



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina  
Departamento de Medicina Experimental

**BÚSQUEDA DE MARCADORES PARA  
FIBROSIS HEPÁTICA A TRAVÉS DEL  
ANÁLISIS DE DOS MODELOS DE FIBROSIS  
EXPERIMENTAL EN RATAS**

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

**Q.F.B. Alains Hernández Cequera**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:  
Dra. Ma. del Carmen García de León Méndez**

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2010.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta 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 titular de los Derechos de Autor.

**TUTORA PRINCIPAL: Dra. Ma. del Carmen García de León Méndez**

**JURADO DE EXAMEN:**

<b>PRESIDENTE:</b>	Dr. Ruy Pérez Tamayo
<b>VOCAL:</b>	Dr. Julio César Carrero Sánchez
<b>SECRETARIO:</b>	Dra. Ma. del Carmen García de León Méndez
<b>SUPLENTE:</b>	Dr. Max Julio Schmulson Wasserman
<b>SUPLENTE:</b>	Dr. Jaime Berumen Campos

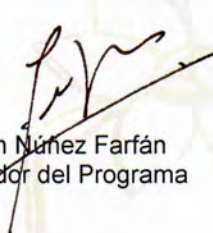
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 09 de agosto de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **HERNÁNDEZ CEQUERA ALAINS** con número de cuenta **509014979** con la tesis titulada **"BÚSQUEDA DE MARCADORES PARA FIBROSIS HEPÁTICA A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE DOS MODELOS DE FIBROSIS EXPERIMENTAL EN RATAS"**, realizada bajo la dirección de la : **DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA DE LEÓN MÉNDEZ**

Presidente: DR. RUY PÉREZ TAMAYO  
Vocal: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ  
Secretario: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA DE LEÓN MÉNDEZ  
Suplente: DR. MAX JULIO SCHMULSON WASSERMAN  
Suplente: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de septiembre de 2010

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## AGRADECIMIENTOS

- Gracias al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de México.
- Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de este proyecto.
- Gracias a mi comité tutorial por su apoyo, guía y dirección en la realización del presente trabajo:
  - Dr. Jaime Berumen Campos,
  - Dr. Ruy Pérez Tamayo,
  - Dra. Ma. del Carmen García de León Méndez.

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mis sinodales, sin cuya guía y orientación no hubiese sido posible culminar el proyecto: Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez, Dr. Jaime Berumen Campos, Dr. Max Julio Schmulson Wasserman, Dr. Ruy Pérez Tamayo y a la Dra. Ma. del Carmen García de León Méndez.
- ❖ Al Dr. Ruy Pérez Tamayo, por sus acertadas sugerencias, por el tiempo invertido en la revisión del presente trabajo y por permitirme llevar a cabo este proyecto de investigación en su laboratorio.
- ❖ Al Dr. Jaime Berumen Campos, director de Medicina Genómica del Hospital General de México, por su valiosa participación en la realización de este trabajo, así como facilitarme el equipo y los medios necesarios para llevar a buen término este proyecto.
- ❖ A la Dra. María del Carmen por su confianza, apoyo y por creer en mí como su alumno y como persona.
- ❖ A mis amigas: Gaby, Ingrid y Valería por su amor, comprensión, tiempo, dedicación y paciencia durante estos 3 años.
- ❖ Al personal del bioterio: A Don Ricardo, Don Sergio, Daniel, Israel y Omar.
- ❖ A Omar Agni por toda su paciencia y ayuda para la edición de esta tesis.
- ❖ Y muy especialmente a mi madre y hermanos por todo lo que soy.

## GRACIAS

## ÍNDICE

### PAGÍNA

RESUMEN	.....	1
ABSTRACT	.....	2
INTRODUCCIÓN	.....	3
HIPOTESIS	.....	14
OBJETIVO	.....	14
JUSTIFICACIÓN	.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS	.....	16
RESULTADOS	.....	32
DISCUSIÓN	.....	54
CONCLUSIÓN	.....	62
BIBLIOGRAFÍA	.....	64
APÉNDICE I:		
(MATRIZ EXTRACELULAR)	.....	77
APÉNDICE II:		
(CÉLULAS DEL HÍGADO)	.....	83
APÉNDICE III:		
(MODELOS ANIMALES)	.....	92

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

PÁGINA

TABLAS	
Tabla 1 .....	36
Tabla 2 .....	37
Tabla 3 .....	38
Tabla 4 .....	39
Tabla 5 .....	40
Tabla 6 .....	41
Tabla 7 .....	44
Tabla 8 .....	45
Tabla 9 .....	47
Tabla 10 .....	48
Tabla 11 .....	51

FIGURAS	
Figura 1 .....	12
Figura 2 .....	28
Figura 3 .....	31
Figura 4 .....	32
Figura 5 .....	33
Figura 6 .....	33
Figura 7 .....	34
Figura 8 .....	34
Figura 9 .....	35
Figura 10 .....	49
Figura 11 .....	50
Figura 12 .....	50
Figura 13 .....	52
Figura 14 .....	53
Figura 15 .....	63



## ABREVIATURAS (DE SUS SIGLAS EN INGLES)

CYP2E1	Citocromo P450
FMOs	Flavinmono-oxigenasa
i.p.	Vía intraperitoneal
CCl4	Tetracloruro de Carbono
DAVID	The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
dde	Agua doble destilada
DMN	Dimetilnitrosamina
EGF	Epidermal growth factor
FACITs	Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices
FDR	Fold discovery rate
HCV	Hepatitis C,
HSC	Celulas Estelares Hepáticas
MEC	Matriz Extracelular
NASH	Hepatitis no alcoholica
OH-prol	Hidroxi-Prolina
PPAR´s	Peroxisome proliferator-activated receptor
ROS	Especies Reactivas de Oxigeno
SAM	Significance Analysis of Microarrays
SEC	Celulas Endoteliales Sinusoidales
TAA	Tioacetamida
TGF-β1	Transforming growth factor β1
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

## RESUMEN

La cirrosis hepática es una de las principales causas de muerte en México de sujetos entre los 25 a 50 años de edad. Una vez establecida la enfermedad, es muy poco lo que la medicina actual puede ofrecer al paciente además de un tratamiento sintomático. Una de las principales razones de la insuficiencia terapéutica es el desconocimiento de los mecanismos moleculares que producen el trastorno hepático y lo hacen irreversible. Entre sus características anatómicas sobresale un exceso de tejido fibroso que adopta diferente morfología dependiendo de la etiología y etapa de la enfermedad. Aunque exista una necesidad urgente de biomarcadores hepato-específicos no invasivos para el diagnóstico de fibrosis hepática, actualmente no hay ningún parámetro o panel disponibles, que cumplan con todos los criterios de diagnóstico rentables, y confiables, requeridos para su uso extenso. En este trabajo se pretende crear un patrón de expresión génica para establecer a futuro, una prueba diagnóstica para detectar fibrosis hepática en etapas tempranas, a través de modelos experimentales de fibrosis inducida en ratas, empleando como hepatotóxico, tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), analizado a través de la metodología de microarreglos y monitoreado mediante pruebas de funcionamiento hepático, análisis histológicos y concentración de colágena. Con el estudio realizado al modelo, conformamos un grupo de genes candidatos involucrados con el proceso fibrótico, para evaluarlos como posibles biomarcadores, dentro de los cuales pudimos identificar y validar el gen de Mfap4 como posible biomarcador para fibrosis hepática.

## **ABSTRACT**

The hepatic cirrhosis is one of the leading causes of death in people 25 to 50 years old in Mexico. The disease once established there is not much that the current medicine can offer to patient besides a symptomatic treatment. The main reason for treatment failure is the lack of knowledge of the molecular mechanisms that cause liver disease and make it irreversible. Among its anatomical characteristics there stands out an excess of fibrous tissue which adopts different morphology depending on the etiology and stage of the disease. Although there is an urgent need for liver-specific noninvasive biomarkers for diagnosis of liver fibrosis, currently there are no parameters or panel available that included all the diagnostic criteria beneficial, reliable, and required for widespread use.

This thesis aims to create a pattern of gene expression to establish in a future, a diagnostic test to detect liver fibrosis in early stages, through experimental model of fibrosis induced in rats. For that purpose we use carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) as hepatotoxic, analyzed by mi-croarray methodology and monitored by liver function tests, histological analysis and collagen concentration. In the model analysis, we formed a group of candidate genes involved in the fibrotic process to evaluate them as potential biomarkers, among which we identify and validate Mfap4 gene as a potential biomarker for liver fibrosis.

## INTRODUCCIÓN

### *Anatomía del hígado*

El hígado desempeña un papel único como centro metabólico del cuerpo. Su peso promedio en individuos adultos es de aproximadamente de  $1\ 400 \pm 270$  g, sin diferencias significativas relacionadas con el género. Se compone de cinco tipos distintos de células que ocupan cerca del 80% de su volumen. El 20% restante corresponde a los espacios extracelulares y los componentes de la matriz extracelular. (Rojkind &, Greenwel, 1994).

El tejido hepático se organiza a nivel microscópico, en lóbulos formados por placas constituidas por células que se extienden desde la zona porta en forma lineal a la vena central; los espacios que atraviesan los tabiques son los sinusoides hepáticos, separados de los hepatocitos por el espacio perisinusoidal de Disse. Los sinusoides hepáticos, con un diámetro medio de 5 a 7  $\mu\text{m}$ , conducen la sangre mezclada de las ramificaciones terminales de la arteria hepática y de la vena porta a la ramificación terminal de la vena hepática. Los sinusoides representan la única forma de tubo capilar en el hígado y tienen un revestimiento endotelial continuo, pero fenestrado, células de Kupffer y células dendríticas dentro de la luz y ausencia de una membrana basal continua, y un espacio perisinusoidal (espacio de Disse).

Los sinusoides y el espacio de Disse se comunican a través de las ventanas o fenestras de las células endoteliales sinusoidales (SEC). La ausencia de membrana basal facilita el intercambio rápido de componentes de la sangre con los hepatocitos. Los sinusoides hepáticos conectan los espacios porta con las ramas terminales de la vena hepática (venas centrales). Las células endoteliales de la arteria hepática son alargadas y arregladas longitudinalmente, mientras que las de las venas porta y central son poligonales y aplanadas, y poseen microvellosidades (Kmiec, 2001).

El endotelio sinusoidal cuya estructura es señalada como el filtro del hígado, es probablemente el blanco principal del estrés oxidativo, este permite estratégicamente el libre intercambio de proteínas y otros nutrientes entre los hepatocitos y la sangre, además de aislarlos de la mayoría de las células sanguíneas, de las plaquetas y de partículas coloidales más grandes, como los quilomicrones y los virus (Cogger y cols., 2004).

### *Fisiología de la fibrosis*

La fibrosis es una respuesta común del hígado, en las lesiones crónicas producidas por una variedad de agresiones, como enfermedades metabólicas, infecciones virales, abuso en la ingesta de alcohol, drogas, y ataque autoinmune a los hepatocitos, conductos biliares, o anomalías congénitas.

En el hígado normal el espacio de Disse tiene una matriz semejante a una membrana basal, no densa a los electrones. La matriz extracelular (MEC) subendotelial normal es necesaria para el mantenimiento de las funciones diferenciadas de todas las células residentes en el hígado. En el hígado fibrótico los componentes de la MEC son similares a los presentes en hígado normal pero aumentan cuantitativamente. Se presenta además, una redistribución de las cantidades relativas de dichos componentes sobre todo en el espacio porta ó en la vena central, lo que lleva al desarrollo de conexiones fibrosas de una estructura vascular a otra; por lo tanto, la principal consecuencia, no es solo la expansión de la MEC, sino la interrupción de la vascularización normal del lóbulo hepático (Bedossa & Paradis, 2003).

La fibrosis, incluyen variaciones en el contenido total de componentes de la MEC (colá-gena y otros), los cuales se incrementan de 3 a 5 veces, acompañados por la transformación en el tipo de matriz en el espacio subendotelial, de una estructura normal de tipo membrana basal de baja densidad, a una de tipo intersticial con alto contenido de colágena fibrilar. Este cambio se acompaña de la pérdida de la naturaleza fenestrada del endotelio sinusoidal (capilarización) y de las microvellosidades de los hepatocitos, lo cual contribuye al deterioro de la función del órgano; el daño hepático se acompaña además de la activación de las

células de Kupffer lo que favorece la activación paracrina de las células estelares (Friedman, 2000).

El hígado normal, permite el libre intercambio entre las células del hígado y el flujo sanguíneo debido a la constitución porosa de las células endoteliales sinusoidales (SEC) y la escasez de MEC en el espacio perisinusoidal; por lo tanto, la capilarización del sinusoide deteriora poderosamente este intercambio. Además, debido a las conexiones directas entre las células y su entorno, cualquier modificación cuantitativa o cualitativa del microambiente de la MEC influenciará las funciones celulares, produciendo deterioro de la función del hepatocito y cambios en el fenotipo de las células estelares hepáticas (HSC). Estos cambios ilustran la función principal de la MEC en el hígado, no solamente como almacén para su arquitectura, sino también como una red continua entre las células que permite, vía sus propios receptores, el intercambio continuo de señales entre ellas (Bedossa & Paradis, 2003).

Aunque la fibrosis es un acontecimiento biológico importante por sí mismo, que representa un desequilibrio entre la síntesis y degradación de las moléculas de la MEC, se asocia además con otros mecanismos esenciales en el órgano tales como distorsión arquitectónica y redistribución vascular, que en conjunto con los depósitos fibrosos, contribuyen a las graves consecuencias para la función hepática.

La agresión está presente por meses o años antes de que se acumule una cicatriz significativa, aunque este tiempo puede acortarse cuando se trata de enfermedad hepática congénita. La fibrosis hepática es reversible, mientras que la cirrosis, estado final consecuencia de la fibrosis, generalmente es irreversible.

Al estudiar la patogenia de la fibrosis se ha puesto atención especial en su frecuente asociación con el incremento de la peroxidación de lípidos y/o la alteración del sistema anti-oxidativo. La ruptura oxidativa de los lípidos de la membrana puede deberse a su interacción con gran variedad de radicales libres y se caracteriza por el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales orgánicos inter-medios durante el proceso de propagación (reacción en

cadena). Este proceso, mediado por radicales libres, está implicado frecuentemente en el cambio del equi-librio oxido-reductor intracelular hacia la oxidación, lo que bioquímicamente se define como estrés oxidativo (Poli & Parola, 1997).

Los blancos biológicos principales de los radicales libres y las ROS son las proteínas, los lípidos y el DNA. La peroxidación de los lípidos ocurre principalmente en la membrana plasmática alterando sus propiedades físicas y como consecuencia sus funciones biológicas.

Los hepatocitos y las células de Kupffer son una fuente de ROS; éstos compuestos ejercen una estimulación paracrina sobre las HSCs, cuya actividad *in vivo* se amplifica por la pérdida de antioxidantes, como ocurre típicamente en la enfermedad hepática. El medio de cultivo condicionado de hepatocitos, adicionado a cultivos de HSCs, induce estrés oxidativo en éstas células, incrementando su proliferación y la síntesis de colágena. La sobre-expresión en las HSCs de la enzima citocromo p450 2E1, cuya actividad genera ROS, estimula la expresión del gen de colágena I, la cual es atenuada por antioxidantes. Las SEC dañadas estimulan la producción de una variante celular de fibronectina (isoforma EIIIA) que tiene un efecto activador sobre las HSCs, adicionalmente, las SEC convierten el factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 latente (TGF- $\beta$ 1) a su forma activa a través de la acción de la plasmina, proceso que a su vez desencadena la formación de la cicatriz constituida por fibras complejas de MEC, lo que contribuye a la pérdida de las microvellosidades de los hepatocitos y la capilarización del sinusoide con el consiguiente deterioro de la función hepática (Friedman, 2000).

Las manifestaciones clínicas de la fibrosis pueden variar extensamente, desde la ausencia de sintomatología hasta la instauración de la insuficiencia hepática.

En promedio, un 40% de pacientes con cirrosis son asintomáticos y pueden permanecer así por más de una década, sin embargo el deterioro progresivo es inevitable una vez que se presentan las complicaciones tales como insuficiencia hepática, ascitis, varices esofágicas, encefalopatía, etc. Entre estos pacientes existe hasta un 50% de mortalidad en 5 años, y aproximadamente el 70% de estas

muerres son atribuibles directamente a la enfermedad hepática (Milani y cols., 2005).

La biopsia que es el "estándar de oro" en el diagnóstico hepático ampliamente utilizada, además de su capacidad de invasión tiende a atraer muchos contratiempos, tales como el error de muestreo (se obtiene alrededor de 1 / 50 000 de la masa hepática), la calidad de la muestra es irreproducible en función de la longitud y tamaño del tejido (coeficiente de variación de 45% -35%). Es una evaluación histológica estrictamente dependiente de la experiencia del patólogo (error del observador), las consideraciones éticas evitan que sean tomadas múltiples biopsias del hígado de los pacientes y los resultados generados tienden a ser representativos solamente de una enfermedad relativamente avanzada (Gressner y cols, 2007; Iredale, 2007 )

#### *Biomarcadores de fibrosis hepática*

La búsqueda de biomarcadores específicos de fibrosis hepática se ha aplicado en la investigación sobre tejidos y suero, y estos han sido empleados para comprender los procesos biológicos fundamentales y sus interrelaciones, para ser usados como herramienta en el desarrollo diagnóstico y terapéutico. En particular, son escasos los marcadores no invasivos (localizados en suero o líquidos biológicos), que indiquen con certeza la actividad fibrogénica.

Gressner A.M. y cols. (2007, 2009), realizaron una búsqueda sistemática en la literatura empleando bases de datos electrónicas y listas de referencias de publicaciones relevantes, para determinar una serie de biomarcadores de fibrosis no invasivos. Partiendo de este estudio, diferenciaron dos clases de biomarcadores que pueden definirse como: **clase I**, componentes del suero que tienen una relación directa con el mecanismo de fibrogénesis, ya sea como mediadores del recambio o síntesis de matriz extracelular, o como elementos relacionados con la misma MEC, secretados por fibroblastos y células estelares hepáticas activados, o, que reflejan principalmente la actividad del proceso



fibrogénico. Muchos de ellos, sin embargo, han resultado ser decepcionantes en cuanto a sensibilidad y especificidad. Hasta ahora el ácido hialurónico resultó ser relativamente, el mejor marcador de tipo I, en suero.

Los **clase II**, en general, comprenden algo más que pruebas estándar de laboratorio que están agrupadas en paneles que cumplen con la mayoría de los criterios para la detección y clasificación de la fibrosis, relacionadas en menor medida, con la actividad fibrogénica. Existen más de 20 pruebas diagnósticas disponibles en la actualidad, entre los que el Fibrotest™ es el más popular.

Prevalece por lo tanto una necesidad urgente de determinar marcadores de fibrosis hepática mediante métodos no invasivos por diversas razones, una de ellas es la existencia de más de 170 millones de pacientes infectados con el virus de la hepatitis C (HCV) en todo el mundo, que corresponden a un 3% de la población mundial. Por otra parte, actualmente no se conoce un ensayo sérico estándar, estudio de imagen, o análisis virológico, que pueda distinguir a aquellos individuos que estén en riesgo de padecer fibrosis progresiva, sin ser expuestos a los riesgos potenciales, tanto por inconveniencia y costo de la biopsia hepática y de su interpretación. Si existiera un análisis confiable, no invasor, para excluir certeramente la posibilidad de desarrollar fibrosis significativa, tales pacientes podrían ser monitoreados regularmente para confirmar la ausencia de progresión de la fibrosis

Con la expectativa del desarrollo de terapias antifibróticas se abre la necesidad de la supervisión temprana y la regulación de la respuesta a dichas terapias para establecer su eficacia y optimizar su dosificación. La necesidad de tal supervisión frecuente rebasa la posibilidad de realizar la biopsia hepática percutánea o transyugular (Gressner y cols, 2007)

Tanto los avances de la biología molecular, como el desarrollo de modelos de ratones transgénicos, y la utilización de cultivos celulares de diferentes tipos, han permitido la determinación de funciones patogénicas específicas de células individuales durante los procesos fibróticos.

No existe un modelo experimental que reproduzca exactamente la fibrosis hepática humana por etiología; no obstante, cada uno de los modelos desarrollados, han servido para realzar nuestra comprensión de los mecanismos patogénicos de la fibrosis en el órgano. Se han obtenido resultados importantes derivados de diversos modelos, el mejor ejemplo, es el esclarecimiento de la función de las células estelares hepáticas en el proceso de fibrogénesis. La implicación de éstas células en este proceso fue observada constantemente en los modelos experimentales, sin importar si el estímulo fibrogénico fuese alimenticio, hepatotóxico o inmunológico. Los mecanismos celulares y moleculares de la activación de las HSC entre otros, han comenzado a ser explorados en diversos modelos. Otro ejemplo es el papel de TGF- $\beta$  en la fibrogénesis del hígado (Schuppan y cols., 2001)

Los modelos de fibrosis hepática se pueden clasificar en tres grupos, los cuales tienen ventajas y desventajas específicas. El primer grupo incluye los cultivos celulares, en los cuales se estudian *in vitro* células primarias aisladas de hígado normal o dañado experimentalmente. Este tipo del modelo facilita el estudio detallado del comportamiento de la célula y del efecto de mediadores específicos, pero no puede recapitular claramente los acontecimientos que ocurren *in vivo* resultantes de la interacción compleja de las células entrantes y residentes en un microambiente.

