiciones de un nicho podría indicar múltiples eventos celulares (Derynck and Budi, 2019; Dewidar et al., 2019; Mikula et al., 2006). Por ejemplo, se podría estar estimulando la vía de apoptosis de las HHSC-N a las 72 h lo cual podría explicar los niveles altos de TGF- $\beta$ 1 y la disminución en la expresión de ACTA2, COL1A1 y TIMP1. Esta teoría es considerada ya que los co-cultivos contenían una gran cantidad de células por pozo en una placa de 6 pozos, con 300,000 HHSC-N y 3,600,000 PBMCs, una relación de cultivo tomada y modificada de la literatura (Beringer et al., 2019; Doumba et al., 2013). Mientras que las PBMCs son células no adherentes en su mayoría (ya que los monocitos pueden ser diferenciados a macrófagos), la cantidad de medio de cultivo disponible presenta una competencia entre las células por aprovechar los nutrientes para subsistir. Dichos inconvenientes no se presentan en un modelo *in-vivo* en donde hay un flujo constante de nutrientes para subsistir a las células mediante el flujo sanguíneo del animal de prueba, a diferencia del cambio de medio necesario en modelos *in-vitro*, lo cual se llevaría consigo las citocinas producidas en el sobrenadante del pozo. Eso también podría explicar porque la mayoría de los estudios referenciados y encontrados en la literatura son con modelos *in-vivo* de ratas o ratones. Otro detalle es que el microambiente hepático, además de contener HSCs y PBMCs, consta de más células como hepatocitos, células Kupffer y células endoteliales para coadyuvar en la respuesta a daño hepático. En recientes reportes se ha logrado la formación de organoides 3D con más células hepáticas, en donde hepatocitos, HSCs, células endoteliales y células de Kupffer logran la formación de una estructura esferoide con mayor estabilidad celular y resultados más integrativos que asemejan de mejor manera la respuesta hepática para probar nuevos agentes terapéuticos para combatir el progreso de la fibrosis e inflamación crónica en enfermedades como la NASH (Leite et al., 2016; Mandon et al., 2019; Mannaerts et al., 2020; Mulligan et al., 2019).

Finalmente, detectamos las citocinas solubles en los medios de cultivo de cada uno de los pozos de co-cultivos que fueron evaluados por qPCR por medio de citometría de flujo. La citometría de flujo es una técnica cuyo principio de funcionamiento es el esparcimiento de luz y la emisión de fluorescencia por células marcadas con sondas o anticuerpos fluorescentes específicos al pasar por un punto en donde incide un haz láser (Manohar et al., 2021). También es posible marcar otros componentes para su posterior evaluación por citometría de flujo, en este caso las citocinas. Las citocinas pueden detectarse experimentalmente mediante tinciones intracelulares o captándolas en el sobrenadante de cultivo celular. Por lo tanto, el medio de cultivo de todos los co-cultivos HHSC-N y PBMCs, junto con las monocapas de

HHSC-N, fueron evaluados mediante el kit de detección de citocinas Multi-Analyte Flow Assay Kit HU Th Cytokine Panel (12-plex) w/ FP V02 LEGENDplex® con el cual es posible detectar y cuantificar la presencia de 12 citocinas de manera simultánea con una sola muestra.

En la Figura 24 se aprecian los niveles de referencia de las 12 citocinas evaluadas bajo diferentes condiciones. Realizamos este ensayo primero para detectar las citocinas que son producidas por las HHSC-N sin ayuda de las PBMCs, los niveles de referencia de las PBMCs estimuladas o no con PMA y ionomicina, conocer si las HHSC-N pueden estimular la producción de citocinas en las PBMCs y finalmente las concentraciones de citocinas del co-cultivo con HHSC-N y PBMCs estimuladas. Los resultados muestran que efectivamente hay citocinas que son producidas regularmente por las HHSC-N como interleucina (IL)-6 en gran medida, IL-5 e IL-10. La mayoría de las citocinas no son producidas, o son producidas en menor medida, por las PBMCs estimuladas o no, con excepción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que es expresado en mayor medida en PBMCs estimuladas. Mientras que en los co-cultivos se aprecia que citocinas como IL-13, IL-5, IL-10, IL-6, IL-17F, IL-4 e IL-22 se encuentran en mayor concentración con PBMCs sin estimular pero disminuyen en el co-cultivo cuando las PBMCs son estimuladas. Por otro lado, las citocinas IL-2, IL-9, Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  e IL-17A se ven aumentadas en los co-cultivos en presencia de PBMCs estimuladas. De manera preliminar, nosotros buscábamos que citocinas como IL-4 disminuyeran y que citocinas como IFN- $\gamma$  aumentaran, otra razón por la cual se decidió proceder con PBMCs estimuladas para los co-cultivos.

Para poder darle contexto a los resultados obtenidos es necesario identificar las funciones de cada una de las 12 citocinas detectadas y cuantificadas en este ensayo. Es importante recordar el concepto de pleiotropismo, en donde un agente puede tener una función bajo determinadas circunstancias, pero una modificación a ese ambiente puede cambiar la función principal de dicho agente. Lo mismo sucede con las citocinas, las cuales pueden tener una función anti-inflamatoria en algún tejido u órgano, pero al momento de analizarlas en otro es posible que cumplan una función pro-inflamatoria. Es por eso que para poder catalogar si el aumento o disminución en la concentración es benéfico para la resolución de la NASH se analizará cada uno en un ambiente con daño hepático o con enfermedades crónicas como la NASH.

Como se puede apreciar en la Tabla 6, las citocinas pueden ser producidas por determinados linfocitos CD4<sup>+</sup> colaboradores como Th1, Th2, Th17, Th22 y linfocitos T reguladores (Treg) como parte de la inmunidad adaptativa, los cuales infiltran la parénquima hepática ante el daño hepático. Los linfocitos Th1 cumplen funciones importantes en mediar las respuestas inmunes contra patógenos intracelulares, resistencia a infecciones micobacteriales y la inducción de algunas enfermedades autoinmunes. Los Th1

producen citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 e IL-10. Los linfocitos Th2 contribuyen a la respuesta inmune ante parásitos extracelulares y juegan un papel en la inducción de enfermedades alérgicas. Los Th2 producen citocinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-10, IL-6 y TNF- $\alpha$ . Por otro lado tenemos a los linfocitos Th17, son las responsables de la respuesta inmunológica ante bacterias y hongos, así como las inductoras de enfermedades autoinmunes. Por esta razón producen citocinas que son usualmente conocidas como pro-inflamatorias tales como IL-17A, IL-17F e IL-22. Finalmente también se encuentran los linfocitos Treg, las cuales son críticas para mantener la auto-tolerancia o antígenos propios o foráneos. Algunas de las citocinas producidas por las Treg son IL-10 y TGF- $\beta$  (An et al., 2021).

