



ANÁLISIS NO PARAMÉTRICO DE LA PRODUCCIÓN DE COLÁGENO EN MODELOS DE ACTIVACIÓN DE HSC

Trabajo Práctico

Integrantes:

Coveñas Zavaleta Cristian Nahuel
Cañizares María Inés
Roura Agustina

Octubre 2025

Introducción

La fibrosis hepática es un proceso en el que el hígado produce y acumula en exceso una sustancia llamada matriz extracelular, compuesta principalmente por colágeno. Este exceso genera una especie de “cicatriz interna” que altera el funcionamiento normal del órgano. Con el tiempo, la acumulación de colágeno y el ambiente inflamatorio que se forma pueden favorecer la aparición del carcinoma hepatocelular (HCC), la forma más común de cáncer de hígado. Las células estelares hepáticas (HSC) son las principales responsables de este proceso: cuando el hígado sufre algún daño, estas células se activan y comienzan a producir grandes cantidades de colágeno. Por ello, encontrar maneras de evitar o reducir esta activación es clave para prevenir o tratar la enfermedad hepática avanzada y el HCC.

En este trabajo se buscó evaluar el potencial antifibrogénico de una combinación de dos compuestos, Metformina y Ácido Lipoico, en células estelares hepáticas cultivadas en laboratorio. El objetivo fue determinar bajo qué condiciones experimentales (control, activación con suero fetal al 10% o activación con los compuestos) se produce una mayor o menor cantidad de colágeno en la superficie de las células, lo que refleja directamente su nivel de actividad fibrogénica.

Para ello, se trabajó con cuatro grupos de muestras independientes de células, cada uno sometido a un tipo distinto de medio de cultivo. La variable de interés es la proporción de la superficie celular ocupada por gránulos de colágeno, lo que permite comparar de forma cuantitativa la respuesta entre grupos.

Analisis descriptivo

En primer lugar, se procedió a realizar un análisis descriptivo de la variable Superficie de Colágeno sobre Superficie Celular (SColSCel) mediante el uso de una tabla descriptiva y un diagrama de caja (Figura 1), el cual mostró diferencias marcadas entre los tratamientos evaluados.

Tabla 1: Medidas descriptivas de Superficie de Colágeno Sobre Superficie Celular por tratamiento

Tratamiento	N	Media	Mediana	Desvío Estándar	Mínimo	Cuartil 1	Cuartil 2	Máximo
SFB 1%	29	0.116	0.098	0.078	0.012	0.047	0.171	0.295
SFB 10%	17	0.224	0.215	0.086	0.115	0.171	0.259	0.448
SFB1%+MA	11	0.071	0.066	0.036	0.017	0.048	0.090	0.142
SFB10%+MA	28	0.051	0.048	0.017	0.025	0.041	0.058	0.099

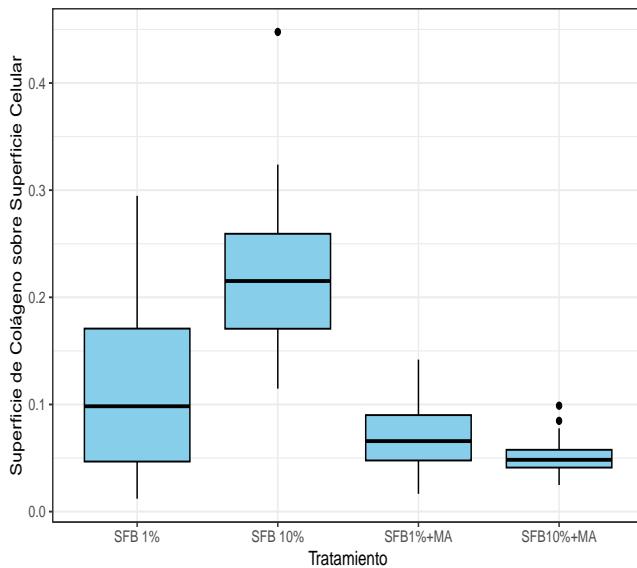


Figura 1: Distribución de Superficie de Colágeno sobre Superficie Celular por tratamiento