El segundo grupo incluye los tejidos humanos tomados en la biopsia o después de la resección hepática. Los estudios que implican este tipo de modelos son esenciales para validar las observaciones hechas en cultivo de tejidos y modelo animales. La selección cuidadosa de muestras y el uso de técnicas moleculares modernas garantizan que pueda ser generada una gran cantidad de información de tal o cual tejido. Sin embargo, las consideraciones éticas evitan que sean tomadas múltiples biopsias del hígado de los pacientes con propósitos de investigación, donde la información resultante tiende a ser limitada a los datos de la "foto". Además, los resultados generados tienden a ser representativos solamente de una enfermedad relativamente avanzada (Iredale, 2007).

Para tratar de resolver las cuestiones planteadas por el uso de los primeros dos tipos mencionados, y también para describir un proceso potencialmente dinámico, se utiliza un tercer tipo el cual incluye modelos experimentales de fibrosis. Los modelos animales tienen solo una gran desventaja, que no son humanos. Sin embargo, permiten el muestreo serial del tejido en el volumen requerido para los estudios detallados de la patogénesis celular y molecular. Además, el desarrollo de herramientas moleculares modernas y de animales genéticamente modificados, permite que los modelos animales puedan ser aplicados a estudios mecánicos de fibrosis en los cuales se desregulan los mediadores individuales o los tipos de células (Iredale, 2007).

Los elementos indispensables de un modelo empleado para estudiar fibrosis incluyen: fácil aplicabilidad, limitada duración de la inducción, reproducibilidad y peligro mínimo al personal. Varios modelos animales han sido introducidos para producir fibrosis hepática, ya sea inducida por agentes hepatotóxicos como: drogas dietéticas, alcohol, ligadura de los conductos biliares y activación inmunológica. La inducción de cirrosis por medio de drogas hepatotóxicas como  $\text{CCl}_4$ , TAA y dimetilnitrosamina (DMN) y la ligadura de los conductos biliares son los modelos experimentales más conocidos (Tsuqueamoto y cols., 1990).

Un modelo experimental de cirrosis hepática empleado con frecuencia es la respuesta del hígado a la droga hepatotóxica tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), el cual induce peroxidación de los lípidos de la membrana del hepatocito y dependiendo de la dosis, tiempo de exposición, o la edad de los animales empleados, puede resultar en la regresión del proceso, con la recuperación casi completa del hígado (Friedman, 2000). La cirrosis experimental inducida por  $\text{CCl}_4$  parece reproducir superficialmente las características principales de la enfermedad humana, el hígado es nodular, hay indicios de hipertensión portal y la arquitectura normal es substituida por nódulos de células hepáticas en regeneración, rodeadas por tabiques de tejido conjuntivo con proliferación de conductos biliares y desarrollo de anastomosis porta-cava tal como ocurre en el hombre. Es un potente hepatotóxico, el cual, con una sola dosis conduce rápidamente a la necrosis y esteatosis graves. La necrosis hepática causada por el  $\text{CCl}_4$  se debe a la

producción de radicales libres producidos a partir de la vía del citocromo P450 (CYP2E1). La unión covalente de tricloruro de metilo a proteínas celulares está considerada como el primer paso entre los eventos secuenciales que producen la peroxidación lipídica de la membrana, cuyo punto final es la necrosis celular (Jeong, 1999; Zimmerman, 1999, Rosenberg y cols., 2000).

La tioacetamida (TAA) es otro hepatotóxico potente que requiere ser activado metabólicamente por diversas oxidasas. En general, los citocromos (CYP2B, CYP2E1), y la flavin mono-oxigenasa (FMOs) transforman la TAA, en subproductos tóxicos (Hunter et al., 1977, Wang et al., 2000) y metabolitos intermedios que pueden unirse a proteínas celulares formando derivados de acetilimidolisina (Dyroff y Neal, 1981). La TAA aparentemente se convierte en óxido de tioacetamida que a su vez se transforma en un metabolito tóxico activo que se une covalentemente a moléculas tisulares, induciendo la necrosis (Zimmerman, 1999).

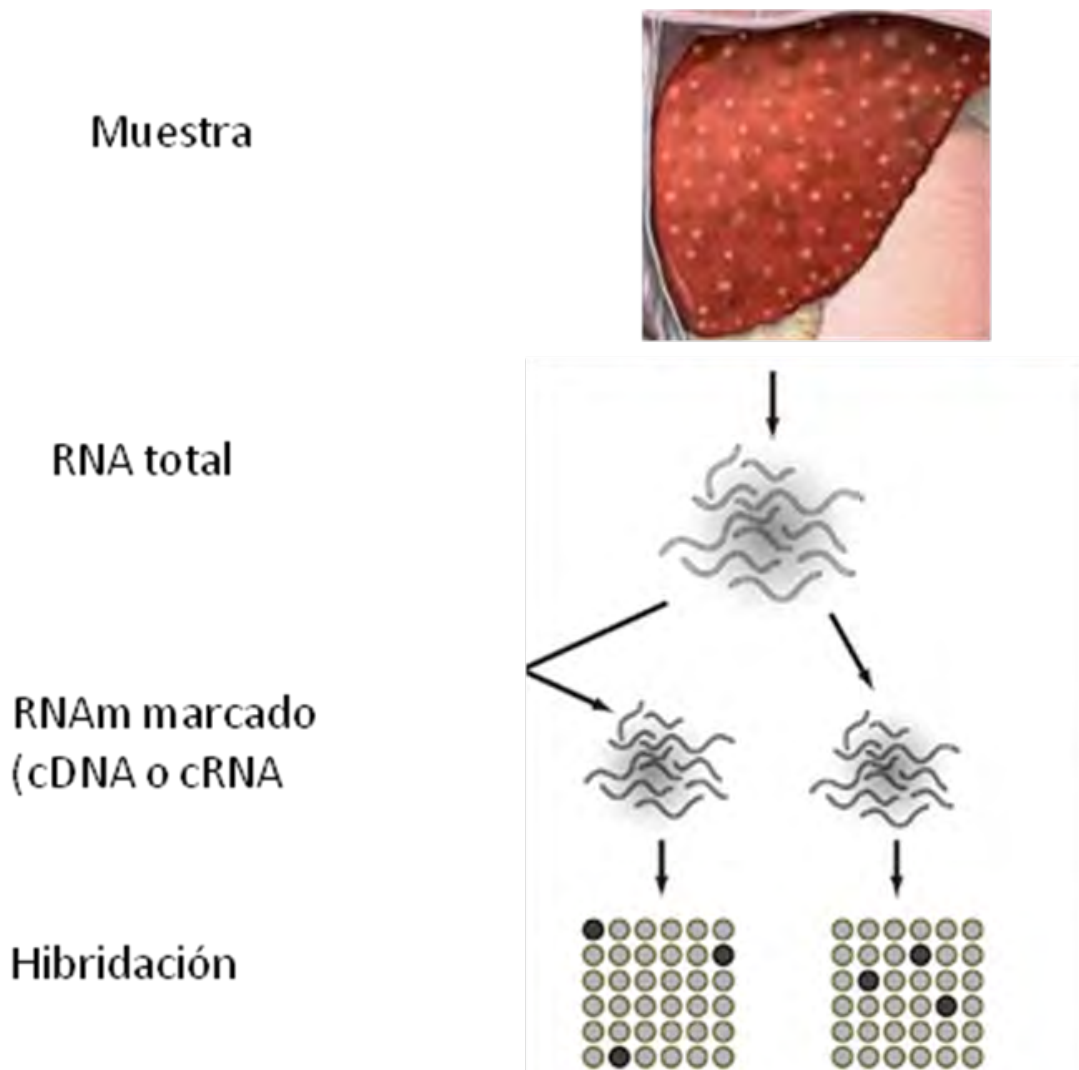
### *Microarreglos*

Las tecnologías utilizadas para la búsqueda de biomarcadores incluyen análisis tradicionales in vitro de las variaciones y expresión del DNA, RNA y proteínas, y la cuantificación de metabolitos, así como las mediciones in vivo de los procesos biológicos en seres humanos y animales, utilizando imágenes morfológicas y tecnologías funcionales. La importancia de las mediciones se correlaciona con su capacidad de predicción para los puntos clínicamente relevantes, tales como el pronóstico de la enfermedad, y la respuesta a la terapéutica, por mencionar algunos ejemplos.

A finales de 1990, surgió la tecnología de microarreglos de DNA como una poderosa herramienta para el análisis de los niveles de los transcritos de RNAm expresados en diversas situaciones. Los oligonucleótidos pueden ser impresos en un chip por métodos fotolitográficos. Los arreglos de DNA son utilizados para analizar la expresión de genes, monitorizándose los niveles de miles de ellos de forma simultánea permitiendo obtener información acerca de la muestra que se esté trabajando (Schena y cols., 1995).

Los productos de PCR también pueden ser vistos en los chips de microarreglos de DNA. A pesar de que sus valores no siempre se correlacionan, la información sobre los niveles de expresión del RNAm y la abundancia de la proteína correspondiente (o su actividad) son sin duda útiles en el análisis genómico (Tomizaki y cols., 2010).

Figura 1.- Diagrama de metodología de Microarreglos



El RNA total se aísla de cada muestra seguida de diversos pasos para enriquecer y en algunos casos para amplificar cRNAs. Este material, cDNA o en el caso de la amplificación cRNA, se etiqueta directa o indirectamente generando un cDNA en una reacción de transcripción inversa con nucleótidos marcados y se hibridan en un microarreglo, los cambios en la expresión de los genes se determinan por medio de la cuantificación de la fluorescencia emitida por cada punto del microarreglo (hibrido formado) (Harm van Bakel and Frank C.P. Holstege, 2008). Estos datos pueden analizarse utilizando los programas y bases de datos que se han diseñado para contener la información resultante de la expresión de los microarreglos, entre las más conocidas se encuentran SAM (Significance Analysis of Microarrays, Flex Array, DAVID (The **D**atabase for **A**nnotation, **V**isualization and **I**ntegrated **D**iscovery), Ingenuity, Ace View por mencionar algunas.

## **HIPÓTESIS**

Los diferentes modelos experimentales empleados para reproducir la fibrosis-cirrosis generan patrones genéticos propios derivados del agente causal, que al analizarlos en conjunto podrían caracterizar las diferentes etapas del desarrollo de la fibrosis hepática, que permitan extrapolarse al padecimiento humano.

### **Objetivo**

- Identificar y validar los genes que sufren alteraciones a lo largo del proceso inductivo de fibrosis hepática y correlacionarlos con las vías metabólicas en las que intervienen para obtener un perfil molecular que pueda ser empleado para el desarrollo a futuro de una prueba pronóstica y/o diagnóstica para fibrosis hepática

### **Objetivos Particulares**

- Inducir fibrosis-cirrosis en ratas machos a través de la inyección intraperitoneal de CCl<sub>4</sub>.
- Obtener muestras hepáticas para procesamiento de microarreglos y para las determinaciones histológicas y de colágena.
- Obtener RNA y cDNA para la hibridación en el microarreglo.
- Analizar los datos obtenidos del microarreglo en los programas SAM y DAVID
- Validar los genes obtenidos del análisis de expresión.

## **Justificación**

La cirrosis hepática es una de las principales causas de muerte en México entre sujetos de 25 a 50 años de edad. Una vez establecida la enfermedad, es muy poco lo que la medicina actual puede ofrecer al paciente, además de un tratamiento sintomático. Una de las principales razones de la insuficiencia terapéutica es que actualmente no existe ningún parámetro o combinación de ellos, disponibles, que cumplan con todos los criterios de diagnóstico requeridos para su uso extenso, rentable, y confiable para diagnóstico. Por lo que en este trabajo se pretende establecer un perfil molecular a través del estudio de los genes que se ven alterados durante el desarrollo de la fibrosis hepática en etapas tempranas, que a futuro integrarán probablemente un panel de diagnóstico para fibrosis hepática.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Animales*

Se emplearon ratas Wistar, machos, de 150-200 g de peso, alimentadas *ad libitum* con agua y purina y los animales se manejaron siguiendo los lineamientos marcados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas y la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Al término del tratamiento de cada grupo, los animales se sacrificaron por exsanguinación cardíaca bajo anestesia con éter.

### *Modelo Experimental y obtención de muestras*

La cirrosis fue inducida de acuerdo a lo establecido previamente (*Pérez-Tamayo y cols., 1987; Montfort y cols., 1990; García de León y cols 2005*). Cada animal fue inyectado vía intraperitoneal (i.p.) con 0.25 ml de CCl<sub>4</sub> al 33 % en aceite de olivo, dos veces por semana, durante 20 semanas.

Se prepararon 2 grupos como sigue:

Grupo	Animales Experimentales	Tiempo de Tratamiento
CCl <sub>4</sub>	0.25 ml de solución al 33 % de CCl <sub>4</sub> en Aceite de oliva	20 semanas
Control	Sin tratamiento	20 semanas

De cada grupo de animales se tomaron muestras de tejido hepático a las 4 semanas de iniciado el tratamiento (Fase I), una muestra intermedia que vario según el tipo de agente causal (Fase II), al finalizar el esquema de inyecciones

(Fase III), y dos más a los 30 (Fase IV) y a los 180 días posteriores a la suspensión del tratamiento (Fase V).

Con estas muestras se obtuvieron en tres fragmentos, uno para la extracción del RNA total empleado para la elaboración de los micro arreglos, con el segundo fragmento se prepararon cortes histológicos los cuales una vez fijados e incluidos en parafina, se utilizaron para el análisis histopatológico con tinciones de H y E y rojo de Sirio, y el tercer fragmento se utilizó para el cálculo del contenido de colágena, con el fin de monitorear la evolución de la fibrosis en el modelo.

Estas mismas muestras servirán para verificar la validación de los posibles genes alterados (RT-PCR en tiempo real y/o ELISA e inmunohistoquímica), obtenidos en el análisis de micro arreglos.

#### **Determinación de la concentración de colágena mediante la técnica de Hidroxi-Prolina (OH-prol).** (J. F. Woessner, 1961)

Se utilizaron muestras de 100 mg de tejido hepático deshidratado los cuales se colocaron en una ampolleta de cristal con 5 ml de HCl 6N y se sellaron al vacío. Se mantuvieron a 100°C durante 24 hrs hasta obtener la hidrólisis del tejido, el contenido de la ampolleta se filtró, se le estimó el volumen total y posteriormente se neutralizó con NaOH. De la solución neutralizada se tomaron 0.5 ml a los cuales se les adicionó 1.5 ml de agua doble destilada (dde), se colocaron en tubos de cristal de 20 ml, se les adicionó 1 ml de cloramina T, se agitaron vigorosamente, y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente.

Al cabo de la incubación se les adicionó 1 ml de ácido perclórico 2.5 M, se agitaron vigorosamente e inmediatamente se les añadió p-dimetil aminobenzaldehído (pDAB), se agitaron hasta mezclar perfectamente y se incubaron a 60°C durante 20 min. Una vez terminada la incubación, se agitaron y dejaron enfriar y se determinó la concentración de OH-Prol

espectrofotométricamente a una longitud de onda de 557 nm, interpolando estos resultados a la curva estándar de OH-Prol.

Para la Curva Estándar: Se preparó una solución de OH-Prol de 0.01mg/ml, de la cual se realizaron diluciones seriadas para obtener las concentraciones finales de 100, 200, 400, 600, 800 µg, y 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 y 2 mg de OH-Prol, y aplicamos la misma técnica mencionada arriba. Se determinó su absorbancia a 557 nm y se construyó una curva, sobre la cual fueron extrapoladas las lecturas de los problemas. Los datos obtenidos se aplicaron a la siguiente fórmula con la cual obtuvimos la concentración de colágena (en mg) por mg de tejido.

$$\text{mg Col} = (\mu\text{g de OH-prol} / 1000) \times 7.42$$

### **Extracción de RNA**

*Obtención de RNA.* (Se utiliza el método de extracción de Trizol, INVITROGEN)

En un tubo de plástico estéril se colocaron 100 mg de hígado de rata, se agregó 1.0 ml de trizol (Invitrogen) y se homogenizó con politrón incubando por 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µl de cloroformo, la mezcla se agitó vigorosamente incubando 3 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 8000 g a 8 °C por 15 min y se tomó la fase acuosa (parte superior) que correspondió aproximadamente al 60 % del volumen inicial de trizol y se transfirió a otro tubo estéril de 1.5 ml.

*Precipitación de RNA.*

A la fase acuosa, obtenida previamente, se le adicionó alcohol isopropílico a una relación 1:1 v/v, se homogenizó e incubó 10 min a temperatura ambiente, y se centrifugó a 12000 g a 8 °C por 10 min, observándose un precipitado blanco correspondiente al RNA. El precipitado se lavó con etanol al 75 % y se dejó secar al aire. El RNA obtenido se disolvió en 50 µl de agua estéril, se tomaron 2 µl de esta solución y se mezclaron con 98 µl de agua estéril para medir la absorbancia a 260 y 280 nm y determinar su pureza y concentración. Se almacena cada muestra ajustada a 1µg/µl de RNA a -70°C.

## **MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN (GeneChip Rat gene 1.0 ST Array)**

Todo el trabajo experimental de microarreglos, se llevo acabo en la Unidad de Medicina Genomica del Hospital General de México a cargo del Dr. Jaime Berumen Campos.

Se tomaron fragmentos de hígado de cada rata los cuales se les extrajo el RNA total se procesaron para obtener su cDNA marcado y posteriormente se aplicaron individualmente en un CHIP, del tipo GeneChip Rat gene 1.0 ST Array de Affimetrix, que consta de 27,342 genes de rata en total, como se describe a continuación.

**\*\*\*\*\*Todas las reacciones mencionadas a lo largo de la técnica se llevan a cabo sobre hielo.**

### *Preparación de los controles Poli-A*

Se descongelan los reactivos en el momento (controles poli-A y su amortiguador de dilución), preparar una dilución de la solución stock de poli A 1:50 en tubo eppendorf de 1.5 ml con el amortiguador descongelado previamente, agitar muy bien, centrifugar y dejar en hielo.

### *Preparación de los iniciadores T7/ Controles Poli-A*

Del kit de amplificación de cDNA WT (Whole Transcript), los viales de los iniciadores T7 y y poli A se descongelaron, agitaron y centrifugaron. Se preparó en un tubo eppendorf la solución de trabajo (volumen final 20 µl), quedando a una concentración de 250 ng/µl de los iniciadores T7 y una dilución final 1:500 de los controles poli-A se agitaron y centrifugaron, y se dejaron en hielo.