Las citocinas IL-5 e IL-13 están estrechamente relacionadas con el progreso de la fibrosis hepática, ya que IL-13 es un mediador de la fibrosis. La IL-13 puede inducir directamente la expresión de colágeno I, de  $\alpha$ -SMA y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) en las HSCs, así como también interactuar con la vía de señalización de TGF- $\beta$ 1 para promover la expresión CTGF. La IL-13 está altamente relacionada con la NASH ya que se han encontrado niveles elevados de IL-13 en el suero de pacientes con NASH. También se han encontrado expresado el receptor de IL-13 en biopsias de tejidos de pacientes con NASH (Liu et al., 2012). Mientras que la IL-5 promueve la producción de IL-13 en el hígado en un estudio donde describen que la producción elevada de eosinófilos en el hígado por la infección de Schistosomiasis, por lo que en ratones que no producen IL-5 (KO) no se vieron elevados los niveles de IL-13, se vió una reducción del 40% en el grado de fibrosis y se aumentó la producción de IFN- $\gamma$  (Reiman et al., 2006).

Por otro lado, IL-2 parece tener una relación con pacientes con NASH, ya que un estudio en Taiwan analizó a 123 pacientes con obesidad mórbida, a los cuales se le realizó una biopsia para analizar el tejido hepático por inmunohistoquímica. Los resultados demostraron que el grupo diagnosticado con NASH tenía una mayor presencia del receptor alfa de IL-2 (IL-2RA) a comparación del grupo sin NASH. Por lo tanto, IL-2 puede funcionar como biomarcador para la detección de la NASH (Kao et al., 2021).

La IL-6 es una citocina pleiotrópica, sin embargo, es reconocida como una citocina pro-inflamatoria y está correlacionada con el progreso de enfermedades con inflamación crónica como artritis reumatoide (Murakami et al., 2019). En el hígado también está fuertemente relacionada con la inflamación crónica relacionada a enfermedades y progreso hepático, pero a la vez puede tener propiedades anti-inflamatorias. Estudios demuestran que IL-6 está fuertemente relacionada con la enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) y progreso a la NASH y fibrosis hepática. Pero IL-6 no es la única citocina fuertemente asociada. El TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  también son citocinas pro-inflamatorias relacionadas con la NASH, debido a que promueven el estado de inflamación crónica (Duan et al., 2022). Mientras que otro reporte

menciona el uso de terapias que tienen a determinadas citocinas como blanco de tratamiento en enfermedades con fibrosis hepática. Algunas de ellas ya las mencionamos como IL-13 y TNF- $\alpha$ , los cuales pueden inducir la expresión de genes profibróticos, pero también se agrega a la lista la IL-17 tanto en su isoforma IL-17A e IL-17F, e IL-33 (An et al., 2021). Un estudio con un co-cultivo de HSCs, hepatocitos HepaRG y PBMCs estimuladas demostró que al utilizar un inhibidor de IL-17 y TNF- $\alpha$  se logró reducir los incrementos vistos en citocinas como IL-6, IL-8 y el ligando de quimiocina 20 (CCL20) en las HSCs a comparación de las que no tenían los inhibidores (Beringer and Miossec, 2019). Mientras que la IL-33 es capaz de inducir el fenotipo de linfocitos Th2 asociado a inflamación crónica en el hígado al promover la producción de citocinas inflamatorias como IL-4, IL-5 e IL-13 (S. Y. An et al., 2021). Sin embargo, la citocina IL-4 puede considerarse como pleiotrópica al también presentar propiedades anti-inflamatorias bajo diferentes condiciones (Ghoreschi et al., 2003; Njoku, 2010). Al igual que la citocina IL-5 IL-13, la citocina IL-9 también se encuentra altamente expresada y promueve la fibrosis hepática por infección de Schistosomiasis, además de estar involucrada en enfermedades autoinmunes. Dicho reporte menciona que la neutralización de IL-9 redujo los niveles de inflamación y depósitos de colágeno. No solo eso, también mencionan que tratar HSCs directamente con IL-9 promueve la expresión Colágeno I, III y  $\alpha$ -SMA (Zhan et al., 2019). Otro estudio corrobora esto al reportar que la neutralización de IL-9 con anticuerpos en un modelo murino ayudó a atenuar la activación de las HSCs, pero no solo eso, ya que también disminuyó los niveles de expresión de citocinas como IL-17A, IL-9, TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 y TNF- $\alpha$  a comparación de los ratones que no habían recibido el anticuerpo (Qin et al., 2016).

Sin embargo, no todas las citocinas evaluadas contribuyen al estado proinflamatorio, ya que algunas proveen un efecto anti-inflamatorio en el hígado. IL-10 suprime múltiples mediadores proinflamatorios y controla la infiltración de neutrófilos. También puede inhibir la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-2, IL-6 y TNF- $\alpha$ . Mientras que la deficiencia de IL-10 podría llevar a expresión de  $\alpha$ -SMA y activación de las HSCs (S. Y. An et al., 2021; Duan et al., 2022; Nga et al., 2021). Mientras que IL-22 pertenece a la familia de IL-10, es expresada en enfermedades con inflamación crónica y puede considerarse como pleiotrópica. En hígado es capaz de reducir el contenido de grasa en el hígado, es asociada con protección de la hepatofibrogenesis ya que pueden prevenir la activación de las HSCs y el depósito de colágeno al inducir senescencia en las células tras tratamientos de IL-22 recombinantes pero sin promover la apoptosis (Hammerich and Tacke, 2014). Finalmente se tiene al IFN- $\gamma$ , uno de los mayores protectores de la fibrosis hepática. IFN- $\gamma$  tiene la capacidad de promover la producción de SMAD7, uno de los inhibidores en la vía de señalización de TGF- $\beta$ 1 mediada por las SMADs, ya que SMAD7 se une a SMAD2/3 para formar un complejo que inhibe la traslocación hacia el núcleo y por lo tanto inhibe la producción de TGF- $\beta$ 1 y de otros productos proinflamatorios y profibróticos (Weng et al., 2007).

Tras analizar los resultados se puede apreciar que la mayoría de las citocinas son producidas en menor medida por la monocapa de HHSC-N, con la excepción de citocinas proinflamatorias como IL-6, la cual parece mantener el mismo nivel de concentración en los co-cultivos a las 24 h y 72 h con todos los tratamientos. Por otro lado, con los co-cultivos, la concentración de múltiples citocinas proinflamatorias son incrementadas en presencia de los tratamientos, mientras que otras disminuyen a las 24 h, otras aumentan a las 72 h. De manera general se puede decir que los tratamientos entre AgNPs-ALA, CD y CD-LF no muestran diferencias dependientes de la concentración, la mayoría de las concentraciones son comparables entre cada grupo de NPs. Se puede apreciar el pronunciado aumento en la concentración de citocinas como IL-13, IL-2, IL-5, TNF- $\alpha$  e IL-17A, IL-17F es mayor en todos los tratamientos, lo cual puede indicar que la respuesta tienda hacia el progreso de la NASH o fibrosis.