El tratamiento SFB 10% presentó los valores medios y medianos más elevados (0.22), acompañado de la mayor variabilidad, lo que indica una mayor formación de colágeno y mayor variabilidad entre las mediciones. Los tratamientos SFB1%+MA y SFB10%+MA mostraron los valores medios más bajos de colágeno (0.071 y 0.051, respectivamente) y menor variabilidad, sugiriendo un efecto inhibidor sobre la formación de colágeno al incorporar metformina y/o ácido lipoico. El tratamiento SFB 1% (considerado como grupo control) presentó valores intermedios (media = 0.116, mediana = 0.098), inferiores a SFB 10% pero superiores a los tratamientos combinados.

Además, en la Figura 1 se observaron valores atípicos en los grupos SFB10% y SFB10%+MA, aunque la tendencia general indicó que la presencia de Metformina y Ácido lipoico disminuye la proporción de colágeno en la superficie de las células.

Los resultados sugieren que la combinación de SFB con metformina y ácido lipoico (+MA) reduce de manera consistente la superficie de colágeno sobre las células.

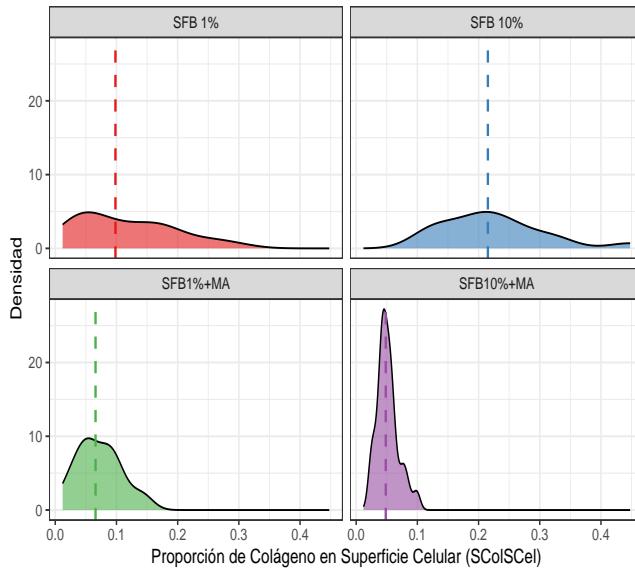


Figura 2: Distribución de la Proporción de Colágeno por Tratamiento

La Figura 2 sugiere que la forma de las distribuciones para cada tratamiento muestra un alejamiento de la normalidad, con asimetrías visibles y posibles acumulaciones de valores en los extremos. Este hecho se refuerza porque la variable de interés, Superficie de Colágeno sobre Superficie Celular (SColSCel), es por definición una proporción , lo que implica que su rango está acotado entre 0 y 1 y favorece la asimetría en su distribución. Por esta razón, basándonos tanto en la evidencia gráfica como en la naturaleza de la variable, se plantea la necesidad de proceder con métodos estadísticos no paramétricos, ya que son menos sensibles a las desviaciones de los supuestos de normalidad requeridos por las pruebas paramétricas tradicionales (como el ANOVA).

Análisis inferencial

Luego del análisis descriptivo, que permitió observar tendencias generales y posibles diferencias entre los tratamientos, se continuó con un análisis estadístico para comprobar si esas diferencias son significativas. Antes de ello, se evaluó si los datos cumplían las condiciones necesarias para aplicar pruebas tradicionales basadas en la normalidad. Se probará si los datos siguen una distribución normal y si se cumple el supuesto de homogeneidad de variancias (homocedasticidad).

Se aplicó la prueba de Lilliefors de manera independiente a cada grupo de tratamiento. Esta prueba compara la distribución empírica acumulada de los datos con la función de distribución normal.