### *Preparación de RNA/iniciadores T7/ Controles Poli-A*

Después de cuantificar y revisar la integridad del RNA se prepararon diluciones de cada RNA total para obtener una concentración final de 100 ng/µl se preparó en una mezcla de reacción con 3µl (300 ng de RNA total) y 2 µl de la solución de

iniciadores T7/ Controles Poli-A preparada anteriormente, los tubos se agitaron y centrifugaron y fueron colocados en el termociclador con el programa siguiente:

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
70	5
4	2

*Síntesis de primera cadena de cDNA: 1er. Ciclo*

Del kit de amplificación de cDNA WT, se preparó un Master mix con las cantidades enmarcadas en la tabla siguiente:

Componentes	[Concentración inicial]	Vol. µl.
Amortiguador de 1 <sup>ra</sup> cadena	5x	2.0
DTT	0.01 M	1.0
dNTP mix	10 mM	0.5
Inhibidor de RNAsa		0.5
Super Script II		1.0
Total		5.0

Una vez terminado el ciclo de 7 min, se adicionó a cada tubo 5 µl del Master Mix preparado anteriormente, se ajustaron a un volumen final de 10µl, y se colocaron nuevamente en el termociclador con el siguiente programa:

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
25	10
42	60
70	10
4	2*

**\*No exceder de 10 min de incubación a 4°C.**

### Síntesis de 2da. Cadena: 1er. Ciclo

Se preparó el Master Mix de la 2<sup>da</sup> cadena de acuerdo a la siguiente tabla:

Componente	[Inicial]	Vol. $\mu$ l
H <sub>2</sub> O Libre de RNasas		4.8
MgCl <sub>2</sub>	17.5 mM	4.0
dNTP mix	10 mM	0.4
DNA pol I		0.6
Rnasa H		0.2
Total		10.0

Una vez que la reacción de la 1<sup>ra</sup> cadena ha terminado se le adicionó al mismo tubo 10  $\mu$ l del Master Mix de la 2<sup>da</sup> cadena. se ajustó el volumen a 20 $\mu$ l, y se colocaron los tubos nuevamente en el termociclador con el programa siguiente:

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
16 **	120
75	10
4	2

No dejar que la reacción exceda 10 min a 4°C

\*\* Incubar en el termociclador con la tapa abierta

### Síntesis de cRNA: 1<sup>er</sup>. Ciclo

Se preparó el Master Mix IVT (*in vitro* transcripción) con las siguientes concentraciones:

Componentes	Vol. $\mu$ l
Buffer IVT	5
NTP IVT mix	20
Mix de enzimas IVT	5
Total	30

Una vez realizado el 1<sup>er</sup> ciclo de la reacción. para la 2<sup>da</sup> cadena se adicionaron 30µl del Master Mix IVT a cada uno de los tubos, y se ajustó a un volumen final de 50µl y se colocaron en el termociclador con el siguiente programa:

Temperatura (°C)	Tiempo (hr)
37	16
4	Mantener a

### *Limpieza de cRNA*

Una vez que se ha completado la reacción de transcripción *in vitro* se adicionaron 50µl de agua libre de RNAsas a cada tubo, se agitó y centrifugó cada tubo, y se transfirió la solución final (100µl) a un tubo de 1.5 ml al cual se añadieron 350 µl de amortiguador de unión de cRNA la mezcla se agitó y centrifugó, se le adicionaron 250 µl de etanol absoluto y se mezcló suavemente. Se agregó esta mezcla de 700 µl de amortiguador de lavado, a una columna de limpieza de cRNA y se centrifugó durante 15 seg a 8960 G a 4°C. Se descartó el sobrenadante, la columna se transfirió a un nuevo tubo colector, se realizó un nuevo lavado con 500 µl de amortiguador, se descartó el sobrenadante y se le agregaron a la columna 500µl de etanol al 80%, se centrifugó por 15 seg a 8960 G a 4°C, se descartó el sobrenadante y se centrifugó durante 5 min a máxima velocidad la columna seca se pasó a un nuevo tubo de 1.5 ml, se le adicionaron 15 µl de agua libre de RNAsa directamente a la membrana y se dejó incubar 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a máxima velocidad a 4 °C por 1 min, se colectó el líquido centrifugado y se volvió a adicionar a la columna de limpieza, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó a máxima velocidad a 4°C; el eluido obtenido es el cRNA el cual fue cuantificado espectrofotométricamente a 260 nm.

### *Síntesis de 1<sup>ra</sup> cadena 2do. Ciclo*

A continuación se preparó la siguiente mezcla:

Componentes	[Inicial]	Vol. $\mu$ l
cRNA	10 $\mu$ g	
Random primers	3 $\mu$ g	1.5
H2O libre de RNAsa		
Total		8.0

Una vez preparada la mezcla con el cRNA se colocó en el termociclador con el siguiente programa:

Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo (min)
70	5
25	5
4	2

### *Preparación del Master Mix 1ra. cadena: 2do. Ciclo*

Se preparó el Master Mix 1ra cadena: 2do. Ciclo con las siguientes cantidades:

Componentes	[Stock]	Vol. $\mu$ l 1x
Amortiguador 1ra. cadena	5x	4.00
DTT	0.1M	2.00
dNTP+dUTP	10mM	1.25
Super Script II		4.75
Total		12.0



- Una vez terminado el 2do ciclo de la reacción de síntesis de la 1<sup>ra</sup> cadena se agregaron a cada tubo 12 µl del Master Mix de la 1<sup>ra</sup> cadena, dejando un volumen final de 20µl, y se colocaron en el termociclador con el programa siguiente:

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
25	10
42	90
70	10
4	2

#### *Hidrólisis de cRNA.*

Una vez finalizado el segundo ciclo de la reacción de la 1ra cadena, se le agregó al mismo tubo 1µl de la enzima Rnasa H a cada una de las muestras, se agitaron y centrifugaron, ajustando a un volumen final de 21 µl, y se colocaron en el termociclador utilizando el programa siguiente:

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
37	45
95	5
4	2

#### *Limpieza de cDNA*

A la muestra de cRNA hidrolizada se le adicionaron 80µl de agua libre de RNAsas y esta solución se colocó en un tubo de 1.5 ml y se le adicionaron 370µl de amortiguador de unión de cDNA, se agitó y centrifugo, se ajustó el volumen a 471µl, se transfirió a una columna de limpieza de cDNA, se centrifugó durante 1 min a 8960 G, se descartaron el sobrenadante y el tubo colector, y la columna se transfirió a un nuevo tubo colector, la columna se lavó con 750 µl de amortiguador de lavado se centrifugó durante 1 min a 8960 G a 4°C, se descartó el sobrenadante y se centrifugó durante 5 min a máxima velocidad a 4°C con la columna destapada, nuevamente se descartaron el sobrenadante y el tubo

colector, y la columna se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml, se adicionaron 15  $\mu$ l de amortiguador de elución directamente a la membrana de la columna y se dejó incubar 1 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó 1 min a máxima velocidad a 4°C, y se adicionaron al mismo tubo 15 $\mu$ l de amortiguador de elución de cDNA y se dejó incubar 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó 1 min a máxima velocidad a 4°C. El ssDNA se cuantificó y se determinó su pureza espectrofotométricamente.

### *Fragmentación del ssDNA*

Se preparó el master mix de fragmentación con las siguientes cantidades:

Componente	[Stock]	Vol. $\mu$ l 1x
H2O		10
Amortiguador de Fragmentación	10x	4.8
UDG	10 U/ $\mu$ l	1
APE1	1000 U/ $\mu$ l	1
Total		16.8

Para realizar la fragmentación se emplearon 5.5  $\mu$ g de ssDNA en un volumen final de 31.2 $\mu$ l con agua libre de RNAsa a los cuales se les adicionaron 16.8  $\mu$ l del amortiguador de fragmentación, se agitaron y se centrifugaron para colocarlos en el termociclador con las siguientes condiciones:

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
37	60
93	2
4	2

### Marcaje del ssDNA

Se preparó el Master Mix de marcaje con las siguientes cantidades:

Componentes	[Stock]	[Final]	Vol. $\mu$ l 1x
ssDNA			45
Amortiguador TdT	5x	1x	12
TdT	30 U/ $\mu$ l	1 U/ $\mu$ l	2
Reactivo de Marcaje	5mM	0.08mM	1
Total			60

Una vez que se ha preparado el master mix de marcaje se agitó y se centrifugó y se colocó en el en el termociclador con el programa siguiente:

Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo (min)
37	60
70	10
4	2

### Hibridación del ssDNA en el chip rat 1st

Los controles de hibridación deben incubarse a 65 $^{\circ}$ C durante 5 min antes de preparar el master mix de hibridación con las siguientes cantidades:

Componentes	[Stock]	[Final]	Vol. $\mu$ l 1x
DNA Marcado		25ng/ $\mu$ l	27
Oligo B2	3nM	0.05nM	1.7
Ctls.de Hibridación	20x	1x	5.0
Mix de Hibridación	2x	1x	50
DMSO	100%	7%	7.0
H2O libre de RNAsa			9.3
Total			100

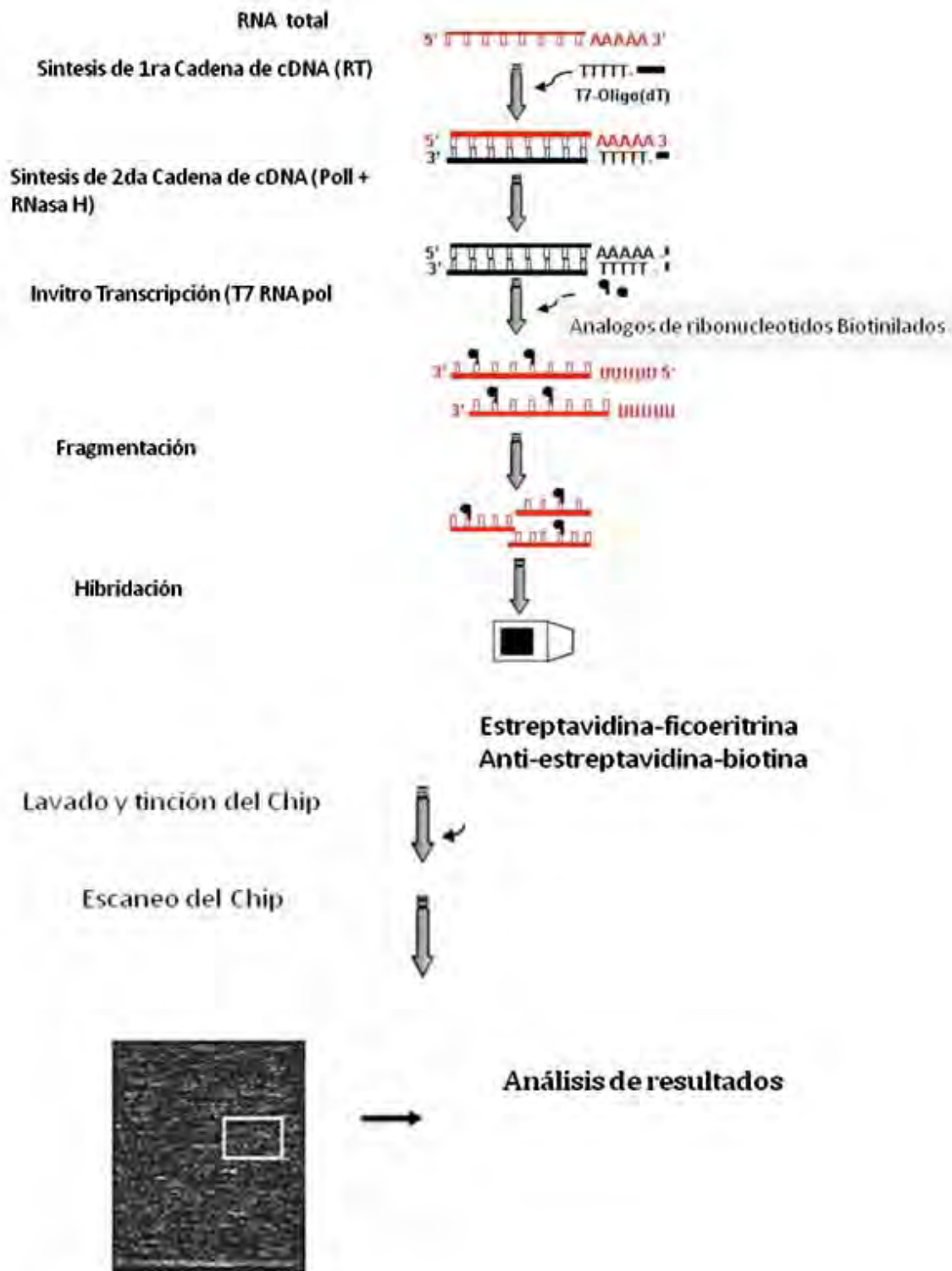
Se colocó el chip a temperatura ambiente. Una vez que se ha preparado la mezcla se incubó primero a 99°C durante 5 min, y después a 45°C por 5 min; terminada la última incubación, se centrifugó a máxima velocidad por 1 min, se tomaron 80 µl del master mix de hibridación para inyectarlos en el chip, se sellaron las entradas del chip y se colocó en las canastillas del horno de hibridación y se incubó a 45°C a 60 rpm durante 17 hrs.

#### *Lavado y Teñido del Chip*

En la consola de expresión de Affymetrix se registro el experimento, posteriormente se encendió la estación de fluidos y se corrió el programa prime 450 con agua desionizada; una vez que la estación de fluidos se ha lavado con agua desionizada, se corrió el programa prime 450 con amortiguador A y B. Una vez terminada la hibridación, se toma el chip y se extrajo el mix de hibridación (80µl) y se llenó el chip con 100µl de amortiguador A. Se alícuotaron 600 µl de cocktail de teñido 1 y teñido 2, se alícuotaron 800µl de amortiguador de mantenimiento en tubos eppendorf de 1.5 ml protegidos de la luz, se agitó y centrifugó. Se corrió el protocolo FS450\_0007 para teñir los chips. Se corrió el protocolo prime 450 con agua desionizada una vez finalizado el protocolo de tinción.

Los análisis estadísticos se realizaron una vez que los datos fueron normalizados por la consola de expresión de Affymetrix. Estos datos fueron introducidos al programa estadístico SAM (Significance Analysis of Microarrays), que es una prueba de T modificada por Tusher ( Tibshirani y Chu en el 2001), usando un valor de cambio de 1.5 veces; estos genes se introdujeron a su vez a DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery ) el cual hace una serie de Clusters de genes siendo estos los más importantes de acuerdo al valor de p y el valor de enriquecimiento en el genoma ( Dennis Jr. y cols., 2003).

Fig 2.- Diagrama de flujo del procesamiento de los microarreglos.



## Metodología PCR Tiempo Real (qPCR)

El qPCR es uno de los métodos empleados para validar los genes seleccionados como candidatos. Para realizar el qPCR se obtuvo el cDNA a partir de la transcripción reversa del RNA total obtenido de las muestras de hígado de cada uno de los animales (experimentales y controles) que conformaron el modelo, empleando el Kit de retrotranscripción “Inphusion” marca Finy Enzyme y se siguió el protocolo siguiente:

\*\*Utilizar guantes y realizar la técnica utilizando siempre hielo.

Se preparó la mezcla de reacción para el RT-PCR utilizando las siguientes cantidades:

Componentes	[concentración]
RNA	1.0 µg
dNTP's	10 mM
Oligo (dT)	1.0 µl
H <sub>2</sub> O libre de RNAasa	10 µl

Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 min para desnaturalizar el RNA, en este momento se preparó la segunda mezcla de reacción con las siguientes cantidades:

Componentes	Volumen final
Amortiguador RT 10 X	2µl
Mezcla de encimas RT	2µl
H <sub>2</sub> O libre de RNAasa	6µl

De esta mezcla de reacción se tomaron 10µl y se agregaron al tubo que contenía la primera reacción, se agitó para obtener una mezcla homogénea y se centrifugó brevemente, colocándose en el termociclador para realizar la retrotranscripción con el siguiente programa:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Extensión	25	10
cDNA síntesis	40	30
Terminación	85	5
Mantenimiento	4	Mantener a

Una vez terminada la reacción el cDNA obtenido se cuantificó espectrofotométricamente para determinar su concentración.

#### PCR tiempo real

Se utilizó el kit de amplificación de la marca Applied Biosystems, sondas TaqMan específicas para el gen (patentado), que codifica la proteína Mfap4, empleándose como control endógeno el gen para GAPDH utilizando reacciones monoplex.

Para realizar esta reacción se preparó la siguiente mezcla:

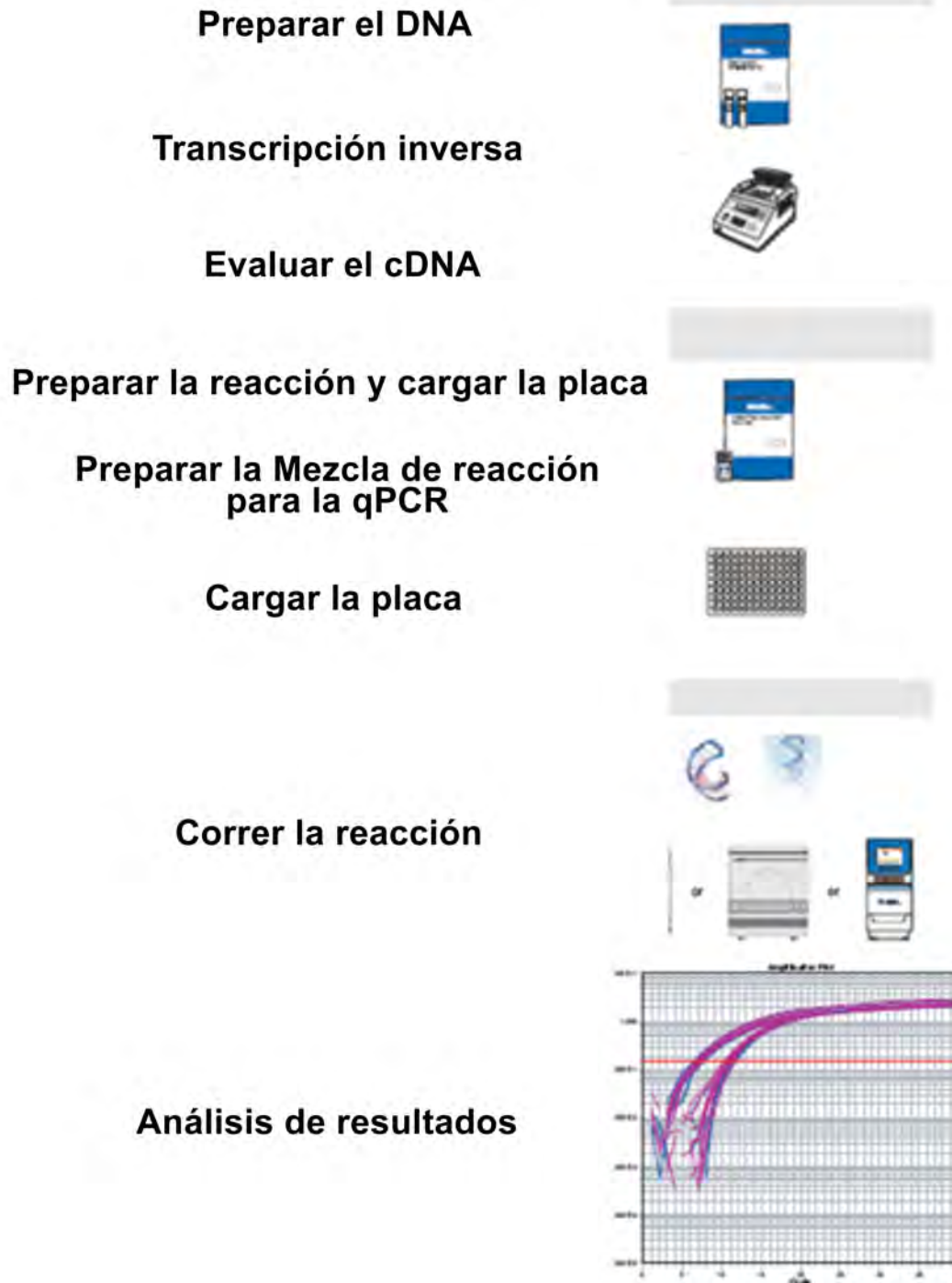
Componentes	[concentración]	Volumen final $\mu$ l
Sonda TaqMan GE	20 X	1
Master Mix TaqMan GE	2 X	10
cDNA	500 ng	
H <sub>2</sub> O libre de RNAasa		

Una vez preparada la reacción se agitó vigorosamente y se centrifugó brevemente, se colocó en la placa cuidadosamente sin crear burbujas, una vez cargada la placa, se selló, se agitó y se centrifugó brevemente, y se colocó en el equipo 7300 de marca Applied Biosystem con las siguientes condiciones:

Estado	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Mantener	50	2.00
Mantener	95	10.0
40 ciclos	95	0.25
	60	1.00

Una vez terminada la reacción los datos se analizaron a través del método “menos doble delta CT ( $2^{-\Delta\Delta}$ )”.

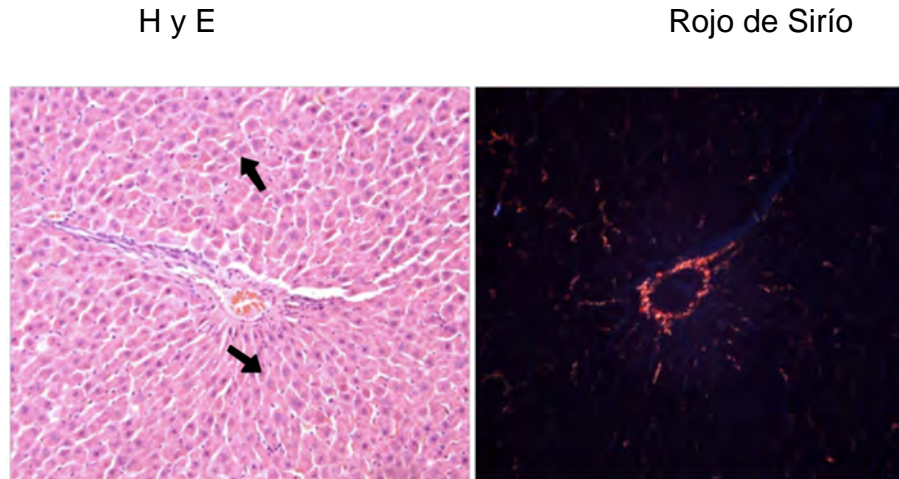
**Fig. 3.- Metodología PCR Tiempo Real (qPCR) (Modificado del protocolo de Applied Biosystem)**





## Resultados

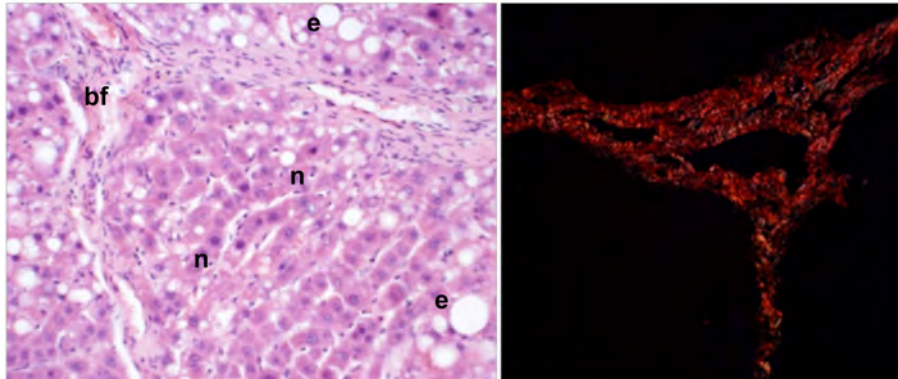
A partir de la Fase I observamos desarrollo de fibrosis, el cual se transforma en cirrosis en los grupos subsecuentes (II-III) El contenido de colágena de los grupos I-V, fue de 19, 34, 51, 35 y 26 mg de colágena/ mg tejido (tabla 1 y Fig. 10), respectivamente. Al realizar la observación de los cortes histológicos de los modelos experimentales se advierten diferencias marcadas entre los controles y los animales experimentales en cuanto al depósito de matriz extracelular, la cual aumenta gradualmente conforme se desarrolla el modelo experimental ( Figuras 5-10). En el pie de cada figura se describen las características histológicas representativas de cada fase del modelo.