Sin embargo, no podemos dejar de lado el gran aumento en la concentración de IFN- $\gamma$ , con su capacidad de inhibir la activación de las HSCs, presente en todos los co-cultivos que fueron tratados con NPs. A la vez también se ve incrementada la concentración de IL-22 presente en todos los co-cultivos que fueron tratados con NPs. Mientras que los niveles de IL-10 disminuyeron a las 24 h y a las 72 h en todos los co-cultivos que fueron tratados con NPs, pero no es un cambio significativo en la mayoría de los casos.

Tomando en cuenta que las HHSC-N provienen de un individuo que presenta la NASH, una enfermedad inflamatoria crónica, es probable que las células se encuentren sensibles a cualquier cambio o introducción de un agente foráneo a ellas. Aunado al hecho de que las PBMCs fueron estimuladas para la producción de citocinas, y la predisposición inflamatoria de las HHSC-N, se puede concluir que los datos presentados en la detección de citocinas nos indican el progreso de una enfermedad inflamatoria en proceso a la resolución. Inevitablemente es necesario que suceda la inflamación para poder llegar al estado de resolución durante alguna infección o enfermedad. La mayoría de los marcadores de inflamación tenían una concentración más alta tras los tratamientos. Pero a la vez, los marcadores asociados a una respuesta anti-inflamatoria o a la inactivación de las HHSC-N también aumentaron. Analizando los estudios reportados, la mayoría de los estudios se realizaron *in-vivo*, en donde podían tratar a los animales por semanas antes de recolectar resultados. Por lo tanto, es posible que nuestra implementación *in-vitro* no permita conocer la respuesta anti-inflamatoria completa a las 72 h, debido a las limitaciones técnicas. Sin embargo, al combinar los datos obtenidos por qPCR, se puede apreciar una disminución en genes profibróticos con las CD y CD-LF a las 72 h, especialmente ACTA2, que expresa el marcador de activación de las HSCs. Sumando a este hecho la alta producción de IFN- $\gamma$ , es plausible proponer que la respuesta anti-inflamatoria ya está en progreso. Sin embargo, el hecho de que el gen TGFB1 haya aumentado, no necesariamente significa que esos niveles se mantengan constantes todo el tiempo, ya que en un estudio

previo se demuestra que la producción de TGF- $\beta$ 1 podría estar influenciada por la presencia de citocinas pro-inflamatorias como IL-17A, de manera que en un ambiente proinflamatorio es más probable que las células que responden al estímulo promuevan la expresión de TGF- $\beta$ 1, en vez de IFN- $\gamma$  en este caso en específico (Veldhoen and Stockinger, 2006).

Las nanopartículas que presentaron mayor potencial en este estudio fueron los CD-LF, ya que lograron reducir los niveles de expresión de genes profibróticos a las 72 h, y promover la producción de citocinas asociadas a un estado de resolución de manera consistente. La presencia de LF parece haber ayudado significativamente en algunos casos, pero esto podría deberse a que la solución en la cual se sintetizaron tenía una masa de LF de 6mg (Guzmán-Urbe et al., 2022); mientras que las AgNPs-ALA presentaron mucho potencial en los ensayos colorimétricos, especialmente por la efectividad a bajas concentraciones. Es probable que se necesiten hacer algunos ajustes en la implementación del modelo aquí propuesto, para aprovechar el potencial de las AgNPs-ALA en futuros ensayos.

## Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas

---

### 5.1 Conclusiones

En este trabajo se logró implementar un modelo de co-cultivo utilizando células estrelladas hepáticas humanas de un donador con esteatohepatitis no alcohólica (HHSC-N), y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), estimuladas para secretar citocinas.

Las AgNPs-ALA, CD y CD-LF demostraron capacidad de remover los radicales 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS<sup>••</sup>) y óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), lo cual demuestra potencial de remover especies reactivas de oxígeno (ROS) y de actividad anti-inflamatoria en aplicaciones *in vitro*.

Se comprobó que las concentraciones elegidas de 6.25, 12.5 y 17.5 µg/mL de AgNPs-ALA y 5, 50, 100 y 200 µg/mL de CD y CD-LF no fueran citotóxicas en HHSC-N ni en hepatocitos HepG2.

Las concentraciones evaluadas de NPs, por sí solas, no tienen un efecto directo en la vía de señalización de TGF-β en células HEK-Blue TGF-β.

Las concentraciones de NPs elegidas son capaces de modular la expresión de genes profibróticos ACTA2, COL1A1, PDGFRB, TGFB1 y TIMP1 en células estrelladas hepáticas humanas de un donador con esteatohepatitis no alcohólica (HHSC-N).

Las concentraciones elegidas de NPs son capaces de modular la secreción de citocinas solubles cuya función tiende hacia un posible estado de resolución. De manera que aumentó la concentración de dos citocinas clave en la resolución de la NASH: IFN-γ, con la capacidad de inhibir la transdiferenciación de las células estrelladas hepáticas (HSCs) y de IL-22, por su capacidad anti-inflamatoria en el hígado.

Nuestros resultados podrían ser un punto de partida para el desarrollo de un tratamiento para la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), mediante el uso de biomedicina y nanotecnología.

## 5.2 Perspectivas

Algunas perspectivas para tener en consideración son mejorar la implementación de co-cultivo mediante el uso de organoides, los cuales pueden estar compuesto de más células como hepatocitos, células de Kupffer y de células endoteliales hepáticas para lograr un microambiente más similar al del hígado *in vivo* pero implementado de una manera *in vitro*. No obstante, es importante recalcar el hecho de que las células HHSC-N utilizadas en este proyecto provienen de pacientes humanos con la NASH, es decir que el daño no fue inducido de manera *in vitro* con algún agente profibrótico, sino que es producto de daño multifactorial presentado en la vida cotidiana. Es crucial intervenir en pacientes en el estado de NASH, ya que la enfermedad puede progresar al irreversible estado de cirrosis y posiblemente carcinoma hepatocelular (HCC), lo cual reduce la calidad de vida y probabilidad de supervivencia de las personas afectadas. El impacto de los modelos de estudio que utilicen células provenientes de personas con daño presentado por situaciones de la vida diaria puede brindar un mejor entendimiento a la respuesta y mejora de enfermedades.