Tabla 2: Prueba de Normalidad de Lilliefors por Grupo de Tratamiento

Tratamiento	P-Value
SFB 1%	0.1363
SFB 10%	0.4464
SFB1%+MA	0.9207
SFB10%+MA	0.2976

Los resultados mostraron p-value superiores a 0.05 en todos los tratamientos. Por lo tanto, se concluye con un nivel de significación del 5% que no hay evidencia muestral suficiente para decir que la SColSCel no sigue una distribución normal en cada tratamiento, es decir, la SColSCel sigue una distribución normal.

Asimismo, se analizó la homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) mediante la prueba de Levene. Los resultados indicaron que este supuesto no se cumplía, desaconsejando el uso de métodos paramétricos tradicionales.

Tabla 3: Resultados de la Prueba de Levene

Estadístico F	gl1	gl2	P-Value
13.2888	3	81	<0.0001

Como se puede observar, este supuesto no se cumplió, lo cual no se sustenta la opción de continuar el análisis implementando métodos de análisis paramétricos.

Se procede continuar el análisis con métodos estadísticos no paramétricos, que permiten comparar los tratamientos sin depender de estos supuestos.

Condiciones que generan mayor y menor producción de colágeno en promedio

Se decidió aplicar la prueba de Kruskal–Wallis para evaluar diferencias entre los grupos. Se formuló como hipótesis principal que la proporción de colágeno mediano es la misma entre los cuatro tratamientos aplicados a las HSC, esperando que alguna condición de activación fibrogénica presentara una mediana diferente a las demás.

Tabla 4: Resultados de la Prueba de Kruskal-Wallis para SColSCel por Tratamiento

Estadística	G.L. (Grados de Libertad)	P-Value
37.936	3	<0.0001

Los resultados del test de Kruskal–Wallis indicaron una diferencia significativa entre los grupos. Se concluye que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medianas, esto confirma que las condiciones de cultivo y la inclusión de los compuestos antifibrogénicos modifican de manera significativa la tendencia central de la actividad fibrogénica de las HSC.

Para identificar qué tratamientos se diferenciaban específicamente del control, se realizaron comparaciones múltiples mediante la prueba de Dunn con ajuste de Holm. El objetivo fue determinar cuáles condiciones generaban mayor o menor producción de colágeno en promedio.

```
##  Kruskal-Wallis rank sum test
##
## data: x and group
## Kruskal-Wallis chi-squared = 37.936, df = 3, p-value = 0
##
##
##                                     Comparison of x by group
##                                     (Holm)
## Col Mean-|
## Row Mean |      SFB 1%     SFB 10%   SFB1%+MA
## -----+-----
## SFB 10% | -3.486053
##           | 0.0010*
##           |
## SFB1%+MA |  1.105809  3.763835
##           | 0.1344    0.0004*
##           |
## SFB10%+M |  3.012129  6.058827  1.142306
##           | 0.0039*   0.0000*   0.2533
##           |
## alpha = 0.05
## Reject Ho if p <= alpha/2
```

Tabla 5: Comparaciones por Pares (Dunn-Holm) con el Grupo Control (SFB 1%)

Comparación	P-Value
SFB 1% vs SFB 10%	0.0010
SFB 1% vs SFB1%+MA	0.1344
SFB 1% vs SFB10%+MA	0.0039
SFB 10% vs SFB1%+MA	0.0004
SFB 10% vs SFB10%+MA	<0.0001
SFB1%+MA vs SFB10%+MA	0.2533

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el control (SFB 1%) y los tratamientos SFB 10% y SFB 10%+MA ($p < 0.05$), mientras que no se detectaron diferencias significativas con el tratamiento SFB 1%+MA. Estos hallazgos sugieren que las condiciones asociadas a concentraciones más altas de SFB, especialmente combinadas con Metformina y Ácido Lipoico, inducen un aumento en la proporción de colágeno en superficie celular en comparación con el control, mientras que la combinación con SFB 1%+MA no genera cambios significativos.