**Fig. 4.- Control Normal:** Los hepatocitos son poligonales, con citoplasma granular y núcleo central, redondo y con nucléolo prominente (flechas). Los sinusoides se hayan tapizados por células elongadas (células endoteliales y de Kupffer), próximas a los hepatocitos, quedando el espacio de Disse como una región casi virtual.

H y E

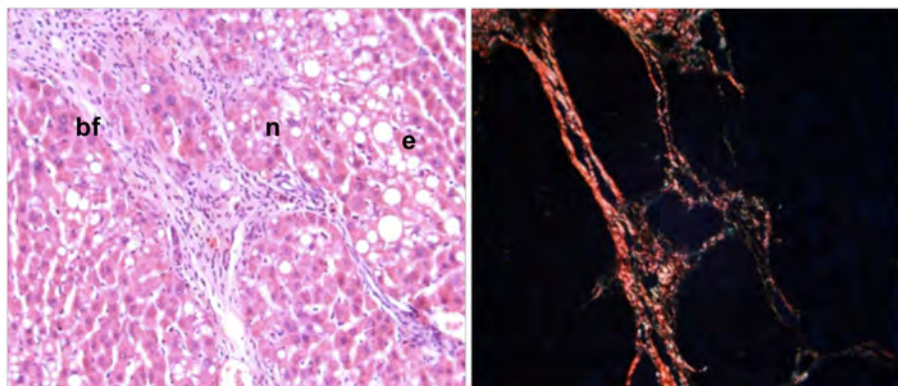
Rojo de Sirio



**Fig. 5.- Fase I** Se muestra el inicio de alteración estructural debido a la presencia de bandas de fibrosis periportal (bf) y múltiples vesículas pequeñas de esteatosis (e) con núcleos que conservan su posición central (n).

H y E

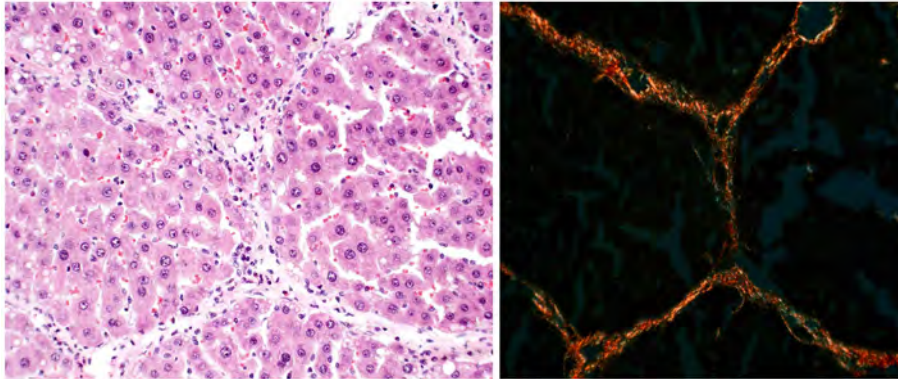
Rojo de Sirio



**Fig. 6.- Fase II** Se observan zonas con bandas gruesas y delgadas de fibrosis periportal (bf), lagunas de esteatosis(e) con vesículas redondeadas, grandes y pequeñas en hepatocitos centrolobulillares. En el citoplasma de los hepatocitos hay zonas vacías con desplazamiento de los núcleos a la periferia(n).

H y E

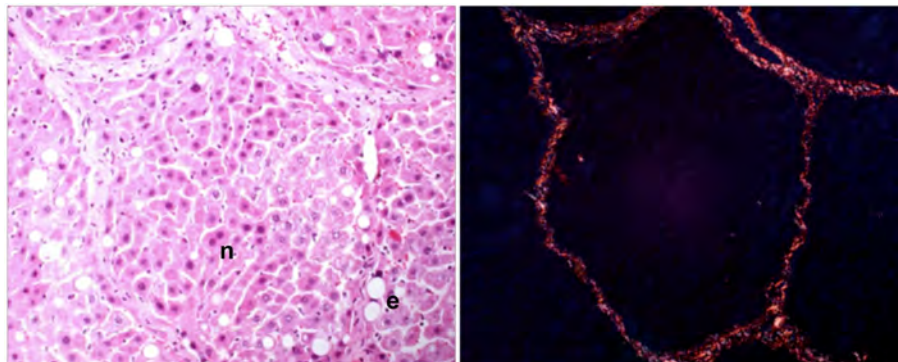
Rojo de Sirio



**Fig. 7.- Fase III.** Hígado cirrótico, con nódulos de regeneración rodeados por bandas de tejido fibrótico que van de vena porta a vena centrolobulillar, acompañado de mínimas zonas de esteatosis, caracterizadas por vesículas de gota gruesa y hepatocitos binucleados de mayor tamaño.

H y E

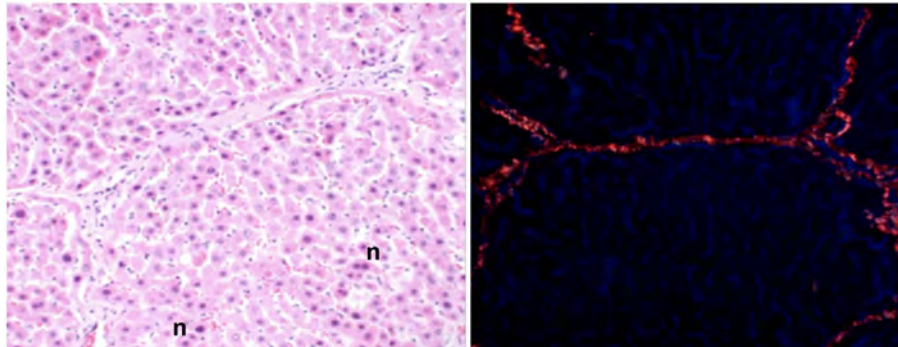
Rojo de Sirio



**Fig. 8.- Fase IV.** La arquitectura hepática presenta un estado cirrótico con zonas de necrosis focal, esteatosis mínima (e), nódulos de regeneración rodeados por bandas de tejido fibrótico que van de vena porta a vena centrolobulillar. Hepatocitos con hiper cromatismo nuclear, binucleación (n) y pérdida de la relación núcleo-citoplasma.

H y E

Rojo de Sirío



**Fig. 9.- Fase V** La arquitectura hepática presenta un estado cirrótico con nula presencia de esteatosis, nódulos de regeneración rodeados por bandas gruesas de tejido fibrótico que van de vena porta a vena centrolobulillar. Se observa enucleación, binucleación (n) hiper cromatismo nuclear, y pérdida de la relación núcleo-citoplasma.

#### **Determinación de la concentración de colágena mediante el método de Hidroxi-Prolina**

Existen claras diferencias en la cantidad de colágena depositada en el hígado entre los animales controles y los experimentales, así como en cada una de las fases experimentales en el modelo como se muestra en la tabla 1. Así podemos observar el aumento gradual del depósito de colágena en el hígado de los animales tratados con  $\text{CCl}_4$  desde las fases iniciales, observándose un punto máximo de depósito entre la tercera fase, como era de esperarse, y un decremento progresivo en las fases de recuperación.

Tabla 1.- Concentración de Colágena presente en el hígado de los animales tratados con CCl<sub>4</sub>

Fase	Controles(n=3) mg Colágena/ mg tejido	Experimentales(n=5) mg Colágena/ mg tejido
I	11.83864	19.71547
	+ -	+ -
	3.2889224	3.65188405
II	12.45516	34.03167
	+ -	+ -
	4.61061625	8.66825075
III	15.7658	51.92269
	+ -	+ -
	1.90352493	11.6573333
IV	15.31878	35.30901
	+ -	+ -
	4.33973273	0.18705728
V	15.02607	26.82698
	+ -	+ -
	0.36843578	7.32448101

## Microarreglos

Al realizar los microarreglos del modelo de CCl<sub>4</sub> (un Chip para cada animal experimental (3) y control (2) por fase), el análisis se realizó empleando el programa estadístico SAM que evalúa los genes que permite diferenciar los genes que realmente sufren un cambio en la expresión de otras que varían como fondo del protocolo y con un FDR (fold discovery rate) menor al 10%. Encontramos 239 genes expresados 1.5 veces más que el control, resultados que se resumen en la tabla 2, donde podemos observar que la mayor cantidad de genes sobreexpresados se encontraron en la Fase III experimental; solo en la Fase V encontramos genes reprimidos.

Tabla 2.- Número de genes alterados en su expresión en hígado 1.5 veces más o menos que el control como resultado del tratamiento de ratas con CCl<sub>4</sub>.

Fase	Genes sobre expresados	Genes Reprimidos	Num. Genes
F I	56*	0	56
F II	62	0	62
F III	93	0	93
F IV	14*	0	14
F V	10	4	14

\*Los genes marcados (\*), son genes que tienen un valor de LFDR mayor al 10%.

Estos 239 genes se sometieron una serie de análisis estadístico; los datos reportados fueron analizados finalmente por medio del programa DAVID, que es una base que integra los resultados obtenidos de microarreglos, de acuerdo a las siguientes características: una p menor a 0.05 valores de Fold enrichment y enrichment score altos.

De acuerdo a DAVID los 239 genes están agrupados en 187 clusters, de los cuales sólo 37 de ellos presentaban una p significativa (< 0.05) además, de tomarse en cuenta los valores de 'Enrichment Score' y el 'Fold Enrichment' que son valores que nos dicen cuantas veces esta enriquecido nuestro cluster respecto al genoma total.

Estos clusters abarcan genes involucrados desde procesos de desarrollo de órganos hasta procesos metabólicos como se muestra en la tabla 3.



Tabla 3.- Clusters de los 239 genes obtenidos a través del análisis de DAVID como resultados del tratamiento en ratas con CCl<sub>4</sub>.

Grupo	Valor de Enriquecimiento (ES)	Taza de Enriquecimiento (FE)	Nombre del Grupo	No. Genes	Vaor de P
1	6.796035607	5.16984407	Desarrollo de tejidos	17	6.39E-08
2	6.70471449	8.09366391	Desarrollo del sistema Óseo	12	1.83E-07
3	6.588864258	14.3084416	Osificación	9	1.70E-07
4	6.068284067	2.84546758	Desarrollo de tejidos	26	6.91E-07
5	5.59385778	16.1657754	Organización de la Matriz extracelular	8	5.18E-07
6	5.292479301	8.01973825	Desarrollo de vasculatura	10	3.12E-06
7	4.48801898	7.43743552	Desarrollo de vasos sanguíneos	9	2.20E-05
8	4.48801898	50.5679012	Colágena fibrilar, C-terminal	4	5.30E-05
9	3.795833871	2.52638774	Diferenciación celular	21	9.32E-05
10	3.603125263	4.22474908	Adhesión celular	11	2.15E-04
11	3.602848367	40.4683196	Organización fibrilar de la Colágena	5	5.79E-06
12	3.523430962	2.76313665	Morfogénesis de la estructura anatómica	17	2.38E-04
13	3.324877092	9.13131313	Desarrollo del sistema respiratorio	6	4.61E-04
14	3.197958078	8.4	Cadena de la Colágena alpha 1(I)	3	4.37E-04
15	2.978727142	3.62976695	Morfogénesis de Órganos	11	6.61E-04
16	2.911323916	2.22311102	Regulación positiva de los procesos celulares	21	5.20E-04
17	2.809984979	3.08844746	Regulación de los procesos de desarrollo	12	0.00132961
18	2.802857038	51.8366718	Formación de la trabécula	3	0.00140335
19	2.763544066	4.58033713	Regulación positiva de los procesos de desarrollo	8	0.00158805
20	2.62563703	4.34294161	Formación de la estructura anatómica involucrada en la morfogénesis	8	0.00214922

**ES: Enrichment Score; FR: Fold Enrichment**

Tabla 4- Clusters de los 239 genes obtenidos a través del análisis de DAVID como resultados del tratamiento en ratas con CCl<sub>4</sub>.

Grupo	Valor de Enriquecimiento (ES)	Taza de Enriquecimiento (FE)	Nombre del Grupo	No. Genes	Vaor de P
21	2.502962239	38.1558442	Desarrollo de la cara	3	0.00262619
22	2.466995657	6.13121925	Morfogénesis de Vasos Sanguíneos	6	0.00267651
23	2.338831085	2.88864013	Procesos reproductivos	11	0.00398116
24	2.322575019	2.49106237	Respuesta a sustancias orgánicas	13	0.00455932
25	2.251271983	11.1139706	Remodelado de tejidos	4	0.00532306
26	2.185952145	6.64405246	Procesos catabólicos de lípidos	5	0.00639562
27	2.178287038	8.6394453	Desarrollo de pulmón	5	0.00247505
28	2.149273521	3.56538405	Respuesta a estímulos abióticos	8	0.00639876
29	2.134699418	25.4372294	Procesos metabólicos de colágena	3	0.00591128
30	2.10944881	9.74375504	Substrato de adhesión celular	4	0.00767053
31	2.09787335	5.02381841	Morfogénesis de tejidos	6	0.00623477
32	2.056016497	40.7288136	Presentación y procesamiento de antígenos de péptidos exógenos vía MHC clase II	3	0.00229886
33	2.019940228	9.50338983	Regulación de la Osificación	4	0.00813899
34	2.019573351	3.8066199	Respuesta a drogas	7	0.00934047
35	1.991755847	20.3644068	Morfogénesis del hueso	3	0.00911629
38	1.91426248	4.52542373	Regulación positiva de la diferenciación celular	6	0.009578
63	1.386634909	9.23758594	Respuesta a estímulos mecánicos	4	0.00888117

**ES: Enrichment Score; FR: Fold Enrichment**



Al analizar con más detalle en Access encontramos que solo 50 genes correspondían a los genes alterados con más frecuencia en estos procesos, así que se decidió seleccionar aquellos que tuviera un valor de cambio por arriba del control, que sus funciones estuvieran involucradas con el proceso de fibrosis y que no tuvieran relación con otras patologías que cursaran con fibrosis en otros órganos, estos genes se resumen en la tabla 5. Los cuales fueron distribuidos en 5 procesos, fundamentales, los relacionados con Matriz extracelular, con inmunidad, con proliferación celular, metabolismo de lípidos y otros.

Tabla 5.- Procesos en los que participan los 50 genes seleccionados como candidatos a biomarcadores como resultados del tratamiento en ratas con CCl<sub>4</sub>

<b>Proceso</b>	<b>No. Genes</b>
MEC	23
Proliferación Celular	11
Inmunidad	7
Metabolismo de ácidos grasos	6
Varios	3
<b>Total</b>	<b>50</b>

En la tabla 6 se describe el primer grupo de 23 genes relacionados con procesos que tienen que ver con la Matriz extracelular y sus características, como la función que tienen, su localización, el Enrichment Score y el valor de p.

Como se puede observar, varios de estos genes pertenecen al grupo de las colágenas y proteínas de matriz extracelular como laminina, biglicano, elastina, fibulina, integrinas y metalopeptidasas.

Tabla 6.- Genes que participan en procesos de Matriz Extracelular seleccionados como candidatos a biomarcadores como resultados del tratamiento en ratas con CCl<sub>4</sub>.

Genes de MEC				
Gen	Nombre	Función	Enrichment Score	Valor de p
<b>ADAMTS2</b>	disintegrina-parecida a peptidasa (tipo reprotisina ) con trombospondina tipo 1 , 2	Actividad de metaloendopeptidasa, unión a ión Zinc	6.79	6.39E-08
<b>BGN</b>	Biglicano	Actividad de transferasa, unión a proteínas	6.06	6.91E-07
<b>COL1A1</b>	Colágena, tipo I, alpha 1	Constituyente estructural de Matriz extracelular, proteína de unión, respuesta a ROS	6.79	6.39E-08
<b>COL1A2</b>	Colágena, tipo II, alpha 2	Participa en las vías de comunicación celular, interacción con el receptor de ECM, adhesión focal, constituyente de la ECM	6.79	6.39E-08
<b>COL3A1</b>	Colágena, tipo III, alpha 1	Participa en las vías de comunicación celular, interacción con el receptor de ECM, adhesión focal, constituyente de la ECM	6.79	6.39E-08
<b>COL4A1</b>	Procolágena, tipo IV, alfa 1	Comunicación celular, interacción con el receptor de ECM, adhesión focal, cáncer de pulmón de células pequeñas, constituyente de ECM	6.79	6.39E-08
<b>COL5A2</b>	Colágena, tipo V, alpha 2	Participa en las vías de comunicación celular, interacción con el receptor de ECM, adhesión focal, constituyente de la ECM	6.79	6.39E-08

En negritas: Genes que codifican para proteínas identificadas en el espacio extracelular.

Tabla 6.- Continuación de la página anterior.

Genes de MEC

Gen	Nombre	Función	Enrichment Score	Valor de p
<b>COL6A2</b>	Colágena, tipo VI, alpha 2	Participa en las vías de comunicación celular, interacción con el receptor de ECM, adhesión focal, constituyente de la ECM	2.32	0.004559317
<b>COL6A3</b>	Procolágena, tipo VI, alfa 3	Participa en las vías de comunicación celular, interacción con el receptor de ECM, adhesión focal, constituyente de la ECM	2.32	0.004559317
<b>CYP26A1</b>	Citocromo P450, familia 26, subfamilia A, polipeptido 1.	Unión a Heme, a ión Hierro, a iones metal, actividad de monoxigenasa, acarreador de electrones	6.79	6.39E-08
<b>ELN</b>	Elastina	Confiere elasticidad a los constituyentes de la ECM, unión a proteínas	6.06	6.91E-07
<b>FBLN5</b>	Fibulina 5	Organización de ECM; unión a ión Calcio	5.59	5.18E-07
<b>FBN1</b>	Fibrilina 1	Constituyente estructural de Matriz extracelular, unión a ión Calcio, Zinc y proteínas,	6.7	1.83E-07
<b>FGFR2</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos receptor 2	Participa en las vías de señalización MAPK, cáncer de Próstata, regulación de actina en el citoesqueleto	6.79	6.39E-08
<b>GPNMB</b>	Glicoproteína (transmembrana) nmb	Unión a Heparina e integrinas	6.79	6.39E-08
<b>ITGBL1</b>	Integrina, beta-like 1	Actividad de receptor	3.6	2.15E-04
<b>LAMB1</b>	Laminina, beta 1	Participa en vías de comunicación celular, interacción con receptor de ECM, adhesión focal, enfermedad de Prion, cáncer de pulmón de células pequeñas.	6.06	6.91E-07
<b>MGP</b>	Proteína de matriz Gla	Unión a ión calcio, proteínas de unión dependientes de calcio	6.79	6.39E-08

En negritas: Genes que codifican para proteínas identificadas en el espacio extracelular.

Tabla 6.- Continuación de la página anterior.

Genes de MEC				
Gen	Nombre	Función	Enrichment Score	Valor de p
<b>MMP2</b>	Metalopeptidasa de matriz 2	Participa en las vías de señalización de GnRh, migración transendotelial de leucocitos	6.7	1.83E-07
<b>POSTN</b>	Periostina, factor específico de osteoblastos	Unión a hepárina	6.79	6.39E-08
RGD15643 27	Similar a integrina alpha 8	No determinada	3.6	2.15E-04
<b>TGFB3</b>	Factor de crecimiento transformante, beta 3.	Participa en las vía de Ciclo celular, de MAP y del TGF-B leucemia mieloide crónica, cáncer colorectal, pancreático y carcinoma celular renal	6.7	1.83E-07
<b>TIMP2</b>	TIMP inhibidor de metalopeptidasa 2	Envejecimiento, desarrollo de SNC, regulación negativa de proliferación celular, de ciclo celular mitótico y de la proteólisis	3.79	9.32E-05

En negritas: Genes que codifican para proteínas identificadas en el espacio extracelular.