## Literatura citada

---

- Abdel-Salam, O. M. E., Youness, E. R., Mohammed, N. A., Yassen, N. N., Khadrawy, Y. A., El-Toukhy, S. E., and Sleem, A. A. 2016. Novel neuroprotective and hepatoprotective effects of citric acid in acute malathion intoxication. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Elsevier (Singapore) Pte Ltd, 9(12), pp. 1181–1194. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.11.005
- Agarwal, T., Maiti, T. K., and Ghosh, S. K. 2019. Decellularized caprine liver-derived biomimetic and pro-angiogenic scaffolds for liver tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 98, pp. 939–948. doi: 10.1016/j.msec.2019.01.037
- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., and Chen, H. 2013a. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), pp. 3834–3842. doi: 10.3390/ijerph10093834
- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., and Chen, H. 2013b. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI, 10(9), pp. 3834–3842. doi: 10.3390/ijerph10093834
- Allaire, M. and Gilgenkrantz, H. 2020. The impact of steatosis on liver regeneration. In *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* (Vol. 41, Issue 1). De Gruyter. doi: 10.1515/hmbci-2018-0050
- Alvarez-Lee, L., García-Gasca, A., Martínez-Díaz, S., and Gutiérrez-Rivera, N. 2020. Selection of reference genes for the study of relative gene expression during development of *Litopenaeus vannamei* larvae. *Aquaculture Research*. Blackwell Publishing Ltd, 51(7), pp. 2997–3006. doi: 10.1111/are.14638
- An, S. Y., Petrescu, A. D., and DeMorrow, S. 2021. Targeting Certain Interleukins as Novel Treatment Options for Liver Fibrosis. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fphar.2021.645703
- An, X., Liu, L., Schaefer, M., Yan, B., Scholz, C., Hillmer, S., Wang, K., Luo, Y., Ji, H., Gladkich, J., and Herr, I. 2021. Alpha-lipoic acid prevents side effects of therapeutic nanosilver without compromising cytotoxicity in experimental pancreatic cancer. *Cancers*. MDPI, 13(19). doi: 10.3390/cancers13194770
- Aoyama, Y., Naiki-Ito, A., Xiaochen, K., Komura, M., Kato, H., Nagayasu, Y., Inaguma, S., Tsuda, H., Tomita, M., Matsuo, Y., Takiguchi, S., and Takahashi, S. 2022. Lactoferrin prevents hepatic injury and fibrosis via the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Nutrients*. MDPI, 14(1). doi: 10.3390/nu14010042
- Azam, N., Najabat Ali, M., and Javaid Khan, T. 2021. Carbon Quantum Dots for Biomedical Applications: Review and Analysis. In *Frontiers in Materials* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fmats.2021.700403
- Barbero-Becerra, V. J., Giraudi, P. J., Chávez-Tapia, N. C., Uribe, M., Tiribelli, C., and Rosso, N. 2015. The interplay between hepatic stellate cells and hepatocytes in an in vitro model of NASH. *Toxicology in Vitro*. Elsevier Ltd, 29(7), pp. 1753–1758. doi: 10.1016/j.tiv.2015.07.010

- Bedlovičová, Z., Strapáč, I., Baláž, M., and Salayová, A. 2020. A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 14). MDPI AG. doi: 10.3390/molecules25143191
- Beringer, A. and Miossec, P. 2019a. IL-17 and TNF- $\alpha$  co-operation contributes to the proinflammatory response of hepatic stellate cells. *Clinical and Experimental Immunology*. Blackwell Publishing Ltd, 198(1), pp. 111–120. doi: 10.1111/cei.13316
- Beringer, A. and Miossec, P. 2019b. IL-17 and TNF- $\alpha$  co-operation contributes to the proinflammatory response of hepatic stellate cells. *Clinical and Experimental Immunology*. Blackwell Publishing Ltd, 198(1), pp. 111–120. doi: 10.1111/cei.13316
- Beringer, A., Molle, J., Bartosch, B., and Miossec, P. 2019. Two phase kinetics of the inflammatory response from hepatocyte-peripheral blood mononuclear cell interactions. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-44840-w
- Böyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. Supplementum, 97, pp. 77–89.
- Chen, H. A., Chiu, C. C., Huang, C. Y., Chen, L. J., Tsai, C. C., Hsu, T. C., and Tzang, B. S. 2016. Lactoferrin Increases Antioxidant Activities and Ameliorates Hepatic Fibrosis in Lupus-Prone Mice Fed with a High-Cholesterol Diet. *Journal of Medicinal Food*. Mary Ann Liebert Inc., 19(7), pp. 670–677. doi: 10.1089/jmf.2015.3634
- Chen, Q., Huang, J., Tong, W., Gui, X., Zheng, J., and Hu, G. 2022. The geometry-dependent regulation of hepatic stellate cells by graphene oxide nanomaterials. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier B.V., 604, pp. 179–184. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.03.050
- Cordero-Espinoza, L. and Huch, M. 2018a. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 128(1), pp. 85–96. doi: 10.1172/JCI93562
- Cordero-Espinoza, L. and Huch, M. 2018b. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 128, Issue 1). American Society for Clinical Investigation. doi: 10.1172/JCI93562
- de Minicis, S., Seki, E., Uchinami, H., Kluwe, J., Zhang, Y., Brenner, D. A., and Schwabe, R. F. 2007. Gene Expression Profiles During Hepatic Stellate Cell Activation in Culture and In Vivo. *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 132(5), pp. 1937–1946. doi: 10.1053/j.gastro.2007.02.033
- Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), pp. 271–277. doi: 10.1016/0022-1759(86)90368-6
- Derynck, R. and Budi, E. H. 2019. Specificity, versatility, and control of TGF- $\beta$  family signaling. Consultado el 24 de Marzo del 2021 de <http://stke.sciencemag.org/>
- Devi, P., Saini, S., and Kim, K. H. 2019. The advanced role of carbon quantum dots in nanomedical applications. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 141). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.bios.2019.02.059

- Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S., and Meindl-Beinker, N. 2019. Tgf- $\beta$  in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis—updated 2019. In *Cells* (Vol. 8, Issue 11). MDPI. doi: 10.3390/cells8111419
- Donato, M. T., Tolosa, L., and Gómez-Lechón, M. J. 2015. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. In *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. Springer New York. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7\_5
- Doumba, P. P., Nikolopoulou, M., Gomatos, I. P., Konstadoulakis, M. M., and Koskinas, J. 2013. Co-culture of primary human tumor hepatocytes from patients with hepatocellular carcinoma with autologous peripheral blood mononuclear cells: Study of their in vitro immunological interactions. *BMC Gastroenterology*, 13(1). doi: 10.1186/1471-230X-13-17
- Duan, Y., Pan, X., Luo, J., Xiao, X., Li, J., Bestman, P. L., and Luo, M. 2022. Association of Inflammatory Cytokines With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.880298
- El-Maadawy, W. H., Hammam, O. A., Seif el-Din, S. H., and El-Lakkany, N. M. 2020.  $\alpha$ -Lipoic acid modulates liver fibrosis: A cross talk between TGF- $\beta$ 1, autophagy, and apoptosis. *Human and Experimental Toxicology*. SAGE Publications Ltd, 39(4), pp. 440–450. doi: 10.1177/0960327119891212
- Eng, F. J. and Friedman, S. L. 2000. Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(1), pp. G7–G11. doi: 10.1152/ajpgi.2000.279.1.G7
- Farid, A. S., el Shemy, M. A., Nafie, E., Hegazy, A. M., and Abdelhiee, E. Y. 2021a. Anti-inflammatory, anti-oxidant and hepatoprotective effects of lactoferrin in rats. *Drug and Chemical Toxicology*. Taylor and Francis Ltd., 44(3), pp. 286–293. doi: 10.1080/01480545.2019.1585868
- Farid, A. S., el Shemy, M. A., Nafie, E., Hegazy, A. M., and Abdelhiee, E. Y. 2021b. Anti-inflammatory, anti-oxidant and hepatoprotective effects of lactoferrin in rats. *Drug and Chemical Toxicology*. Taylor and Francis Ltd., 44(3), pp. 286–293. doi: 10.1080/01480545.2019.1585868
- Fayez, A. M., Zakaria, S., and Moustafa, D. 2018. Alpha lipoic acid exerts antioxidant effect via Nrf2/HO-1 pathway activation and suppresses hepatic stellate cells activation induced by methotrexate in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 105, pp. 428–433. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.145
- Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R. K., and Kitani, A. 2006. IL-13 signaling through the IL-13 $\alpha$ 2 receptor is involved in induction of TGF- $\beta$ 1 production and fibrosis. *Nature Medicine*, 12(1), pp. 99–106. doi: 10.1038/nm1332
- Flegal, K. M., Carroll, D., Kit, B. K., and Ogden, C. L. 2012. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999–2010. *JAMA*. American Medical Association, 307(5), pp. 491–497. doi: 10.1001/jama.2012.39

- Foo, N. P., Lin, S. H., Lee, Y. H., Wu, M. J., and Wang, Y. J. 2011.  $\alpha$ -Lipoic acid inhibits liver fibrosis through the attenuation of ROS-triggered signaling in hepatic stellate cells activated by PDGF and TGF- $\beta$ . *Toxicology*, 282(1–2), pp. 39–46. doi: 10.1016/j.tox.2011.01.009
- Friedman, S. L. 2008. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiological Reviews*, 88(1), pp. 125–172. doi: 10.1152/physrev.00013.2007
- Friedman, S. L. and Arthur, M. J. 1989. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *Journal of Clinical Investigation*, 84(6), pp. 1780–1785. doi: 10.1172/JCI114362
- Ghoreschi, K., Thomas, P., Breit, S., Dugas, M., Mailhammer, R., van Eden, W., van der Zee, R., Biedermann, T., Prinz, J., Mack, M., Mrowietz, U., Christophers, E., Schlöndorff, D., Plewig, G., Sander, C. A., and Rocken, M. 2003. Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nature Medicine*, 9(1), pp. 40–46. doi: 10.1038/nm804
- Gupta, D., Rani, M., Khan, N., and Jameel, S. 2014. HIV-1 infected peripheral blood mononuclear cells modulate the fibrogenic activity of hepatic stellate cells through secreted TGF- $\beta$  and JNK signaling. *PLoS ONE. Public Library of Science*, 9(3). doi: 10.1371/journal.pone.0091569
- Guzmán-Urbe, C., Castro-Ceseña, A. B., and Lugo Fabres, P. H. 2022. Diseño y evaluación de un hidrogel cargado con puntos cuánticos de carbono conjugados con un inhibidor de beta secretasa, en un modelo de Alzheimer. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. pp. 27-32.
- Hajtuch, J., Santos-Martinez, M. J., Wojcik, M., Tomczyk, E., Jaskiewicz, M., Kamysz, W., Narajczyk, M., and Inkielewicz-Stepniak, I. 2022. Lipoic Acid-Coated Silver Nanoparticles: Biosafety Potential on the Vascular Microenvironment and Antibacterial Properties. *Frontiers in Pharmacology. Frontiers Media S.A.*, 12. doi: 10.3389/fphar.2021.733743
- Hammerich, L. and Tacke, F. 2014. Interleukins in chronic liver disease: Lessons learned from experimental mouse models. In *Clinical and Experimental Gastroenterology Vol. 7, Issue 1*. doi: 10.2147/CEG.S43737
- Henderson, N. C. and Iredale, J. P. 2007. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clinical Science*, 112(5), pp. 265–280. doi: 10.1042/CS20060242
- Higashi, T., Friedman, S. L., and Hoshida, Y. 2017a. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 121, pp. 27–42. doi: 10.1016/j.addr.2017.05.007
- Higashi, T., Friedman, S. L., and Hoshida, Y. 2017b. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. In *Advanced Drug Delivery Reviews (Vol. 121)*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.addr.2017.05.007
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), pp. 1841–1856. doi: 10.1021/jf030723c
- Huang, X. and Tang, M. 2021. Research advance on cell imaging and cytotoxicity of different types of quantum Dots. In *Journal of Applied Toxicology (Vol. 41, Issue 3)*. John Wiley and Sons Ltd. doi: 10.1002/jat.4083

- Issa, R., Zhou, X., Trim, N., Millward-Sadler, H., Krane, S., Benyon, C., and Iredale, J. 2003. Mutation in collagen-I that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration. *The FASEB Journal*, 17(1), pp. 47–49. doi: 10.1096/fj.02-0494fje
- International Organization for Standardization (ISO) 2009. Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (10993-5). ISO de referencia 10993-5:2009(E). Consultado el 10 de enero de 2021. <https://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>
- Iwakiri, Y. and Kim, M. Y. 2015. Nitric oxide in liver diseases. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 36, Issue 8). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.tips.2015.05.001
- Jennen, D. G. J., Magkoufopoulou, C., Ketelslegers, H. B., van Herwijnen, M. H. M., Kleinjans, J. C. S., and van Delft, J. H. M. 2010. Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicological Sciences*, 115(1), pp. 66–79. doi: 10.1093/toxsci/kfq026
- Kamimura, S. and Tsukamoto, H. 1995. Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology*, 22(4), pp. 1304–1309. doi: 10.1002/hep.1840220441
- Kao, W. Y., Lin, Y. F., Chang, I. W., Chen, C. L., Tang, J. H., Chang, C. C., Chang, Y. J., and Wang, W. 2021. Interleukin-2 receptor alpha as a biomarker for nonalcoholic fatty liver disease diagnosis. *Journal of the Chinese Medical Association*. Wolters Kluwer Health, 84(3), pp. 261–266. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000469
- Kavoosi, G. and Amirghofran, Z. 2017. Chemical composition, radical scavenging and anti-oxidant capacity of *Ocimum Basilicum* essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 29(2), pp. 189–199. doi: 10.1080/10412905.2016.1213667
- Kim, K. S., Hur, W., Park, S. J., Hong, S. W., Choi, J. E., Goh, E. J., Yoon, S. K., and Hahn, S. K. 2010. Bioimaging for targeted delivery of hyaluronic acid derivatives to the livers in cirrhotic mice using quantum dots. *ACS Nano*, 4(6), pp. 3005–3014. doi: 10.1021/nn100589y
- Klein, S. L. and Flanagan, K. L. 2016. Sex differences in immune responses. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 16, Issue 10). Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nri.2016.90
- Kleiveland, C. R. 2015. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer International Publishing, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4\_15
- Kuo, Y. T., Lin, T. H., Chen, W. L., and Lee, H. M. 2012. Alpha-lipoic acid induces adipose triglyceride lipase expression and decreases intracellular lipid accumulation in HepG2 cells. *European Journal of Pharmacology*, 692(1–3), pp. 10–18. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.07.028
- Leite, S. B., Roosens, T., el Taghdouini, A., Mannaerts, I., Smout, A. J., Najimi, M., Sokal, E., Noor, F., Chesne, C., and van Grunsven, L. A. 2016. Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis in vitro. *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 78, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.026