Condiciones que generan mayor o menor variabilidad en producción de colágeno

Con el fin de identificar las condiciones que generan mayor o menor variabilidad en la producción de colágeno, se evaluó la dispersión de la proporción de colágeno en superficie celular (SColSCel) entre los tratamientos. Dado que la variable respuesta es una proporción y no se cumple el supuesto de normalidad, se aplicó la prueba de Levene robusta basada en la mediana (Brown–Forsythe), la cual permite contrastar diferencias en la variabilidad de manera no paramétrica.

Tabla 6: Resultados de la Prueba de Levene

Estadístico F	gl1	gl2	P-Value
13.2888	3	81	<0.0001

Los resultados de la prueba indicaron que existían diferencias significativas en la dispersión entre los grupos ($p < 0.0001$), lo que sugiere que existe evidencia muestral suficiente para afirmar que la variabilidad de la producción de colágeno sobre la superficie celular (SColSCel) difiere en al menos uno de los cuatro tratamientos. Esta prueba permite identificar cuáles condiciones generan una producción de colágeno más consistente y cuáles presentan mayor dispersión.

El análisis descriptivo mostró que SFB10%+MA presentó la menor variabilidad, indicando una producción de colágeno más consistente, mientras que SFB 10% mostró la mayor dispersión, reflejando mayor heterogeneidad en la respuesta de las células.

Conclusión

El análisis permitió evaluar el posible efecto antifibrogénico de la combinación de MA en HSC, considerando como variable principal la proporción de SColSCel. Dado que esta variable representa una proporción y mostró distribuciones asimétricas en los diagramas de densidad (Figura 2), se decidió aplicar métodos estadísticos no paramétricos, que no dependen del supuesto de normalidad. Esta decisión asegura que las conclusiones sean más confiables, incluso si los datos no siguen una distribución normal, a pesar de que la prueba de Lilliefors no detectó desviaciones significativas de normalidad (Tabla 2).

Los resultados descriptivos ya mostraron diferencias claras entre los tratamientos. El grupo sometido al tratamiento de activación fibrogénica (SFB 10%) presentó la mediana más alta, mientras que el tratamiento combinado SFB 10%+MA tuvo la mediana más baja y la menor variabilidad (Tabla 1).

El análisis inferencial comenzó con la prueba de Kruskal-Wallis, que confirmó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Esto permitió concluir que las medianas de SColSCel no eran iguales entre los grupos y avanzar hacia comparaciones más específicas.

Posteriormente, se aplicó la prueba de Dunn con ajuste de Holm para comparar cada tratamiento con el grupo control (SFB 1%). Los resultados mostraron que el tratamiento SFB 10% fue significativamente diferente del control, validando el modelo experimental. De forma aún más relevante, el grupo SFB 10%+MA también fue significativamente diferente, lo que indica que la combinación de Metformina y Ácido Lipoico tiene un efecto inhibidor sobre la producción de colágeno, llegando incluso a niveles inferiores a los observados en el control. La única comparación sin diferencias significativas fue la del grupo SFB 1%+MA, lo que sugiere que el efecto protector se manifiesta principalmente bajo condiciones de alta activación fibrogénica.

Finalmente, la prueba de Levene (basada en la media) mostró diferencias significativas en la variabilidad entre los grupos. En conjunto con los resultados descriptivos, esto indica que el tratamiento SFB 10%+MA no solo redujo la cantidad de colágeno, sino que también generó una respuesta celular más homogénea y estable.

En síntesis, los resultados obtenidos confirman de manera clara la hipótesis principal del estudio: la combinación de MA presenta un alto potencial antifibrogénico en las Células Estelares Hepáticas.

Incluso bajo condiciones diseñadas para inducir una fuerte producción de colágeno (SFB 10%), la presencia de los compuestos Metformina y Ácido Lipoico logró reducir notablemente su acumulación. En el grupo SFB 10%+MA, la cantidad de colágeno fue menor no solo que en las células activadas, sino también que en el grupo control (SFB 1%). Este hallazgo demuestra que el tratamiento puede no solo detener el daño, sino también revertir parcialmente la activación celular. Además, la baja variabilidad observada en este grupo sugiere que el efecto reductor de Metformina y Ácido Lipóico es consistente y predecible, lo cual es una característica deseable para cualquier enfoque terapéutico.