En la tabla 7 podemos observar el grupo de genes relacionados con la Inmunidad, de los cuales varios de ellos participan en las vías de presentación de Antígenos como el C7, Myo1f, CD74 entre otros.

Tabla 7.- Genes que participan en procesos inmunes seleccionados como candidatos a biomarcadores como resultados del tratamiento en ratas con CCl<sub>4</sub>.

Genes Relacionados con Inmunidad				
Gen	Nombre	Función	Enrichment Score	Valor de p
<b>C7</b>	Componente 7 del complemento	Homeostasis del ión Sodio celular y de los iones celulares , inducción de apoptosis	3.6	2.15E-04
CD74	Molécula Cd74 , complejo mayor de histocompatibilidad, cadena invariante clase II	Presentación y procesamiento de antígenos	6.06	6.91E-07
<b>IGSF10</b>	Superfamilia de las Immunoglobulinas , miembro 10	Actividad de transferasa, unión de ATP, proteínas de unión, actividad de RFGEV, respuesta al estrés y a estímulos externos	6.79	6.39E-08
MYO1F	Miosina IF	Unión a ATP, actividad motora respuesta de defensa para bacterias Gram positivas, regulación negativa de la adhesión celular, degranulación de neutrofilos	2.91	5.20E-04
PDGFD	Factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipeptido D	Participa en las vías de adhesión focal, Uniones estrechas, melanoma	2.91	5.20E-04
<b>RT1-BA</b>	RT1 clase II, locus Ba	Procesamiento y presentación de antígeno, vía de moléculas de adhesión celular (CAM's), diabetes mellitus tipo I	2.91	5.20E-04
<b>RT1-DB1</b>	RT1 clase II, locus Db1	Participa en las vías de procesamiento y presentación de antígenos, moléculas de adhesión celular (CAM's ), Linaje celular hematopoyético, diabetes mellitus tipo I	2.05	0.002298865

En negritas: Genes que codifican para proteínas identificadas en el espacio extracelular.

En la tabla 8 se resumen los genes seleccionados involucrados con procesos de proliferación celular, morfogénesis, desarrollo de tejidos, vías de señalización que regulan el crecimiento de la célula y otros que están involucrados de alguna manera con estos procesos celulares.

Tabla 8.- Genes que participan en procesos de Proliferación Celular seleccionados como candidatos a biomarcadores como resultados del tratamiento en ratas con CCl<sub>4</sub>.

Genes Relacionados con Proliferación Celular				
Gen	Nombre	Función	Enrichment Score	Valor de p
AKAP5	Cinasa A (PRKA) proteína de anclaje 5	Regulación de la organización del citoesqueleto y biogénesis, blanco de proteínas y señales de transducción	6.06	6.91E-07
<b>ALDH1A3</b>	Aldehído deshidrogenasa familia 1, subfamilia A3	Se ha propuesto que participa en las vías de Glicolisis/ gluconeogénesis, metabolismo de Histidina, de Xenobioticos por el citocromo P450 de fenilalanina y de tirosina; Morfogénesis del ojo embrionario	6.79	6.39E-08
<b>CDKN2C</b>	Ciclina-dependiente de cinasa inhibidor 2C (p18, inhibidor CDK4)	Participa en ciclo celular	3.79	9.32E-05
<b>CLEC7A</b>	Lectina dominio tipo-C familia 7, miembro A	Unión a azúcares, a opsoninas, a polisacáridos, Vías de señalización de receptores que reconocen patrones de superficie celular	3.6	2.15E-04
<b>FHL2</b>	four and a half LIM domains 2	Regulación de la transcripción del promotor del RNA de la Polimerasa II, Unión a ión Zinc	6.79	6.39E-08
FIGF	C-fos Factor de crecimiento inducible	Participa en vía de adhesión focal, de señalización de mTOR, cáncer pancreático y carcinoma celular renal	6.06	6.91E-07

En negritas: Genes que codifican para proteínas identificadas en el espacio extracelular.

Tabla 8.- Continuación de la página anterior.

Genes Relacionados con Proliferación Celular

Gen	Nombre	Función	Enrichment Score	Valor de p
<b>IGFBP7</b>	Factor de crecimiento parecido a insulina proteína de unión 7	Unión al factor de crecimiento de insulina	3.6	2.15E-04
<b>LGALS1</b>	Lectina, de union-galactosidasa, soluble, 1	Unión a glicoproteínas, actividad de homodimerización de proteínas, actividad de señales de transducción, unión a azúcares	3.79	9.32E-05
PTK2B	Proteína tirosina cina-sa 2 beta	Participa en la vías de señalización de Calcio, de GnRh, migración transendotelial de leucocitos, citotoxicidad mediadas por Células NK	6.06	6.91E-07
<b>SFRP1</b>	Encoding secreted frizzled-related protein 1.	Vía de señalización de Wnt	6.79	6.39E-08
TCF21	Factor de transcripción 21	Morfogénesis del tracto digestivo embrionario y de órganos, desarrollo de glándulas, regulación de la transcripción	6.79	6.39E-08

En negritas: Genes que codifican para proteínas identificadas en el espacio extracelular.

En la tabla 9 se encuentran los genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos, que se relaciona directamente con la peroxidación de los lípidos y por lo que su metabolismo se encuentra alterado. Algunos de estos genes tienen que ver con el transporte de lípidos, con la vía de los peroxisomas (PPAR's), y catabolismo y anabolismo de ácidos grasos.

Tabla 9.- Genes que participan en procesos del metabolismo de Ácidos Grasos seleccionados como candidatos a biomarcadores como resultados del tratamiento en ratas con CCl<sub>4</sub>.

Genes Relacionados con Ácidos Grasos

Gen	Nombre	Función	Enrichment Score	Valor de p
<b>FABP4</b>	Proteína de unión a ácidos grasos 4	Participa en las vías de señalización de PPAR	3.79	9.32E-05
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa	Participa en la vía de la enfermedad de Alzheimer y PPAR, metabolismo de glicerolípidos	2.91	5.20E-04
<b>PLA2G2A</b>	Fosfolipasa A2, grupo IIA	Se ha propuesto que participa en las vías de ácido araquidónico, GnRh, Fc epsilon RI, MAPK y VEGF, metabolismo de éter lípidos, glicerofosfolípidos, ácido linoleico, depresión a largo término	3.79	9.32E-05
<b>PLA2G7</b>	Fosfolipasa A2, grupo VII (Factor activador de plaquetas acetilhidrolasa, plasma)	Actividad de Hidrolasa	2.18	0.00639562
<b>PLCB2</b>	Fosfolipasa C beta 2	Participa en las vías de señalización de Ca, GnRh, de fosfatidil inositol y de de Wnt, Uniones estrechas, metabolismo de Inositol fosfato, depresión a largo término, potenciación a largo término, melanogénesis, transducción del gusto	2.18	0.00639562
<b>PLD3</b>	Fosfolipasa familia D, miembro 3	Actividad de Hidrolasa, actividad D fosfolipasa	2.18	0.00639562

En negritas: Genes que codifican para proteínas identificadas en el espacio extracelular.



Encontramos también 3 genes que nos parecieron importantes pero que no se relacionaban con ninguna de las clasificaciones anteriores, por lo que se decidió agruparlos como otros genes, incluye al gen *Abcg2*, el cual participa en la vía de transportadores ABC, el gen de Mioferlina para la respuesta a estímulos abióticos y el gen de NCAM1, molécula que participa en adhesión celular (CAM's), como se puede observar en la tabla 10.

Tabla 10.- Genes relacionados con otros procesos seleccionados como candidatos a biomarcadores como resultados del tratamiento en ratas con CCl<sub>4</sub>.

Genes Relacionados con Varios procesos

Gen	Nombre	Función	Enrichment Score	Valor de p
<b>ABCG2</b>	Cassette de unión a ATP, sub-familia G (WHITE), miembro 2	Participa en la vía general de transportadores ABC	2.01	0.009340473
<b>MYOF</b>	Mioferlina	Respuesta a estrés, al calor y a estímulos abióticos	2.14	0.006398764
NCAM1	Molécula de adhesión neural celular 1	Participa en la vía de moléculas de adhesión celular (CAM's)	3.6	2.15E-04

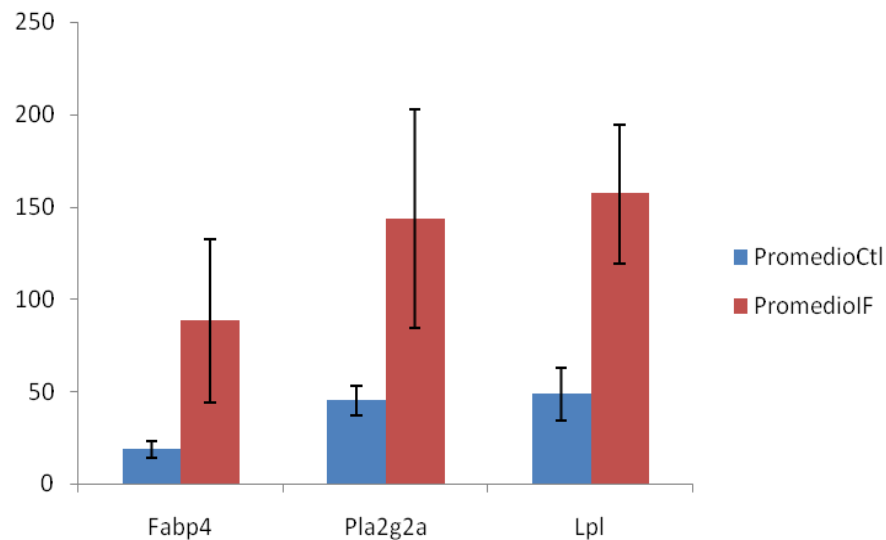
En negritas: Genes que codifican para proteínas identificadas en el espacio extracelular.

Finalmente, A partir de estos 50 genes, tratando de seleccionar los genes candidatos que se pudiesen integrar a un panel detectable en fluidos biológicos, decidimos elegir aquellos que cumplieran con los siguientes requisitos: que fueran genes extracelulares (indicados en negritas en las tablas) o que de alguna manera puedan encontrarse en el espacio extracelular, que su valor de cambio fuera mayor que el del control, que estuviera relacionado con el proceso de fibrosis y que su valor de p fuera significativa. De esta forma se eligieron 20 genes para ser validados como marcadores para fibrosis hepática.

Algunos de estos genes analizados por fase mostraron que su expresión conserva la tendencia del modelo experimental. Los genes seleccionados están enlistados en la tabla 11 en donde se describe el nombre del gen y el valor de cambio en cada una de las 5 fases experimentales.

El análisis de intensidades de expresión mostró algunos genes que se sobre expresan de manera preferencial en alguna de las etapas de la fibrosis. Así, genes que codifican para Fabp4, Pla2ga y Lpl se encuentran sobreexpresados en la fase I (Fig. 10).

Fig.10.- Intensidad de genes de FASE I seleccionados como posibles integrantes del panel de biomarcadores de fibrosis hepática del modelo inducido por CCl<sub>4</sub>.



De igual manera encontramos genes altamente expresados en la FASE II y FASE III que podrían ser buenos biomarcadores para estas fases. Lpl, C7 y Cyp26a1 muestran expresiones de 3, 5 y 6 veces aumentadas respecto al control en la segunda fase, y Pla2g7, Mfap4, Cyp26a1 y C7 para la tercera fase con valores de cambio de 4.75, 4.76, 6 y 6.7 respectivamente como se muestra en las figuras 11 y 12.

Fig. 11.- Genes seleccionados en la FASE II como posibles integrantes del panel de Biomarcadores de fibrosis hepática del modelo inducido por CCl<sub>4</sub>.

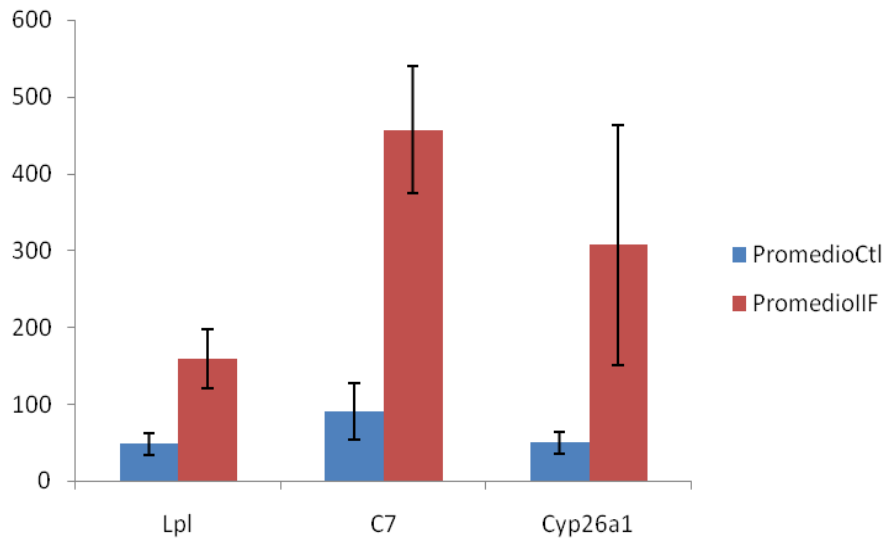
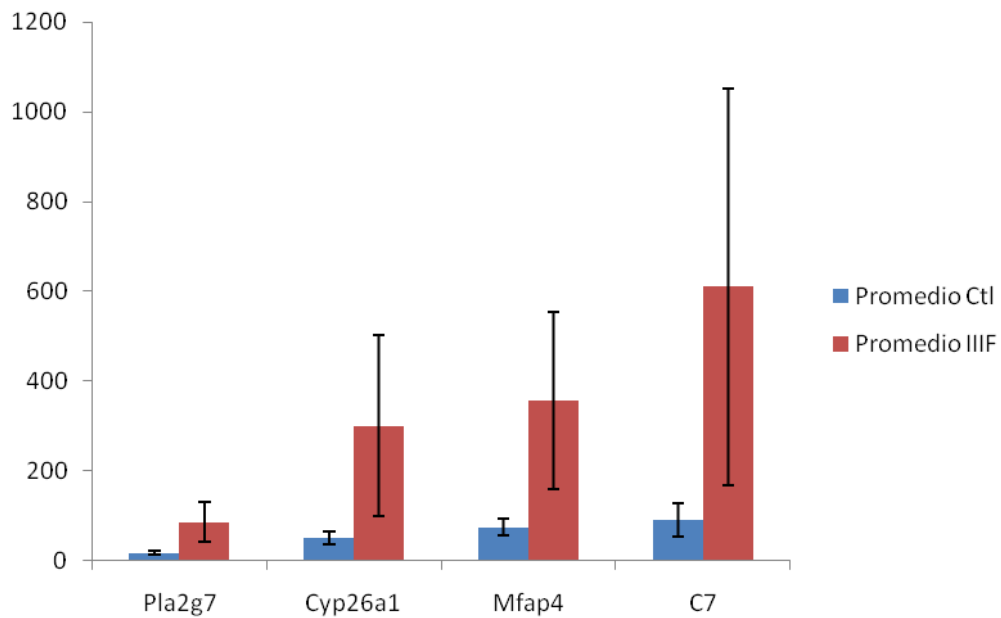


Fig. 12.- Genes seleccionados para validación en la FASE III como posibles integrantes del panel de biomarcadores de fibrosis Hepática del modelo inducido por CCl<sub>4</sub>.

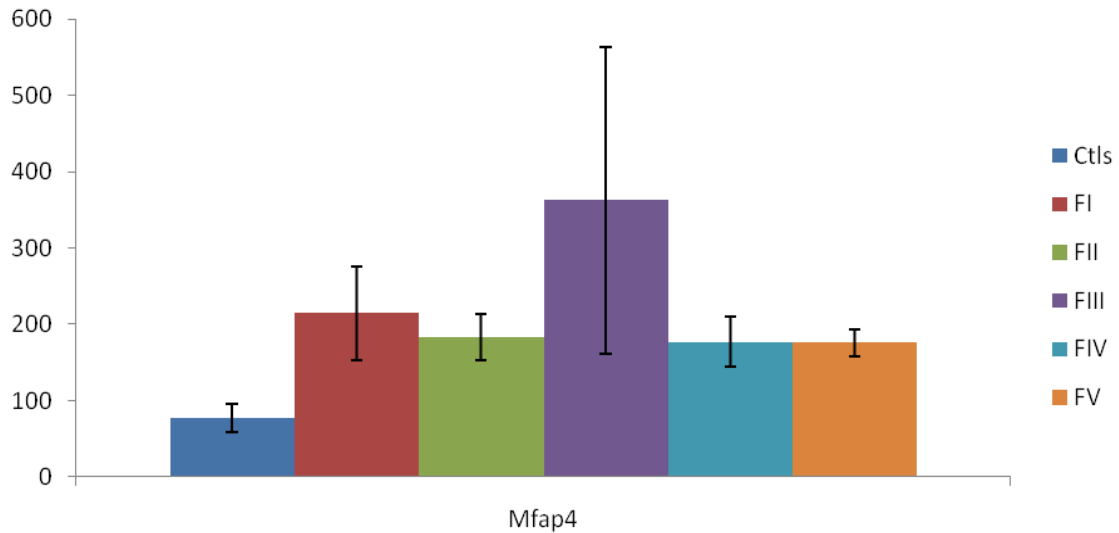


Al final podemos resumir estos genes en la tabla 11 donde se muestran los posibles candidatos por fase experimental, de acuerdo a los valores de cambio y donde este valor no se empalme con el control. Podemos observar que muchos de ellos siguen un comportamiento similar al esperado por el modelo experimental, como C7, Cyp26a1, Mfap4 (fig. 13), que sobresalen como los mayormente sobreexpresados y otros que siguen el mismo comportamiento pero de una manera más discreta como Lpl. Estos datos son importantes para poder establecer un perfil con una o varias moléculas que puedan ayudarnos a detectar estados tempranos de Fibrosis Hepática.

Tabla 11.- Genes seleccionados como posibles integrantes del panel de biomarcadores de fibrosis hepática del modelo inducido por CCl<sub>4</sub> por fase experimental.

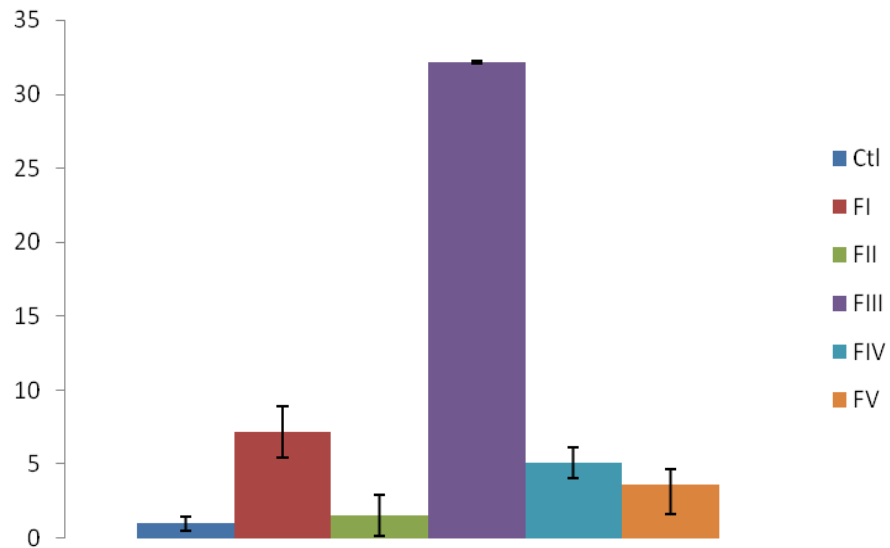
Gen	FASE I	Gen	FASE II	Gen	FASEIII	Gen	FASEIV	Gen	Fase V
Pld3	1.32	Adamts2	1.21	Adamts2	1.83	Aldh1a3	1.52	Adamts2	1.19
Fbn1	1.35	Igfbp7	1.41	Aldh1a3	1.92	Pla2g7	2.1	Mgp	1.75
Igfbp7	1.35	Myof	1.53	Myof	1.98	Mgp	2.14	C7	2.06
Aldh1a3	1.4	Fbn1	1.55	Pdgfd	2.03	Lpl	2.44	Cyp26a1	2.13
Myof	1.44	Aldh1a3	1.65	Igfbp7	2.04	C7	3.11	Mfap4	2.36
Adamts2	1.71	Igsf10	1.66	Fbln5	2.09	Cyp26a1	3.78		
Igsf10	1.74	Fbln5	1.73	Igsf10	2.73				
Tgfb3	2.04	Pld3	1.75	Mgp	3.62				
Postn	2.2	Tgfb3	1.78	Lpl	4.47				
Mgp	2.4	Abcg2	2.01	Pla2g7	4.75				
Pla2g7	2.83	Pla2g7	2.22	Mfap4	4.76				
Pla2g2a	3.17	Mfap4	2.46	Cyp26a1	6.01				
Lpl	3.24	Pla2g2a	2.92	C7	6.73				
C7	3.84	Mgp	2.93						
Fabp4	4.74	Lpl	3.28						
		C7	5.04						
		Cyp26a1	6.13						

Fig. 13.- Comportamiento de la expresión del gen de la proteína Mfap4 a través de las 5 fases experimentales inducidas con CCl<sub>4</sub>.