- Liu, G., Liu, J., Pian, L., Gui, S., and Lu, B. 2019.  $\alpha$ -lipoic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis through the suppression of the TGF- $\beta$ /Smad3 pathway and autophagy. *Molecular Medicine Reports*. Spandidos Publications, 19(2), pp. 841–850. doi: 10.3892/mmr.2018.9719
- Liu, Y., Munker, S., Müllenbach, R., and Weng, H. L. 2012. IL-13 signaling in liver fibrogenesis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue MAY). doi: 10.3389/fimmu.2012.00116
- Mandon, M., Huet, S., Dubreil, E., Fessard, V., and le Hégarat, L. 2019. Three-dimensional HepaRG spheroids as a liver model to study human genotoxicity in vitro with the single cell gel electrophoresis assay. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-47114-7
- Mannaerts, I., Eysackers, N., Anne van Os, E., Verhulst, S., Roosens, T., Smout, A., Hierlemann, A., Frey, O., Leite, S. B., and van Grunsven, L. A. 2020. The fibrotic response of primary liver spheroids recapitulates in vivo hepatic stellate cell activation. *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 261. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120335
- Manohar, S. M., Shah, P., and Nair, A. 2021. Flow cytometry: principles, applications and recent advances. *Bioanalysis*. Future Science, 13(3), pp. 181–198. doi: 10.4155/bio-2020-0267
- Marchesini, G., Day, C. P., Dufour, J. F., Canbay, A., Nobili, V., Ratziu, V., Tilg, H., Roden, M., Gastaldelli, A., Yki-Järvinen, H., Schick, F., Vettor, R., Frühbeck, G., and Mathus-Vliegen, L. 2016. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In *Obesity Facts* (Vol. 9, Issue 2). S. Karger AG. doi: 10.1159/000443344
- Marth, T., Strober, W., Seder, R. A., and Kelsall, B. L. 1997. Regulation of transforming growth factor- $\beta$  production by interleukin-12. *European Journal of Immunology*, 27(5), pp. 1213–1220. doi: 10.1002/eji.1830270524
- Matsuoka, M. and Tsukamoto, H. 1990. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor  $\beta$ : Implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology*, 11(4), pp. 599–605. doi: 10.1002/hep.1840110412
- Michalski, C. W., Gorbachevski, A., Erkan, M., Reiser, C., Deucker, S., Bergmann, F., Giese, T., Weigand, M., Giese, N. A., Friess, H., and Kleeff, J. 2007. Mononuclear cells modulate the activity of pancreatic stellate cells which in turn promote fibrosis and inflammation in chronic pancreatitis. *Journal of Translational Medicine*, 5. doi: 10.1186/1479-5876-5-63
- Mikula, M., Proell, V., Fischer, A. N. M., and Mikulits, W. 2006. Activated hepatic stellate cells induce tumor progression of neoplastic hepatocytes in a TGF- $\beta$  dependent fashion. *Journal of Cellular Physiology*, 209(2), pp. 560–567. doi: 10.1002/jcp.20772
- Mishra, A. R., Zheng, J., Tang, X., and Goering, P. L. 2016. Silver nanoparticle-induced autophagic-Lysosomal disruption and NLRP3-inflammasome activation in HepG2 cells is size-dependent. *Toxicological Sciences*. Oxford University Press, 150(2), pp. 473–487. doi: 10.1093/toxsci/kfw011
- Mokdad, A. A., Lopez, A. D., Shahraz, S., Lozano, R., Mokdad, A. H., Stanaway, J., Murray, C. J. L., and Naghavi, M. 2014. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: A

- systematic analysis. *BMC Medicine*. BioMed Central Ltd., 12(1). doi: 10.1186/s12916-014-0145-y
- Moniri, S. and Hantehzadeh, M. R. 2021. Colloidal synthesis of MoS<sub>2</sub> NPs by nanosecond laser ablation of a bulk MoS<sub>2</sub> target in ethylene glycol solution. *Optical and Quantum Electronics*. Springer, 53(5). doi: 10.1007/s11082-021-02872-5
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), pp. 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Mulligan, S. C., Zhang, W., Smith, L. J., Gramelspacher, E., Li, P., and Ekser, B. 2019. Generation of liver organoids by 3D co-culturing of hepatocytes, hepatic stellate cells, and liver sinusoidal endothelial cells. *Proceedings of IMPRS (Vol. 2, No. 1)*. doi:
- Murakami, M., Kamimura, D., and Hirano, T. 2019. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. In *Immunity (Vol. 50, Issue 4)*. Cell Press. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.027
- Nga, H. T., Moon, J. S., Tian, J., Lee, H. Y., Kim, S. H., Lee, Y. S., Jeon, J. H., and Yi, H. S. 2021. Interleukin-10 Attenuates Liver Fibrosis Exacerbated by Thermoneutrality. *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A., 8. doi: 10.3389/fmed.2021.672658
- Njoku, D. B. 2010. Suppressive and pro-inflammatory roles for IL-4 in the pathogenesis of experimental drug-induced liver injury: A review. In *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology (Vol. 6, Issue 5)*. doi: 10.1517/17425251003601979
- Ploeger, D. T. A., Hosper, N. A., Schipper, M., Koerts, J. A., de Rond, S., and Bank, R. A. 2013. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), pp. 29. doi: 10.1186/1478-811X-11-29
- Poillil Surendran, S., George Thomas, R., Moon, M.-J., and Jeong, Y. Y. 2017. Nanoparticles for the treatment of liver fibrosis. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, pp. 6997–7006. doi: 10.2147/IJN.S145951
- Pourahmad, J. and Salimi, A. 2015. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 14(4), pp. 979.
- Qin, S. Y., Lu, D. H., Guo, X. Y., Luo, W., Hu, B. L., Huang, X. L., Chen, M., Wang, J. X., Ma, S. J., Yang, X. W., Jiang, H. X., and Zhou, Y. 2016. A deleterious role for Th9/IL-9 in hepatic fibrogenesis. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6. doi: 10.1038/srep18694
- Radi, R. 2018. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 115(23), pp. 5839–5848. doi: 10.1073/pnas.1804932115
- Ramachandran, L. and Nair, C. K. K. 2011. Therapeutic Potentials of Silver Nanoparticle Complex of  $\alpha$ -Lipoic Acid. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 1, pp. 14. doi: 10.5772/50956