En conclusión, la combinación de Metformina y Ácido Lipóico surge como una estrategia prometedora para el tratamiento de la fibrosis hepática, ya que combina una fuerte reducción en la producción de colágeno con una respuesta celular estable. Estos resultados experimentales respaldan la necesidad de continuar con estudios adicionales que evalúen su seguridad y

eficacia, abriendo la posibilidad de nuevas alternativas para prevenir o tratar la enfermedad hepática avanzada y el carcinoma hepatocelular (HCC).

Anexo

1 Prueba de Normalidad para las muestras - Test de bondad de ajuste de Lilliefors

- Hipótesis: $H_0) X_i \sim Normal$ vs $H_1) X_i \not\sim Normal$
Con X_i : muestra aleatoria del tratamiento i -esimo. $i = \overline{1, 4}$
En particular se realizaron 4 test de normalidad para los distintos tratamientos.
- Estadística: $L_n = mx_x |S_n(X_i) - F_o(X_i)|$, mide la maxima diferencia entre la función de distribución acumulada empírica contra la función de distribución normal.
- Regla de decisión: Rechazo H_0 si $L \geq L_{1-\alpha}$ Dado p-value > 0.05 \Rightarrow No Rechazo H_0 en los 4 test realizados.

2 Estudio sobre la homogeneidad de varianzas - Test de igualdad de variancias de Levene

- Hipótesis: $H_0) \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2$ vs $H_1) \text{Al menos un } \sigma_i^2 \text{ distinto del resto } i = \overline{1, 3}$
Con σ_i^2 : variancia de la Superficie de Colágeno sobre Superficie Celular en el tratamiento i -esimo. $i = \overline{1, 3}$
Se aplica una transformación de la variable $Z = |Y_{ij} - \bar{Y}_{..}|$
- Estadística: $F = \frac{CM_{trat}}{CM_{error}}$, se basa en realizar un ANOVA sobre los valores absolutos de los residuos.
- Regla de decisión: Rechazo H_0 si $F_{obs} \geq F_{3,81,1-\alpha}$ Dado p-value < 0.05 \Rightarrow Rechazo H_0 .

3 Condiciones de mayor y menor producción en promedio - Test de Kruskal–Wallis

- Hipótesis: $H_0) \eta_1 = \eta_2 = \eta_3$ vs $H_1) \text{Al menos un } \eta_i \text{ distinto del resto } i = \overline{1, 3}$
Con η_i : mediana de la Superficie de Colágeno sobre Superficie Celular en el tratamiento i -esimo. $i = \overline{1, 3}$
La estadística se basa en el empleo de rangos en lugar de las observaciones originales.
Se ordena de menor a mayor los valores de la muestra combinada.
- Estadística: $H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$
Con $R_i = \sum_{j=1}^{n_i} r_{ij}$ suma de rangos de cada muestra.

- Regla de decisión: Rechazo H_0 si $h_{obs} \geq \chi^2_{3,1-\alpha}$
Dado p-value < 0.05 \implies Rechazo H_0 .

4 Comparación de tratamientos con el grupo control (SFB1%) por pares (Dunn-Holm)

- Hipótesis: $H_0) \eta_1 = \eta_i$ vs $H_1) \eta_1 \neq \eta_i \quad \forall i = \overline{2,4}$
Con η_i : mediana de la Superficie de Colágeno sobre Superficie Celular en el tratamiento i -esimo. $i = \overline{1,4}$
- Regla de decisión: Rechazar H_0 si $|R_1 - R_i| \geq z_{1-\frac{\alpha}{2(k-1)}} \left[\frac{N(N+1)}{12} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_i} \right) \right]^{1/2}$. Con $i = \overline{2,4}$
Dado p-value < 0.05 para $|R_1 - R_2|$ y $|R_1 - R_4| \implies$ Rechazo H_0
Dado p-value > 0.05 para $|R_1 - R_3| \implies$ No Rechazo H_0