Mfap4 fue el único gen que se utilizó para validar su expresión a través de PCR tiempo real (qPCR) y se demostró que se encuentra sobreexpresado en las fases experimentales con respecto al grupo control, como se muestra en la figura 14, donde se puede observar que en la Fase I se expresa 7 veces más que su control respectivo, en la Fase II se presenta una disminución en 1.5 veces, pero en la Fase III su expresión aumenta 32 veces más y durante la Fase IV y V observamos un cambio de 5 y 3 veces respectivamente más que el control.

Fig. 14.- qPCR de de la expresión del gen de la proteína Mfap4 a través de las 5 fases experimentales inducidas con CCl<sub>4</sub>.



Estos resultados corroboran el perfil de expresión de Mfap4 en los microarreglos ya que el comportamiento es similar.

## DISCUSIÓN

La fibrosis es una respuesta común del hígado cuando se presenta una lesión crónica producida por una variedad de agresiones, que incluyen: enfermedades metabólicas, infecciones virales, abuso del la ingesta de alcohol, drogas, y ataque autoinmune a los hepatocitos, conductos biliares, o anomalías congénitas (Bedossa & Paradis, 2003). Las alteraciones como la fibrosis que se desarrollan en respuesta al daño hepático, incluyen variaciones en el contenido total de componentes de la MEC (colágena y otros), los cuales se incrementan de 3 a 5 veces, acompañados por la transformación en el tipo de matriz en el espacio subendotelial, de una estructura normal de tipo membrana basal de baja densidad a una de tipo intersticial con alto contenido de colágena fibrilar. Este cambio favorece la pérdida de la naturaleza fenestrada del endotelio sinusoidal (capilarización) y de las microvellosidades de los hepatocitos, lo cual contribuye al deterioro de la función del órgano (Friedman, 2000). La inducción de cirrosis por medio de drogas hepatotóxicas, como CCl<sub>4</sub>, TAA y dimetil-nitrosamina (DMN) y la ligación de los conductos biliares son los modelos experimentales más conocidos (Tsukamoto y cols., 1990). Con el modelo de CCl<sub>4</sub> se produce una acumulación anormal de matriz extracelular (MEC) y se observa la disminución de la expresión de colagenasa, y el desbalance de la expresión de los inhibidores de metaloproteínasa que sugieren la reducción de degradación de MEC.

Aunque existe una necesidad importante de biomarcadores no invasivos hepato-específicos para el diagnóstico de la fibrosis, actualmente no prevalece ningún parámetro o combinación de ellos disponibles que cumplan todos los criterios de diagnóstico requeridos para uso extenso, rentable, y confiable para su diagnóstico. Los marcadores bioquímicos en suero, plasma u orina no están validados para substituir a la biopsia hepática, la cual se considera el estándar de oro (Gressner y cols., 2007). Por lo que el objetivo de este trabajo fue de identificar una serie de moléculas que pudieran formar parte de un perfil de diagnóstico para fibrosis hepática en fases tempranas, a través de un modelo experimental en ratas utilizando CCl<sub>4</sub> como agente inductor. Al realizar las determinaciones de cantidad de colágena encontramos que esta mantenía la tendencia esperada para el

modelo, las tres primeras fases con aumentos graduales y las 2 últimas en las cuales se muestra una recuperación acompañada de una disminución del depósito de colágena, como lo muestra la Fig. 10. Las cantidades expresadas en mg de colágena por mg de tejido varían entre las primeras fases desde 19 hasta 51 mg, siendo esta última la de mayor importancia ya que es donde se observan las distorsiones más severas en la arquitectura sinusoidal como consecuencia de la intoxicación por el CCl<sub>4</sub> (Montfort I y cols., 1990, Scand, 1996).

Los resultados anteriores nos muestran el estado histopatológico en que se encuentra el hígado en las diferentes etapas analizadas, y de este modo nos permite correlacionar los resultados con el análisis que se realizó con la tecnología de microarreglos.

Al proceder a la interpretación de los resultados de los microarreglos fue importante encontrar la estadística más adecuada para el manejo de toda la información obtenida, por lo tanto elegimos el programa SAM (Significance Analysis of Microarrays), que es uno de las herramientas estadísticas más empleadas, reportadas y aceptadas para el análisis de microarreglos; con la ayuda de SAM pudimos distinguir solo aquellos genes que eran realmente significativos (Tusher, Tibshirani and Chu en el 2001), ya que este método nos permite realizar una serie de permutaciones con los datos y aplicar un valor de corte de 1.5 veces el cambio de la expresión de los genes respecto a los controles en cada una de las 5 fases experimentales. En base a este análisis obtuvimos 56 genes para la primera fase con un LFDR arriba del 10%, los cuales consideramos por su significancia para el proyecto ya que pertenecían a procesos de metabolismo y degradación de MEC.

En la segunda fase encontramos 62 genes todos por debajo de un LFDR menor al 10% y con un valor de cambio por encima del establecido, estos genes se relacionan en mayor proporción con procesos inmunológicos, ya que varios de ellos pertenecen al grupo de la superfamilia de las Ig; el principal número de genes alterados se encuentra en la tercera fase con un total de 93 genes



sobreexpresados, este grupo se encuentra relacionado con procesos de metabolismo de lípidos, de MEC, inmunidad entre otros, la cuarta y quinta fase están representadas por 14 genes cada uno, solo que en la quinta fase, 4 de ellos se encuentran reprimidos donde 1 gen, corresponden a la Isovaleril deshidrogenasa de CoA y a un gen para polimerasa, los otros dos no están identificados hasta la fecha.

Los genes de la cuarta fase son muy heterogéneos y sus LFDR son mayores al 10 % pero entre ellos, aparecen genes que son importantes para el proyecto, la quinta fase tiene genes involucrados con MEC, cabe destacar que el patrón de expresión sigue respetando la tendencia general de nuestro modelo, un aumento en las primeras fases con un pico en la tercera fase y un decremento las dos fases restantes.

Para decidir cuál sería la mejor opción para analizar los datos, se hicieron una serie de pruebas estadísticas que incluyeron regresiones lineales simples o con los datos de la colágena, pruebas de T, análisis individuales o por grupos y encontramos que la mejor manera para analizarlos fue tomar las 5 fases, sumando todos los genes y manejarlos en la base de datos DAVID (The **D**atabase for **A**nnotation, **V**isualization and **I**ntegrated **D**iscovery) para identificar los procesos en que están participando los 239 genes, así que a través de una selección del valor de p y el Fold Enrichment de cada uno de los grupos (clusters) de genes, encontramos que 50 de ellos están en 37 clusters significativos, los cuales dividimos en 5 procesos a saber: los genes relacionados con matriz extracelular, metabolismo de lípidos, procesos inmunológicos, procesos de proliferación celular y otros.

El primer grupo, comprende el mayor número de genes y está muy fuertemente relacionado con moléculas de matriz extracelular, lo que robustece nuestro trabajo, ya que como sabemos en el proceso de fibrogénesis la alteración de la arquitectura hepática se debe al aumento (3 a 5 veces) del depósito de moléculas de MEC, colágena, biglicanos, lamininas, fribilina y elastina (Friedman, 2000). El

reflejo de los cambio de las proteínas de matriz nos dicen que nuestro modelo está afectando el metabolismo de la matriz extracelular hepática, dando como resultado la presencia de bandas fibróticas que son muy comunes en esta patología.

El segundo grupo está conformado por aquellos genes que están relacionados con procesos de proliferación celular tales como Aldh1a3, Figf, Cdkn2c, Akap5, Igfbp7, que participan en vías de señalización en el ciclo celular, factores de crecimiento, angiogénesis, y biogénesis, entre otros. Estos procesos son importantes ya que como sabemos el hígado es un órgano con una alto nivel de transcripción génica y con alta capacidad regenerativa (Hubbard, 1994) la cual se presenta en enfermedades de este tipo como respuesta del órgano para contrarestar el daño. En contraparte también existen eventos apoptóticos o de muerte celular que son mediados por los genes mencionados anteriormente. Estos eventos son importantes ya que las ROS o restos celulares son un disparador de la respuesta inmune, que se vió reflejada con la infiltración inflamatoria y por la transición de las HSC a miofibroblastos mediados por citocinas y mitógenos, Igf1 y Igfbp (Gressner, 1998). Estos procesos inmunes conforman nuestro tercer grupo de genes como C7, Igsf10, Cd74, PDGFD, Myo1f.

El cuarto grupo son genes que participan en procesos del metabolismo de Lípidos, en este sentido al estudiar la patogenia de la fibrosis se ha puesto especial atención en la frecuente asociación con el incremento de la peroxidación de lípidos y/o la alteración del sistema anti-oxidativo. La peroxidación de los lípidos ocurre principalmente en la membrana plasmática alterando sus propiedades físicas y como consecuencia sus funciones biológicas (Poli & Parola, 1997). Algunos de estos genes son Fabp4, Lpl y fosfolipasas. En la fisiología de la fibrosis, aún existen lagunas sobre las vías de señalización que pueden estar disparando algunos de los eventos que convergen en fibrosis.

Por último tenemos un quinto grupo formado por 3 genes: Miof, que es un gen del cual no existe mucha información pero se sabe que participa en procesos de respuesta a estrés y a estímulos abióticos, Abcg2 que se encuentra en las vías

generales de transportadores ABC, específicamente transporte de drogas y NCAM1 que es una molécula de adhesión celular (CAM's) que participa en la regulación positiva de las vías de señalización mediadas por Ca.

Un punto importante en nuestro proyecto era encontrar o seleccionar aquellos genes que cumplieran las características de un biomarcador, que se pueda encontrar en el espacio extracelular, que estuvieran relacionados directamente (de preferencia) o no con la MEC, y que no participaran en otras patologías que cursan con fibrosis; así de esta manera redujimos estos 50 genes a solo 20 que cumplieran con las características antes mencionadas para ser un buen biomarcador.

Del primer grupo (MEC) seleccionamos 7 genes de los cuales sobresale CYP26A1 con intensidad de cambio 6 veces mayor al control; este gen es importante ya que pertenece a la familia del citocromo p450 encargado de metabolizar ácido retinoico a metabolitos polares (White y cols.1997). Ya que las células estelares contienen en su citoplasma ácido retinoico o vitamina A (Friedman, 2000), el cual pierden durante su activación a miofibroblastos, es probable que Cyp26a1 es un gen candidato para ser un buen biomarcador para las primeras fases.

Dentro de este grupo también se encuentran varias proteínas de matriz como fibulina 1, fibulina 5, periostina, proteína de matriz Gla y Adamts2 que por sí solas tal vez no reflejan un cambio tan alto como el de Cyp26a1 pero que en conjunto pueden usarse como marcadores en las primeras fases. Estos genes son importantes ya que están involucrados en la biogénesis de la matriz extracelular, organización de la colágena fibrilar y la organización de la MEC; además se ha observado que Fbn1 tiene una relación positiva con la expresión de Tgfb-1, que a su vez estimula la producción de varias proteínas de matriz extracelular como la colágena de tipo 1, participante esencial encontrada en los procesos fibróticos (Nie y cols.2008; Hold y cols.2009). Postn se encuentra incrementada en varios tipos de cáncer como el de páncreas y se ha observado que las células estelares pueden ser una fuente de periostina (Riener y cols., 2010). Por su parte fibulina 5 es una glicoproteína encargada de la formación y reparación de fibras elásticas, por medio de la

interacción con fibrilina, tropoelastina y LOX-like (Schneider y cols., 2010). Por otra parte Mgp, proteína de matriz gla es un fuerte inhibidor de calcificación vascular, pero aun no se comprende totalmente su mecanismo (Schurgers y cols., 2007). La Adamts2 también juega un papel muy importante con actividad de metaloendopeptidasa sobre la procolágena de tipo I, II y III lo cual se ve reflejado en la remodelación del tejido hepático (Colige y cols., 2004), para cerrar este grupo de los genes de matriz extracelular consideramos importante al TGF- $\beta$ 3 ya que estimula la producción de proteínas de matriz extracelular como colágena de tipo I, fibronectina, laminina y proteoglicanos, además de que tiene un efecto sinérgico con otros factores de crecimiento tales como el CTGF (factor de crecimiento de tejido conectivo), y es afín a los receptores que facilitan la fibrosis (Doina y cols., 2009). Por otra parte se han reportado algunas moléculas de MEC como marcadores de clase I, dentro de las cuales podemos mencionar: fragmentos de colágena y procolágena, así como glicoproteínas estructurales (tenacina y undulina) pero estas no son hepatoespecíficas y su sensibilidad y especificidad oscila entre un 70 y 80 % (Gressner y cols, 2007), por lo que las moléculas que proponemos pueden ser candidatos a biomarcadores.

Del grupo de genes relacionados con inmunidad seleccionamos 2 genes, la IgSF10 y el C7. C7 presenta un patrón de expresión conforme al modelo, con cambios en la tercera fase de 6 veces más expresión con respecto al control. Se sabe que el C7 es una pieza importante para la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) que forma un poro en las membranas de algunos patógenos. Su síntesis es llevada a cabo principalmente en el hígado, por lo que los cambios que observamos pueden deberse a los procesos inflamatorios que se producen durante la fibrosis y porque puede estar afectado su proceso de síntesis (Gonzales y cols., 2003). Tal vez el sistema inmunológico participe en cualquier alteración que pueda tener el hígado, pero sabemos también que la cuenta de plaquetas se ve afectada en pacientes cirróticos, debido a la disminución de la síntesis de trombopoietina por el hígado (Gressner y cols, 2007). Esto no hace pensar que la combinación de C7 con otros marcadores nos puedan generar un perfil molecular para el diagnóstico de fibrosis.

La regeneración celular se encuentra indudablemente presente durante el daño hepático y es un mecanismo adoptado por el hígado para compensar el desequilibrio al cual está sujeto durante la fisiología de la fibrosis y es en este punto donde se encuentran los genes relacionados con la proliferación, muerte y transformación celular, como Aldh1a3, Igfbp7 y Pdgfd. Estos genes presentan valores de cambio similares a 2 veces más que el control. Aldh1a3 pertenece a una familia de deshidrogenasas encargadas de oxidar aldehídos endógenos y exógenos generados durante el metabolismo de aminoácidos, lípidos, aminos biogénicas, vitaminas y esteroides. Aldh1a3 se encarga específicamente de catalizar la reacción de oxidación del retinal a ácido retinoico y esto es importante ya que el ácido retinoico es almacenado en las células estelares hepáticas en reposo (Vasiliou y cols., 2000). Se sabe también que esta proteína participa en el desarrollo del ojo embrionario y en la regulación positiva de la apoptosis. Por su parte Igfbp7 es altamente expresada en angiogénesis, apoptosis y senescencia celular; su transcripción está regulada por la metilación del DNA, el ácido retinoico y por Tgfb1 e in vitro interactúa con varias proteínas de matriz extracelular estimulando su migración y adhesión a las células endoteliales todos estos procesos se relacionan directamente con fibrosis. Pdgfd es un factor de crecimiento y el más potente inductor de proliferación de HSCs (Pen y cols., 2008). Se han descrito ya algunos factores de crecimiento como posibles marcadores para fibrosis, como el TGF- $\beta$ 1 y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) que se ve aumentado en el suero de pacientes que cursan con fibrosis, pero no ha sido totalmente evaluado para su uso como biomarcador (Gressner y cols, 2007).

En otro grupo tenemos a los genes relacionados con el metabolismo de lípidos, Lpl y Fabp4, los cuales son muy importantes ya que participan directamente en el transporte de lípidos. La acumulación de grasa en los hepatocitos no se debe al aumento de la síntesis de triglicéridos o a la disminución del metabolismo de ácidos grasos, pero si a la inhibición específica de la síntesis del componente proteico de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las VLDL son importantes para el transporte de triglicéridos y por lo tanto causara la

acumulación de estos lípidos en el hepatocito, lo cual se traduce en esteatosis, que es muy común en el hígado tratado con CCl<sub>4</sub> (Rodes y cols., 2001) y en hepatitis no alcohólica (NASH). En relación a las moléculas identificadas como marcadores del grupo de lípidos, son comúnmente usadas la apolipoproteínas en los algoritmos de los marcadores de clase II como el PGAA-Index (Tiempos de protrombina, GGT, apolipoproteína A1 y macroglobulina- $\alpha_2$ ) Así que puede ser que nuestras moléculas elegidas puedan usar de igual manera en combinación con algún algoritmo para predecir el estado de la fibrosis (Gressner y cols, 2007).

El último gen que seleccionamos, Mfap4, consideramos que puede ser el principal candidato de esta tesis a ser utilizado como biomarcador de fibrosis por varias razones. Esta proteína asociada a matriz extracelular que tiene sitios de unión a la colágena y a carbohidratos (Schlosser y cols, 2006), fue identificada recientemente por el grupo del Dr. Mölleken a través de un estudio de proteómica de sueros de pacientes cirróticos e individuos sanos; en donde identifica a Mfap4 como un posible biomarcador para cirrosis hepática, ya que se encuentra 46 veces más aumentado que en el suero de individuos normales (Mölleken y cols, 2009). Así que al encontrar estos resultados se decidió validar este gen por qPCR, en donde obtuvimos resultados muy similares en la expresión del gen de 7, 1.5, 32, 5 y 3 veces más aumentado que el control. Podemos observar que la tercera fase tiene la mayor expresión y esto se debe a que puede compararse con la etapa de cirrosis, el dato en la segunda etapa corrobora el perfil de expresión de esta proteína y apunta a que hay un ligero descenso en su expresión lo cual es real.

Estos resultados nos indican que los genes elegidos son excelentes candidatos para biomarcadores para fibrosis hepática.

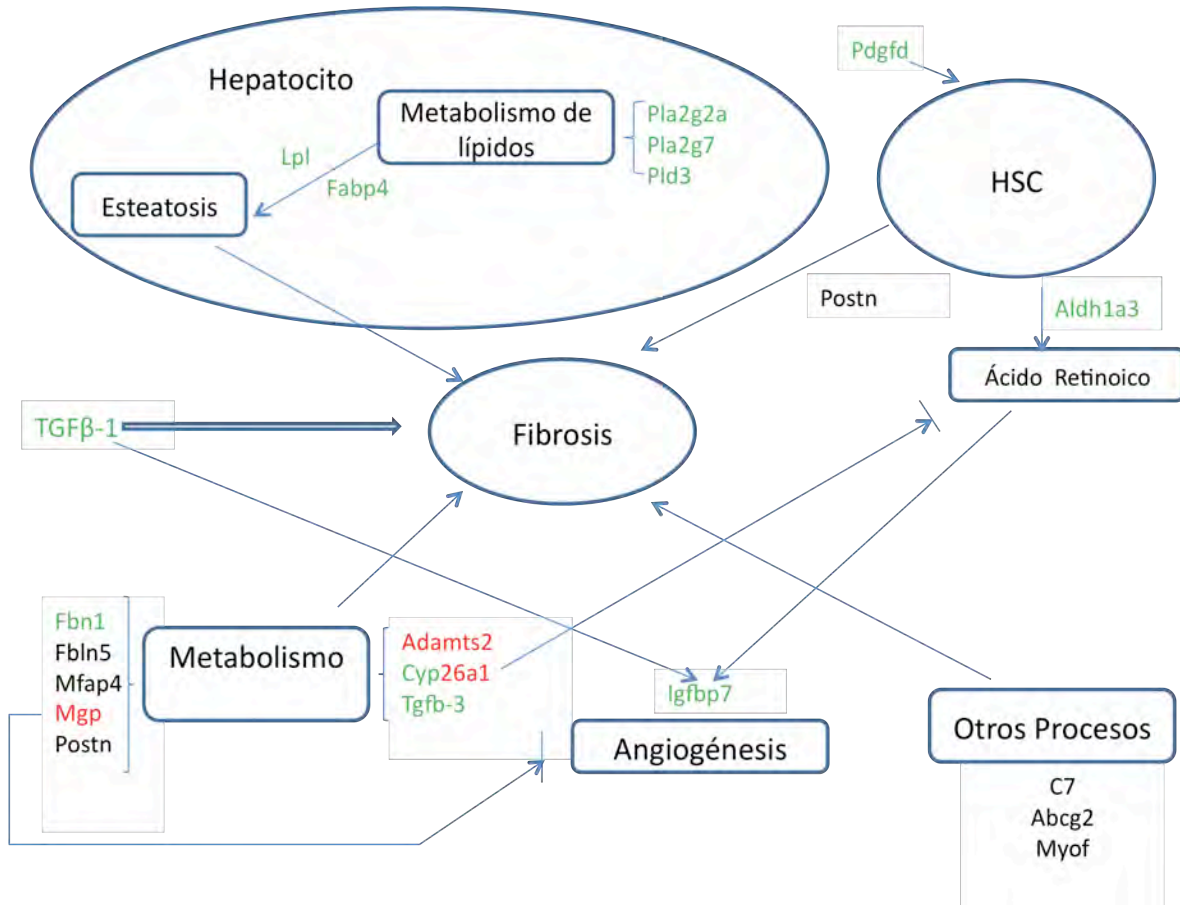
## Conclusiones

De nuestros resultados podemos concluir que la determinación de colágena a través de la técnica de OH-prolina es un buen indicador para monitorear el depósito de MEC en el modelo animal de fibrosis hepática inducida por CCl<sub>4</sub>. El uso de la tecnología de microarreglos de expresión, por otra parte permitió en un solo ensayo identificar 20 genes de la rata como posibles biomarcadores para fibrosis hepática, incluyendo el gen *Mfap4* el cual se validó como marcador por qPCR. El perfil de expresión de este gen mostró un pico de expresión más alto en la tercera fase (experimental) lo que concuerda con los resultados obtenidos por el grupo del Dr. Mölleken quien lo propone como un futuro biomarcador para fibrosis hepática. Tomando en cuenta los estudios del Dr. Mölleken se realizaron en humanos, podemos concluir que los resultados obtenidos de los modelos animales pueden correlacionarse con la fisiopatología humana.