- Ramachandran, P. and Iredale, J. P. 2012. Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution. *QJM*, 105(9), pp. 813–817. doi: 10.1093/qjmed/hcs069
- Ramachandran, P., Pellicoro, A., Vernon, M. A., Boulter, L., Aucott, R. L., Ali, A., Hartland, S. N., Snowdon, V. K., Cappon, A., Gordon-Walker, T. T., Williams, M. J., Dunbar, D. R., Manning, J. R., van Rooijen, N., Fallowfield, J. A., Forbes, S. J., and Iredale, J. P. 2012. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46). doi: 10.1073/pnas.1119964109
- Ratnavathi, C. V. and Komala, V. V. 2016. Sorghum Grain Quality. In *Sorghum Biochemistry*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-803157-5.00001-0
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), pp. 1231–1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Reiman, R. M., Thompson, R. W., Feng, C. G., Hari, D., Knight, R., Cheever, A. W., Rosenberg, H. F., and Wynn, T. A. 2006. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infection and Immunity*, 74(3), pp. 1471–1479. doi: 10.1128/IAI.74.3.1471-1479.2006
- Sachdev, A. and Gopinath, P. 2015. Green synthesis of multifunctional carbon dots from coriander leaves and their potential application as antioxidants, sensors and bioimaging agents. *Analyst*. Royal Society of Chemistry, 140(12), pp. 4260–4269. doi: 10.1039/c5an00454c
- Schuppan, D. and Afdhal, N. H. 2008. Liver cirrhosis. *The Lancet*, 371(9615), pp. 838–851. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60383-9
- Selzner, N., Selzner, M., Odermatt, B., Tian, Y., van Rooijen, N., and Clavien, P. 2003. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF- $\alpha$ /IL-6 in mice. *Gastroenterology*, 124(3), pp. 692–700. doi: 10.1053/gast.2003.50098
- Singh, S., Allen, A. M., Wang, Z., Prokop, L. J., Murad, M. H., and Loomba, R. 2015. Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver vs Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Paired-Biopsy Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(4), pp. 643–654.e9. doi: 10.1016/j.cgh.2014.04.014
- Stanković, M. N., Mladenović, D., Ninković, M., Crossed D Signuričić, I., Šobajić, S. D. S., Jorgačević, B., de Luka, S., Vukicevic, R. J., and Radosavljević, T. S. 2014. The effects of  $\alpha$ -lipoic acid on liver oxidative stress and free fatty acid composition in methionine-choline deficient diet-induced NAFLD. *Journal of Medicinal Food*, 17(2), pp. 254–261. doi: 10.1089/jmf.2013.0111
- Sun, X., Wang, Z., Zhai, S., Cheng, Y., Liu, J., and Liu, B. 2013. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles in primary rat hepatic stellate cells. *Molecular Medicine Reports*, 8(5), pp. 1365–1372. doi: 10.3892/mmr.2013.1683
- Taimr, P. 2003. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology*, 37(1), pp. 87–95. doi: 10.1053/jhep.2003.50002



- Tanaka, Y., Kaibori, M., Miki, H., Nakatake, R., Tokuhara, K., Nishizawa, M., Okumura, T., and Kwon, A. H. 2015. Alpha-lipoic acid exerts a liver-protective effect in acute liver injury rats. *Journal of Surgical Research*. Academic Press Inc., 193(2), pp. 675–683. doi: 10.1016/j.jss.2014.08.057
- Tiggelman, A. M. B. C., Boers, W., Linthorst, C., Sala, M., and Chamuleau, R. A. E. M. 1995. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 $\beta$ , IL-4, TGF $\beta$  and IFN gamma. *Journal of Hepatology*, 23(3), pp. 307–317. doi: 10.1016/S0168-8278(95)80010-7
- Tsuchida, T. and Friedman, S. L. 2017. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 14, Issue 7). Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrgastro.2017.38
- Tung, Y. T., Tang, T. Y., Chen, H. L., Yang, S. H., Chong, K. Y., Cheng, W. T. K., and Chen, C. M. 2014. Lactoferrin protects against chemical-induced rat liver fibrosis by inhibiting stellate cell activation. *Journal of Dairy Science*. Elsevier Ltd, 97(6), pp. 3281–3291. doi: 10.3168/jds.2013-7505
- Usman, M., Zaheer, Y., Younis, M. R., Demirdogen, R. E., Hussain, S. Z., Sarwar, Y., Rehman, M., Khan, W. S., and Ihsan, A. 2020. The effect of surface charge on cellular uptake and inflammatory behavior of carbon dots. *Colloids and Interface Science Communications*. Elsevier B.V., 35. doi: 10.1016/j.colcom.2020.100243
- Veldhoen, M. and Stockinger, B. 2006. TGF $\beta$ 1, a “Jack of all trades”: the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends in Immunology*, 27(8), pp. 358–361. doi: 10.1016/j.it.2006.06.001
- Wang, G. P. and Xu, C. S. 2010. Reference gene selection for real-time RT-PCR in eight kinds of rat regenerating hepatic cells. *Molecular Biotechnology*, 46(1), pp. 49–57. doi: 10.1007/s12033-010-9274-5
- Wang, S., Chen, L., Wang, J., Du, J., Li, Q., Gao, Y., Yu, S., and Yang, Y. 2020. Enhanced-fluorescent imaging and targeted therapy of liver cancer using highly luminescent carbon dots-conjugated folic acid. *Materials Science and Engineering C*. Elsevier Ltd, 116. doi: 10.1016/j.msec.2020.111233
- Watanabe, M., Fuda, H., Okabe, H., Joko, S., Miura, Y., Hui, S. P., Yimin, Hamaoka, N., Miki, E., and Chiba, H. 2016. Oyster extracts attenuate pathological changes in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) mouse model. *Journal of Functional Foods*. Elsevier Ltd, 20, pp. 516–531. doi: 10.1016/j.jff.2015.11.029
- Weng, H., Mertens, P. R., Gressner, A. M., and Dooley, S. 2007. IFN- $\gamma$  abrogates profibrogenic TGF- $\beta$  signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads. *Journal of Hepatology*, 46(2), pp. 295–303. doi: 10.1016/j.jhep.2006.09.014
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., and Lakey, J. R. T. 2021. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. In *Cell Transplantation* (Vol. 30). SAGE Publications Ltd. doi: 10.1177/0963689721999617