En base a los criterios de selección propuestos en nuestro trabajo descartamos aquellos genes previamente citados en la literatura y que no son hepato-específicos y quedarnos con los genes que pudieran aportarnos mayor información por sí solos o en conjunto acerca del estadio de fibrosis.

En apoyo al probable uso de estos genes como biomarcadores de fibrosis hepática pudimos observar que los genes seleccionados tienen alta correlación con los eventos que suceden durante el proceso patológico, como los que participan en el metabolismo del ácido retinoico que involucra entre otros a *Aldh1a3* y a *Cyp26a*. Los factores de crecimiento identificados en este trabajo como TGF- $\beta$ , PDGFD, se ha descrito que estimulan la liberación de ácido retinoico, el cual a su vez regula a *Igfbp7* (también identificado en este trabajo) que participa en el proceso de angiogénesis. TGF- $\beta$ 3 estimula la síntesis de MEC y otros genes identificados, como *Lpl*, *Fabp4* y fosfolipasas, asociados con la inhibición de la síntesis de VLDL, que entre otros factores inducen a la esteatosis. En la fig. 16 se muestra una representación gráfica de la probable asociación entre los biomarcadores identificados y la fisiopatología que se presenta en la fibrosis hepática.

Fig. 16.- Genes seleccionados como biomarcadores para fibrosis hepática que participan en los eventos de fibrosis inducida por CCl4 (en verde moléculas inductoras y en rojo moléculas inhibidoras).



Los datos presentados en este trabajo proporcionan información importante que permitirá un mejor entendimiento de los mecanismos e interrelaciones moleculares que ocurren durante el proceso de fibrosis hepática.

Este trabajo fue realizado con el financiamiento proporcionado por la DGAPA; PAPIIT # IN 208107 e IN 205210/ SEP-CONACyT 84837



## BIBLIOGRAFÍA

- Arthur M.J., 1995. Collagenases and liver fibrosis. *J. Hepatol.* 22(2 Suppl):43-8.
- Arthur M.J.P., 1998. Fibrosis and altered matrix degradation. *Digestion.* 59: 4 Pro-Quest Medical Library. page 376-380.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Badylak Stephen F. 2002. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 13, (5), : 377-383
- Bedossa P., Paradis V., 2003. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol.* 200: 504-515
- Benyon R.C., Iredale J.P., Goddard S., Winwood P.J., Arthur M.J.P., 1996. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology.* 110: 821-831.
- Benyon RC., Arthur M.J.P., 2001. Extracellular matrix degradation and the role of the hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.* 21: 373-384
- Berry M.N., Friend DS., 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J Cell Biol.* 43: 506-520.
- Birkedal-Hansen H, Moore W, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, Decarlo A, Engler JA., 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 4: 197-250.
- Birkedal-Hansen H., 1995. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 7: 728-735.

- Bossman F.T., Stamenkovic I., 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 200: 423-428
- Bucher N, Robinson GS, Farmer SR., 1990. Effects of extracellular matrix on hepatocyte growth and gene expression: implications for hepatic regeneration and the repair of liver injury. *Semin Liver Dis.* 10: 11-20.
- Cassiman D., Libbrecht L., Desmet V., Deneff C., Roskams T., 2002a. Hepatic stellate cell/myofibroblasts subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol.* 36: 200-209.
- Cassiman D., Roskams T., 2002b. Beauty is in the eye of beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol.* 37: 527-535.
- Chomczynski P., Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem.* 162: 156-159.
- Cogger, VC, Muller, M, Fraser, R, Mclean, AJ, Khan, J, Le Couteur, DG. 2004. The effects of oxidative stress on the liver sieve. *J Hepatol.* 41: 370-376
- Collier I.E., Wilhelm S.M., Eisen A.Z., Marmer B.L., Grant G.A., Seltzer J.L., Kromberger A.M., HE G.S., Bauer E.A., Goldberg G.I., 1988. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading membrane collagen. *J Biol Chem.* 263: 6579-6587.
- Cook T.F., Burke J.S., Bergman K., Quinn C.O., Jeffrey J.J., Partridge N.C., 1994. Cloning and regulation of rat tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in osteoblastic cells. *Arch Biochem Biophys.* 311: 313-320.
- Diegelmann R.F., Guzelian P.S., 1983. Collagen formation by the hepatocyte in primary monolayer culture and *in vivo*. *Science.* 219: 1343-1345.
- Dyroff, M. C., and Neal, R. A. 1981. Identification of the major protein adduct formed in rat liver after thioacetamide administration. *Cancer Res.* 41, 3430–3435).

- Friedman S.L., Roll F.J., Boyles J., Bissell D.M., 1985. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Nat Acad Sci (PNAS)*. 82: 8681-8685.
- Friedman S.L., 1993. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *New Eng J Med*. 328: 1828-1835.
- Friedman SL. 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*. 275(4): 2247-2250
- Geisler S., Lichtinghagen R., Böker K.H.W., Veh R.W., 1997. Differential distribution of five members of the matrix metalloproteinase family and one inhibitor (TIMP-1) in human liver and skin. *Cell Tissue Res*. 289: 173-183.
- Gelse K., Pöschl E., T. Aigner T., 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55: 1531-1546
- Glynn Dennis Jr, Brad T Sherman, Douglas A Hosacque, Jun Yang, Wei Gao, H Clfase ford Lane† and Richard A Lempicquei, 2006. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology* 4: P3.
- Gómez D.E., De Lorenzo M.S., Alonso D.F., Andrade Z.A., 1999. Expression of metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in schistosomal portal fibrosis. *Am J Trop Med Hyg*. 61: 9-13.
- González S, Martínez-Borra J, López-Larrea C, 2003. Cloning and characterization of human complement component C7 promoter. *Genes and Immunity* 4: 54–59
- Greenwel P., Rubin J., Schwartz M., Hertzberg E.L., Rojkind M., 1993. Liver fat storing cell clones obtained from a CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, Interleukin-6, and connexin 43. *Lab Invest*, 69: 210-216.
- Gressner, A.M., 1996. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Internat*. 49 (Suppl 54): S-39-S-45.

- Gressner Olav A., Ralf Weiskirchen, Gressner Axel M., 2007. Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clinica Chimica Acta* 381 : 107–113.
- Gressner A. M, Chun-Fang Gao, Gressner Olav A., 2009. Non-invasive biomarkers for monitoring the fibrogenic process in liver: A short survey. *World J Gastroenterol.* 15(20): 2433-2440.
- Guzelian P.S., Qureshi G.D., Diegelmann R.F., 1981. Collagen synthesis by the hepatocyte: studies in primary cultures of parenchymal cells from adult rat liver. *Collagen Rel Res.* 1: 83-93.
- Haruyama T., Ajioka I., Akaike T., Watanabe Y., 2000. Regulation and significance of hepatocyte-derived matrix metalloproteinases in liver remodeling. *Biochem Biophys Res Comm.* 272: 681-686.
- Harm van Bakel and Frank C.P. Holstege, 2008. A Tutorial for DNA Microarray Expression Profiling. Cels press: 22-28
- Hata R.I., Ninomaya J., Sano H., Konomi H., Hori H., Sunada S., Tanaka K., Kabuki K., Nagai Y., Tsukada Y., 1985. Activation of collagen synthesis in primary culture of rat liver parenchymal cells (hepatocytes). *J Cell Physiol.* 122: 333-342.
- Hautekeete M.L., Geerts A., 1997. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchow's Arch.* 430: 195-207.
- Herbst H., Wege T., Stefano M., Pellegrini G., Orzechowski H.D., Bechstein W.O., Neuhaus P., Gressner A.M., Schuppan D., 1997. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol.* 150: 1647-1659.
- Hohenester, E., Engelb Ĺ, J. 2002. Domain structure and organization in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* 21: 115-128
- Hillan K.J., 1992. Demonstration of rat albumin RNA in formalin-fixed tissue sections with digoxigenin-labelled RNA probe. Non-radioactive *in situ* hybridization. Boehringer-Mannheim, GmbH, Germany: pp. 51-52.
- Hubbard A.L., Barr V.A., Scott L.J. 1994. Hepatocyte surface polarity. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Shashter DA, Shafritz DA, (ed). *The Liver: Biology and Pathology*. Third Ed. Raven Press, New York.

Hunter-Lavin C., Davies E.L., Bacelar M.M.F.V.G., Marshall M.J., Andrew S.M., Williams J.H.H. 2004. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem and Biophys Res Comm.* 324: 511–517.

Iredale JP, Arthur MJP. 1994. Hepatocyte-matrix interactions. *Gut*, 35: 729-732.

Iredale J.P., Goddard S., Murphy G., Benyon R.C., Arthur M.J.P., 1995. Tissue inhibitor of metalloproteinase-I and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepatitis and activated human hepatic lipocytes. *Clin Sci.* 89: 75-81.

Iredale J.P., Benyon R.C., Arthur M.J., Ferris W.F., Alcolado R., Winwood P.J., Clark N., Murphy G., 1996. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology.* 24: 176-184.

Iredale J., 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 29: 43-54.

Iredale J.P., 2007. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*; 117(3):539-48.

Kmiec Z., 2001. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 161: III-XIII: 1-151

Knittel T., Kobold D., Saile B., Grundmann A., Neubauer K., Piscaglia F., Ramadori G. 1999a. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology.* 117: 1205-1221.

Knittel T., Kobold D., Piscaglia F., Saile B., Neubauer K., Mehde M., Timpl R., Ramadori G., 1999b. Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and disease rat livers: distinct roles of (myo-) fibroblasts subpopulation in hepatic tissue repair. *Histochem Cell Biol.* 112: 387-401.

- Knittel T., Mehde M., Kobold D., Saile B., Dinter C., Ramadori G., 1999c. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-a and TGF-b1. *J Hepatol.* 30: 48-60.
- Kömüves L.G., Feren A., Jones A.L., Fodor E., 2000. Expression of epidermal growth factor and its receptor in cirrhotic liver disease. *J Histochem Cytochem.* 48: 821-30.
- Leco K.J., Hayden L.J., Sharma R.R., Rocheleau H., Greenberg A.H., Edwards D.R., 1992. Differential regulation of TIMP-1 and TIMP-2 RNAm expression in normal and Ha-ras transformed murine fibroblasts. *Gene.* 117: 209-217.
- Lepreux S., Bioulac-Sage P., Gabbiani G., Sapin V., Housset C.H., Rosenbaum J., Balabaud C.H., Desmoulière A., 2004. Cellular retinol-binding protein-1 expression in hepatic stellate cells and (myo)fibroblast subpopulations. *J Hepatol.* 40; 774-780.
- Maher J.J., Bissell D.M., Friedman S.L., Roll F.J., 1988. Collagen measured in primary cultures of normal rat hepatocytes derives from lipocytes within the monolayer. *J Clin Invest.* 82: 450-459.
- Maruyama K., Okazaki I., Kobayashi T., Suzuki H., Kashiwazaki K., Tsuchiya M., 1983. Collagenase production by rabbit liver cells in monolayer culture. *J Lab Clin Med.* 102: 543-550.
- Milani S., Herbst H., Schuppan D., Grappone C., Pellegrini G., Pinzani M., Casini A., Calabró A., Ciancio G., Stefanini F., Burroughs A.K., Surrenti C., 1994. Differential expression of matrix metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol.* 144: 528-537.
- Mölleken Christian, Barbara Sitek, Corinna Henkel, Gereon Poschmann, Bence Sipos, Sebastian Wiese, Bettina Warscheid, Christoph Broelsch, Markus Reiser, Scott L. Friedman, Ida Torne, Anders Schlosser, Günter Klöppel, Wolff Schmiegel, Helmut E. Meyer, Uffe Holmskov, and Kai Sthühler. 2009. Detection

of Novel Biomarkers of Liver Cirrhosis by Proteomic Analysis. *Hepatology*. 49: 1257-1266.

Montfort I., Pérez Tamayo R., 1978. Collagenase in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of the liver. *Am J Pathol*. 92: 411-420

Montfort I., Pérez-Tamayo R., Alvizouri A.M., Tello E., 1990. Collagenase of hepatocytes and sinusoidal liver cells in the reversibility of experimental cirrhosis of the liver. *Virchow's Arch B Cell Pathol*. 59: 281-289.

Nagai Y., Hori H., Hata R.I., Konomi H., Sunada H., 1982. Collagenase production by rat hepatocytes in primary culture. *Biomed Res*. 3: 345-349.

Nakatsukasa H., Ashida K., Higashi T., Ohguchi S., Tsuboi S., Hino N., Nouse K., Urabe Y., Kinugasa N., Yoshida K., Uematsu S., Ishizaki M., Kobayashi Y., Suji T., 1996. Cellular distribution of transcripts for tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*. 24: 82-88.

Nie FF, Wang Q, Georgina L Hold. 2009. Role of host genetics in fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2:6 doi:10.1186/1755-1536-2-6

O'Brien M.C., Bolton W.E., 1995. Comparison of cell viability probes compatible with fixation and permeabilization for combined surface and intracellular staining in flow cytometry. *Cytometry*. 19: 243-255.

Okada A., Garnier J.M., Vicaire S., Basset P., 1994. Cloning of the cDNA encoding rat tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1), amino acid comparison with other TIMPs, and gene expression in rat tissues. *Gene* 147: 301-302.

Okada Y., 2001. Immunohistochemistry of MMPs and TIMPs, in *Matrix Metalloproteinase Protocols* (Clarck I.M. ed.) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. Chapter 19, pags. 359-365.

- Pardo A., Pérez Tamayo R., 1973. The presence of collagenase in collagen preparations. *Biochim Biophys Acta*. 392: 121-130.
- Pardo A., Ridge K., Uhal B., Sznadger J.I., Selman M., 1997. Lung alveolar epithelial cells synthesize interstitial collagenase and gelatinase A and B in vitro. *Internat J Biochem Cell Biol*. 29: 901-910.
- Pen A., Moreno MJ, Durocher Y., Deb-Rinker P., Stanimirovic DB., 2008. Glioblastoma-secreted factors induce IGFBP7 and angiogenesis by modulating Smad-2-dependent TGF- $\beta$  signaling *Oncogene* (2008) 27, 6834–6844.
- Pérez Tamayo R., 1983. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 3(1): 112-120
- Pérez-Tamayo R., Montfort I., González E., 1987. Collagenolytic activity in experimental cirrhosis of the liver. *Exp Mol Pathol*. 47: 300-308.
- Pinzani M., 1995. Hepatic stellate (Ito) cells: expanding roles for a liver-specific pericyte. *J Hepatol*. 22: 700-706.
- Poli G., Parola M. 1997. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radicals Biol Med*. 22 (1/2): 287-305
- Popper H., 1977. Pathologic aspects of cirrhosis. *Am J Pathol*. 49: 707-721.
- Quinn O.C., Scott D.K., Brinckerhoff C.E., Matrisian L.M., Jeffrey J.J., Partridge N.C., 1990. Rat collagenase cloning, amino acid sequence comparison, and parathyroid hormone regulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem*. 265: 22342-22347.
- Reinehr R., Fischer R., Häussinger D., 2002. Regulation of endothelin-A receptor sensitivity by adenosine monophosphate in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 36: 861-873.
- Riener Marc-Oliver, Florian R Fritzsche, Christopher Soll, Bernhard C Pestalozzi, Nicole Probst-Hensch, Pierre-Alain Clavien, Wolfram Jochum, Alex Soltermann,



- Holger Moch y Glen Queristiansen. 2010. Expression of the extracellular matrix protein periostin in liver tumours and bile duct carcinomas. *Histopathology*, 56: 600–606.
- Roeb E., Graeve L., Müllberg J., Matern S., Rose-John S., 1994. TIMP-1 protein expression is stimulated by IL-1b and IL-6 in primary rat hepatocytes. *FEBS Letters*. 349: 45-49.
- Roeb E., Rose-John S., Erren A., Edwards D.R., Matern S., Graeve L., Heinrich P.C., 1995. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in rat liver cells is increased by lipopolysaccharide and prostaglandin E2. *FEBS Letters*. 357: 33-36.
- Roeb E., Purucker E., Breuer B., Nguyen H., Heinrich P.C., Rose-John S., Matern S., 1997. TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. *J Hepatol*. 27: 535-544.
- Rojkind M., Pérez-Tamayo R., 1983, Liver fibrosis. *Internat Rev Conn Tissue Res*. 10: 333-392.
- Rojkind M, Greenwel P., 1994. The extracellular matrix and the liver. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Shashter DA, Shafritz DA, (ed). *The Liver: Biology and Pathology*. Third Ed. Raven Press ,New York, pp 843-868.
- Rosenberg W, Burt A, Becka M, Voelker M, Arthur MJP., 2000. Automated assays of serum markers of liver fibrosis predict histologic hepatic fibrosis. *Hepatology*.;32:183A.
- Rudolph K.L., Trautwein C.H., Kubicka S., Rackemann T., Bahr M.J., Sedlaczeck N., Schuppan D., Manns M.P., 1999. Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology*. 30: 1159-1166.
- Schneider Ralf, Sacha A. Jensen, Pat Whiteman, James S. O. McCullagh, Christina Redfield y Penny A. Handford. 2010. Biophysical Characterisation of Fibulin-5 Proteins Associated with Disease. *Mol. Biol.* xx, xxx–xxx.

- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. Oct 20; 270 (5235): 467-70.
- Schlosser A. , T. Thomsen, J. M. Shipley, P. W. Hein, F. Brasch, I. Torne, O. Nielsen, K. Skjodt, N. Palaniyar, W. Steinhilber, F. X. McCormack y U. Holmskov. 2006 Microfibril-associated Protein 4 Binds to Surfactant Protein A (SP-A) and Colocalizes with SP-A in the Extracellular Matrix of the Lung. DOI: 10.1111.1365-3083
- Senoo H., Hata R.I., Nagai Y., Wake D., 1984. Stellate cells (vitamin A-storing cells) are the primary site of collagen synthesis in non-parenchymal cells in the liver. *Biomed Res*. 5: 451-458.
- Shaefer B., Rivas-Estilla A.M., Merz-Cruz N., Reyes-Romero M.A., Hernandez-Nazara Z.H., Dominguez-Rosales J.A., Shuppan D., Greenwel P., Rojkind M., 2003. Reciprocal modulation of matrix metalloproteinase-13 and type I collagen genes in rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol*. 162: 1771-1780.
- Shi S.R., Cote R.J., Yang C., Chen C., Xu H.J., Benedict W.F., Taylor C. R., 1996  
Development of an optimal protocol for antigen retrieval: a test battery approach exemplified with reference to the staining of retinoblastoma protein (pRB) in formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 179: 347-352.
- Schuppan D., Ruehl M., Somasundaram R., Hahn E.G., 2001. Matrix as a modulator of hepatic Fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 21 (3): 351-372
- Stamenkovic I., 2003. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*. 200: 448-464
- Tae-Hyoung K., Mars W.M., Stolz D.B., Michalopoulos G.K., 2000. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* 30: 5-82.