- Xu, X., Li, Y., Hu, G., Mo, L., Zheng, M., Lei, B., Zhang, X., Hu, C., Zhuang, J., and Liu, Y. 2020. Surface functional carbon dots: Chemical engineering applications beyond optical properties. *Journal of Materials Chemistry C. Royal Society of Chemistry*, 8(46), pp. 16282–16294. doi: 10.1039/d0tc03805a
- Xu, Y., Zhou, X., Shi, C., Wang, J., and Wu, Z. 2015.  $\alpha$ -Lipoic acid protects against the oxidative stress and cytotoxicity induced by cadmium in HepG2 cells through regenerating glutathione regulated by glutamate-cysteine ligase. *Toxicology Mechanisms and Methods*. Taylor and Francis Ltd, 25(8), pp. 596–603. doi: 10.3109/15376516.2015.1044150
- Ying, H. Z., Chen, Q., Zhang, W. Y., Zhang, H. H., Ma, Y., Zhang, S. Z., Fang, J., and Yu, C. H. 2017. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review). In *Molecular Medicine Reports* (Vol. 16, Issue 6). Spandidos Publications. doi: 10.3892/mmr.2017.7641
- Zárybnický, T., Matoušková, P., Ambrož, M., Šubrt, Z., Skálová, L., and Boušová, I. n.d. The Selection and Validation of Reference Genes for mRNA and microRNA Expression Studies in Human Liver Slices Using RT-qPCR. *Genes (Basel)*. doi: 10.3390/genes10100763
- Zárybnický, T., Matoušková, P., Ambrož, M., Šubrt, Z., Skálová, L., and Boušová, I. 2019. The selection and validation of reference genes for mRNA and microRNA expression studies in human liver slices using RT-qPCR. *Genes*. MDPI AG, 10(10). doi: 10.3390/genes10100763
- Zertuche-Arias, T., Castro-Ceseña, A. B., and Juárez-Camacho, P. 2021. Desarrollo y evaluación in vitro de hidrogeles con actividad antioxidante para su aplicación en la regeneración ósea. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. pp. 24-29.
- Zhan, T., Ma, H., Jiang, S., Zhong, Z., Wang, X., Li, C., Yu, D., Liu, L., Xu, J., and Xia, C. 2019. Interleukin-9 blockage reduces early hepatic granuloma formation and fibrosis during *Schistosoma japonicum* infection in mice. *Immunology*. Blackwell Publishing Ltd, 158(4), pp. 296–303. doi: 10.1111/imm.13111
- Zhang, J., Jiang, N., Ping, J., and Xu, L. 2021. TGF- $\beta$ 1-induced autophagy activates hepatic stellate cells via the ERK and JNK signaling pathways. *International Journal of Molecular Medicine*. Spandidos Publications, 47(1), pp. 256–266. doi: 10.3892/ijmm.2020.4778
- Zhang, M. and Zhang, S. 2020. T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fimmu.2020.01142
- Zheng, D., Jiang, Y., Qu, C., Yuan, H., Hu, K., He, L., Chen, P., Li, J., Tu, M., Lin, L., Chen, H., Lin, Z., Lin, W., Fan, J., Cheng, G., and Hong, J. 2020. Pyruvate Kinase M2 Tetramerization Protects against Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis. *American Journal of Pathology*. Elsevier Inc., 190(11), pp. 2267–2281. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.08.002
- Zheng, X., Shao, D., Li, J., Song, Y., Chen, Y., Pan, Y., Zhu, S., Yang, B., and Chen, L. 2015. Single and repeated dose toxicity of citric acid-based carbon dots and a derivative in mice. *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 5(111), pp. 91398–91406. doi: 10.1039/c5ra18391j
- Zisser, A., Ipsen, D. H., and Tveden-Nyborg, P. 2021. Hepatic stellate cell activation and inactivation in nash-fibrosis—roles as putative treatment targets? In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 4). MDPI AG. doi: 10.3390/biomedicines9040365

## Anexos

### Anexo A

Tabla 8. Relación de muestras con HHSC-N evaluadas en el proyecto

Número muestra	Experimento	Tratamiento
1	Niveles de referencia	HHSC-N
2		HHSC-N + PBMCs + PMA
3		HHSC-N + PBMCs
4		PBMCs + PMA
5		PBMCs
6	Solamente HHSC-N con tratamientos	Control (Monocapa HHSC-N)
7		AgNPs-ALA 6.25 µg/mL
8		AgNPs-ALA 12.5 µg/mL
9		AgNPs-ALA 17.5 µg/mL
10		CD 5 µg/mL
11		CD 50 µg/mL
12		CD 100 µg/mL
13		CD 200 µg/mL
14		CD-LF 5 µg/mL
15		CD-LF 50 µg/mL
16		CD-LF 100 µg/mL
17		CD-LF 200 µg/mL
18	Muestra estimulada con TGF-β1	2 ng/mL de TGF-β1

19	<b>Co-cultivo HHSC-N + PBMCs tratadas con AgNPs-ALA, CD &amp; CD-LF 24 h</b>	<b>Control</b>
20		<b>AgNPs-ALA 6.25 µg/mL</b>
21		<b>AgNPs-ALA 12.5 µg/mL</b>
22		<b>AgNPs-ALA 17.5 µg/mL</b>
23		<b>CD 5 µg/mL</b>
24		<b>CD 50 µg/mL</b>
25		<b>CD 100 µg/mL</b>
26		<b>CD 200 µg/mL</b>
27		<b>CD-LF 5 µg/mL</b>
28		<b>CD-LF 50 µg/mL</b>
29		<b>CD-LF 100 µg/mL</b>
30		<b>CD-LF 200 µg/mL</b>
31	<b>Co-cultivo HHSC-NAS + PBMCs tratadas con AgNPs-ALA, CD &amp; CD-LF 72 h</b>	<b>Control</b>
32		<b>AgNPs-ALA 6.25 µg/mL</b>
33		<b>AgNPs-ALA 12.5 µg/mL</b>
34		<b>AgNPs-ALA 17.5 µg/mL</b>
35		<b>CD 5 µg/mL</b>
36		<b>CD 50 µg/mL</b>
37		<b>CD 100 µg/mL</b>
38		<b>CD 200 µg/mL</b>
39		<b>CD-LF 5 µg/mL</b>
40		<b>CD-LF 50 µg/mL</b>
41		<b>CD-LF 100 µg/mL</b>
42		<b>CD-LF 200 µg/mL</b>