- Taimr P., Higuchi H., Kocova E., Rippe R.A., Friedmann S., Gores G.J., 2003. Activated stellate cells express the TRAIL-receptor-2/DEATH receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology* 37: 87-95.
- Takahara T., Furui K., Funaki J., Nakayama Y., Itoh H., Miyabayashi C., Sato H., Seiki M., Ooshima A., Watanabe A., 1995. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* 21: 787-795.
- Takahara T., Furui K., Yata Y., Jin B., Zhang L.P., Nambu S., Sato H., Seiki M., Watanabe A., 1997. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology*. 26: 1521-1529.
- Terada T., Okada Y., Nakanuma Y., 1996. Expression of immunoreactive matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human normal livers and primary liver tumors. *Hepatology*. 23: 1341-1344.
- Théret N., Musso O., L'helgoualc'h A.L., Clément B., 1997. Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. *Am J Pathol*. 150: 51-58.
- Théret N., Musso O., L'helgoualc'h A.L., Campion J.P., Clément B., 1998. Differential expression and origin of membrane-type 1 and 2 matrix metalloproteinase (MT- MMPs) in association with MMP-2 activation in injured human livers. *Am J Pathol*. 153: 945-954.
- Tomizaki Kin-ya, Kenji Usui<sup>2</sup> and Hisakazu Mihara, 2010. Protein-protein interactions and selection: array-based techniques for screening disease-associated biomarkers in predictive/early diagnosis. doi:10.1111/j.1742-4658.
- Towbin H., Strackelin T., and Gordon J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci*. 76: 4350-4354.
- Tseng S.C.G., Lee P.C., Ells P.F., Bisell D.M., Smuckler E.A., Stern R., 1982. Collagen production by rat hepatocytes and sinusoidal cells in primary monolayer culture. *Hepatology*. 2: 13-18.

- Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. 1990 (Feb;10). Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis*; 1: 56-65.
- Upadhyaya A.G., Harvey R.P.C., Howard T.K., Lowell J.A., Shenoy S., and Strasberg S.M., 1997. Evidence of a role for matrix metalloproteinases in cold preservation injury of the liver in humans and in the rat. *Hepatology*. 26: 922-928.
- Wang, T., Shankar, K., Ronis, M. J., and Mehendale, H. M., 2000. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 473–479.
- Watanabe T, Niioka M., Hozawa S., Kameyama K., Hayashi T., Arai M., Ishikawa A., Maruyama K., Okazaki I., 2000. Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol*. 33: 224-235.
- Weber LW., Boll M., Stamfi A. 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxic model. *Crit Rev Toxicol*. 33 (2): 105-36
- Wells G.M.A, Catlin G., Cossins J.A., Mangan M, Ward G.A., Miller K.M., Clements J.M., 1996. Quantitation of matrix metalloproteinases in cultured rat astrocytes using the polymerase chain reaction with a multi-competitor cDNA standard. *GLIA*. 18: 332-340.
- White Jay A., Becqueett Barbara Becqueett, Stephen W. Scherer, Jo-Anne Herbricque y Martin Petqueovich, 1998. P450RAI (CYP26A1) Maps to Human Chromosome 10q23–q24 and Mouse Chromosome 19C2-3. [Genomics](#). 48:270-272.
- Winwood P.J., Schuppan D., Iredale J.P., Kawser Ch A., Docherty A.J.P., Arthur M.J.P., 1995. Kupffer cell-derived 95-kd type IV collagenase/gelatinase B: characterization and expression in cultured cells. *Hepatology*. 22: 304-315.
- Woessner JF, Nagase H., 2000, Matrix metalloproteinases and TIMPs. Oxford: Oxford University Press,.

Zhonghua Zheng Xing Wai QUEe Za Zhi. 2008. The expression of fibrillin 1 in pathologic scars and its significance. Sep;24(5):339-42.

Zimmerman, H. J., 1999. Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver, Drug- and chemical-induced cholestasis. Toxicol Lett. 8;105(1):39-46.

## Apéndice I

### La Matriz Extracelular

La matriz extracelular (MEC) es un componente esencial del tejido conjuntivo de los organismos multicelulares que proporciona integridad estructural y sostén, además de actuar como un modulador dinámico del comportamiento celular (Buchner y cols., 1990, Iredale &, Arthur, 1994). La MEC es una mezcla compleja de proteínas estructurales y funcionales, glicoproteínas y proteoglicanos arreglados en una única ultraestructura tridimensional específica del tejido (Badylak, 2002). Representa una combinación compleja de diversas familias de proteínas que definen distintas funciones fisiológicas del tejido, cuya composición y estructura varía considerablemente entre los diferentes órganos. Esta red molecular determina la organización específica del tejido conjuntivo, facilitando a las células un soporte y las señales que dirigen la polarización, la proliferación, la migración, la diferenciación y la supervivencia. Su función primaria, es dotar a los tejidos de sus características mecánicas y bioquímicas específicas. Las células residentes de cada órgano son responsables de su síntesis y mantenimiento, pero la matriz, a su vez tiene también un impacto en las funciones celulares.

Las interacciones célula-matriz, mediadas por los receptores específicos de la célula y los sitios de enlace presentes en muchas moléculas de la MEC desempeñan no solamente una función sobresaliente en la adhesión y migración celular, sino también regulan y promueven su diferenciación y expresión génica.

La matriz pericelular proporciona un microambiente fisiológico especial para las células, protegiéndolas frente a influencias mecánicas perjudiciales e influyendo también en la transmisión de las señales inducidas en forma mecánica. Una atribución adicional de la MEC en la morfogénesis y el metabolismo celular, es el almacenaje y la liberación de factores de crecimiento que se encuentran enlazados a componentes específicos que forman parte de ésta (Gelse y cols., 2003).

En la mayoría de los órganos los principales componentes proteicos de la MEC son las Colágenas y los proteoglicanos, además de diversas familias de glicoproteínas no colagénicas, como las lamininas.

### Las colágenas

Las colágenas son proteínas producidas y secretadas por una variedad de células estromales, predominantemente fibroblastos, los cuales proporcionan gran parte del esqueleto necesario para la organización de las células que constituyen el tejido (Stamenkovic, 2003). Son proteínas ubicuas responsables de la integridad estructural de vertebrados y muchos otros organismos. Se han identificado más de 20 tipos de colágena genéticamente distintas en los tejidos que tienen que resistir cortes, y fuerzas de compresión o extensión, tales como los tendones, los huesos, los cartílagos, y la piel.

Estas proteínas pueden ser agrupadas en dos clases moleculares principales: la primera clase corresponde a las colágenas tipo I, II, III, V, y XI, que consisten de un solo dominio colagénico que tiene un arreglo fibrilar, con una periodicidad axial característica de 67 nm, formado por una triple hélice de 300 nm de longitud y 1.5 nm de diámetro, el cual les proporciona la fuerza extensible (Stamenkovic & Bosman, 2003), y la segunda clase, corresponde a un grupo heterogéneo llamado en general colágenas no fibrilares, que contienen, además de dominios colagenosos, uno o varios dominios no fibrilares. Esta segunda clase puede subdividirse, en: a) Colágenas formadoras de mallas o redes, como las colágenas tipo VIII y X y la colágena tipo IV que forma parte de la membrana basal; b) la colágena tipo VII, formadora de filamentos de anclaje; c) la colágena tipo VI, que forma filamentos en forma de gota; d) el grupo de las colágenas asociadas a fibrillas con triple hélice interrumpida (FACITs), que engloba a las colágenas tipo IX, XII, XIV, XVI, XIX, y XX, y e) las multiplexinas (con múltiples dominios colagenosos con múltiples interrupciones), representadas por las Colágenas tipo XIII, XV y XVIII, (Schuppan y cols, 2001).

## Las Lamininas

Las lamininas son una familia de glicoproteínas no colagénicas de alto peso molecular (200 a 400 kDa), formadas por tres cadenas polipeptídicas ( $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ ) organizadas en forma de una cruz asimétrica unidas a través de puentes disulfuro. Actúan como mediadoras de adhesión entre diferentes células. La laminina tiene una función reguladora para una gran variedad de fenómenos biológicos tales como, crecimiento, morfogénesis y migración celular. Ciertos tipos de células normales y neoplásicas contienen receptores de alta afinidad para esta molécula, la cual es uno de los principales constituyentes de la membrana basal junto con la colágena tipo IV, el nidogen-entactina, y el perlecano.

La membrana basal es una estructura laminar delgada situada inmediatamente por debajo de los epitelios, los cuales por medio de esta se unen al tejido conjuntivo subyacente. Las moléculas que forman la membrana basal se ensamblan espontáneamente entre sí mediante enlaces covalentes. La unión de la colágena tipo IV y la laminina es equimolecular y está estabilizada por el nidogen-entactina, la procolágena tipo VII y polímeros de proteoglicanos de heparán sulfato; dichas uniones se producen en zonas específicas de cada molécula, que sirven como receptores para los otros componentes de la membrana basal. Estas moléculas poseen además receptores para factores de crecimiento, hormonas, etc., lo que posibilita que la membrana responda a los estímulos provenientes de tejidos vecinos.

Algunos componentes de la MEC pueden transmitir señales a las células vía receptores, tales sensores de la matriz son principalmente las integrinas, además de los proteoglicanos transmembranales.

## Las Integrinas

Las integrinas que funcionan como receptores de la MEC proporcionan continuidad entre el exterior y el interior de la célula. Estas interacciones controlan actividades celulares tales como, adhesión, migración, diferenciación, proliferación, y apoptosis (Schuppan y cols, 2001). Reconocen secuencias



peptídicas pequeñas y la naturaleza de sus ligandos varía significativamente según la estructura de sus cadenas. Los miembros de la subfamilia reconocen contra-receptores pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, teniendo un papel importante en la circulación de los linfocitos durante la inflamación. Las integrinas reconocen proteínas de MEC como fibronectina, colágena y laminina.

### Los Proteoglicanos

Los proteoglicanos se pueden agrupar en varias familias. Todos tienen un núcleo proteico el cual es rico en glicosaminglicanos.

La primera familia está constituida por los lecticanos en los cuales el núcleo proteico tiene un dominio globular N-terminal que interactúa con el ácido hialurónico y un dominio del tipo de selectina en el C-terminal. Las cadenas laterales consisten sobre todo de condroitin sulfato, aunque el queratan sulfato también puede estar presente. Los miembros de este grupo son el agregano, versicano, neurocano, y brevicano. Hasta hace poco tiempo se asumió que su función era estructural, al proporcionar al tejido la rigidez necesaria para resistir fuerzas compresivas. Ahora está claro, que el versicano, uno de los miembros de este grupo, estimula la proliferación de fibroblastos y de condrocitos, a través de la presencia en su molécula de secuencias semejantes al factor de crecimiento epidérmico (EGF).

La segunda familia de proteoglicanos, esta caracterizada por un núcleo proteico que se compone de repeticiones ricas en leucina. Éstas le proporcionan una estructura parecida a una herradura, que favorece las interacciones de la proteína. Sus cadenas laterales compuestas de glicosaminglicanos son sobre todo condroitin-dermatan sulfato, o keratan sulfato. La decorina, el biglicano, la fibromodulina, y el keratocano están entre los miembros de esta familia. Estos proteoglicanos hasta hace poco tiempo eran considerados organizadores de las redes de colágena. Se ha demostrado recientemente, sin embargo, que la decorina está implicada en la transducción de señales a través del receptor de EGF vía las protein-quinasas activadoras de mitosis (MAPK), por lo que parece

estar implicada en la regulación y la diferenciación de células epiteliales y endoteliales. Además, el factor de crecimiento transformante (TGF) ) interactúa con los miembros de esta familia, en especial con la decorina aunque no se sabe el significado de esta interacción.

En la familia de los proteoglicanos del heparan sulfato, moléculas cuya estructura están asociadas directamente a la membrana celular, encontramos al perlecano un representante de esta familia cuya presencia predomina en las membranas basales. También pertenecen a este grupo los sindecanos y los glicanos. Se ha demostrado que estas moléculas tienen interacciones de alta afinidad con una gran variedad de factores del crecimiento, formando estructuras ternarias con dichos factores y sus receptores, modulando de esta forma la respuesta a la señal inducida por el factor de crecimiento en las células portadoras del receptor. A través de este mecanismo, los proteoglicanos de este tipo ejercen efectos sobre la adherencia, la migración de la célula y sobre su proliferación y diferenciación. La amplia expresión de los proteoglicanos del heparan sulfato y su participación en diversos procesos fisiológicos de la célula, sugiere que también estén relacionados en una gran variedad de procesos patológicos, entre los que encontramos la cicatrización y en el crecimiento de tumores (Stamenkovic & Bosman, 2003).

#### Las Metaloproteasas de Matriz Extracelular

La remodelación de la MEC es el resultado de procesos múltiples concurrentes que varían según el estímulo inicial. Así, los cambios estructurales y funcionales que ocurren internamente en la MEC de un órgano dado durante una respuesta inflamatoria aguda, se diferencian de los que acompañan el desarrollo de un miembro, o la invasión tumoral. Sin embargo, diferentes características mecánicas de la remodelación del tejido son comunes a la mayoría de las etiologías.

El remodelar requiere como mínimo de tres acontecimientos: síntesis y depósito de los componentes de la MEC por un lado, y su degradación por el otro.

En el proceso de degradación de la MEC participan numerosas proteasas, entre ellas, la familia del metaloproteasas de la matriz (MMP).

Las MMPs forman una subfamilia de la superfamilia de las metzincinas, proteasas, que constituyen una de varias familias de las metaloendopeptidasas. Las metzincinas comparten una topología estructural conservada, una secuencia motivo dentro del dominio catalítico que contiene tres histidinas que proporcionan un sitio de enlace al zinc, y una secuencia conservada “Met-turn” que reside debajo del sitio activo del ión zinc.

Con base en su semejanza estructural, las metzincinas se subdividen en cuatro subfamilias: las serralisinas, las adamalisinas, las astacinas, y las matrixinas (MMPs).

Se sabe que las más de 20 MMPs humanas y sus homólogas de otras especies podrían degradar prácticamente todos los componentes proteicos de la MEC. De acuerdo con su especificidad las MMPs se ha dividido en colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas y metaloelastasas. Sin embargo, el alto grado de superposición entre especificidades de su substrato y la noción de que pueden romper un mayor número de sustancias que no son parte de la MEC, hace a esta nomenclatura imprecisa en el mejor de los casos (Stamienkovic, 2003).

## Apéndice II

### La Estructura Microscópica del Hígado

El hígado desempeña un papel único como centro metabólico del cuerpo. Su peso promedio en individuos adultos es de aproximadamente de  $1\ 400 \pm 270$  g, sin diferencias significativas relacionadas con el género. Se compone de cinco tipos distintos de células que ocupan cerca del 80% de su volumen. El 20% restante es ocupado por los espacios extracelulares y los componentes de la matriz extracelular.(Rojkind &, Greenwel, 1994).

El tejido hepático se organiza a nivel microscópico, en lóbulos que consisten en un

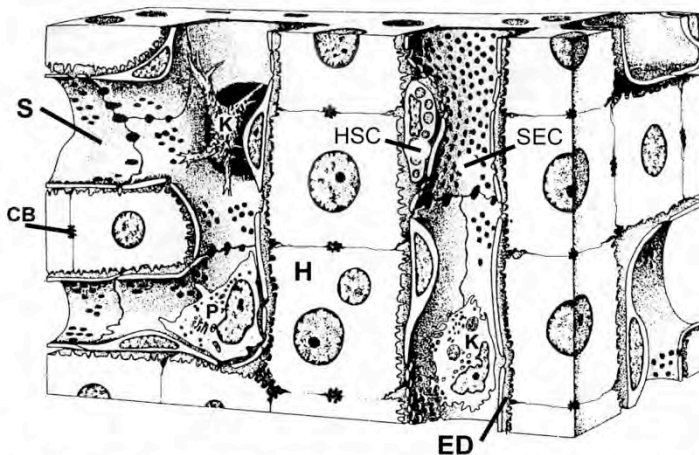


Fig. 1 Estructura microscópica del lóbulo hepático. Canalículo Biliar (CB), Espacio de Disse (ED), Células endoteliales sinusoidales (SEC), Hepatocitos (H), Células estelares hepáticas (HSC), Células de Kupffer (K), Células Pit (P), Sinusoide (S). (Kcmiec 2001).

muro hecho de placas constituidas por células que se extienden desde la zona porta en forma lineal a la vena central, y los espacios que atraviesan los tabiques contienen los sinusoides hepáticos separados de los hepatocitos por el espacio perisinusoidal de Disse (Fig. 1). Los sinusoides

hepáticos, con un diámetro medio de 5 a 7  $\mu\text{m}$ , conducen la sangre mezclada de las ramificaciones terminales de la arteria hepática y de la vena porta a la ramificación terminal de la vena hepática, e.g. vena central. Los sinusoides representan la única forma de tubo capilar en el hígado; su aspecto externo se caracteriza por, a) el revestimiento endotelial continuo, pero fenestrado, b) la presencia de células de Kupffer dentro del lumen, o como parte del sinusoide, c) la carencia de una membrana basal, y d) la presencia del espacio perisinusoidal (espacio de Disse).

La única comunicación entre los sinusoides y el espacio de Disse son las ventanas o fenestras de las células endoteliales sinusoidales (SEC). La ausencia de membrana basal facilita el intercambio rápido de componentes de la sangre con los hepatocitos. Los sinusoides hepáticos conectan los espacios porta con las ramas terminales de la vena hepática (venas centrales). Las células endoteliales de la arteria hepática son alargadas y arregladas longitudinalmente, mientras que las de las venas porta y central son poligonales y aplanadas, y poseen microvellosidades.

El espacio perisinusoidal contiene células estelares hepáticas (HSCs), abundantes microvellosidades de hepatocitos, terminaciones nerviosas, y una MEC compleja no densa a los electrones (Kmiec, 2001).

Los canalículos biliares, compuestos de invaginaciones longitudinales de la membrana plasmática de dos hepatocitos adyacentes, continúan a la periferia del lóbulo hasta que alcanzan los ensamblajes canalicular-ductular, conocidos previamente como canales de Hering. Las paredes de estos canalículos terminales están formadas por hepatocitos y por un número pequeño de células epiteliales planas que se asocian estrechamente con los hepatocitos circundantes (Kmiec, 2001)

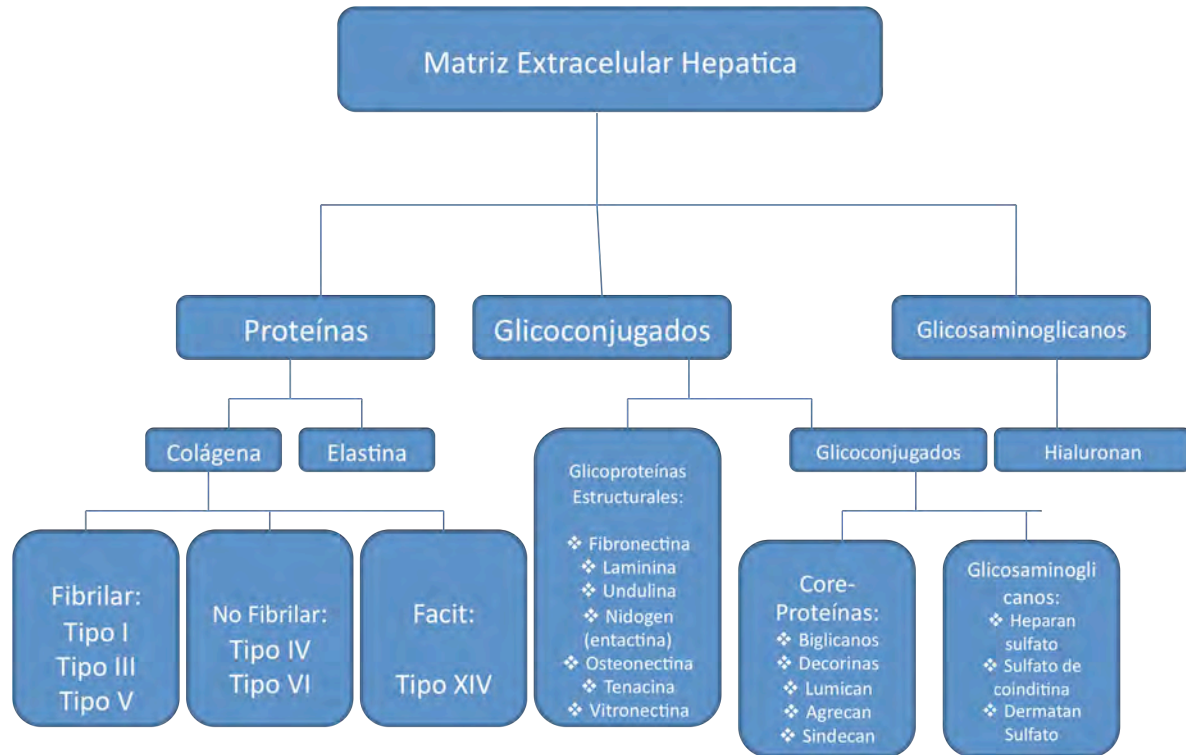
La MEC hepática es un compartimiento muy pequeño dentro del órgano que abarca menos del 3% del área relativa en una sección normal del mismo. Además de la cápsula de Glisson, la MEC está confinada, en el hígado normal, a las zonas porta, paredes sinusoidales y venas centrales. En cualquier sitio, ésta es parte de la frontera entre el flujo sanguíneo y el parénquima; una situación tan estratégica, explica lo inmediato de las múltiples consecuencias deletéreas de cualquier modificación en la distribución y composición de la matriz ya sea cualitativa o cuantitativa.

#### La Matriz Extracelular Hepática

La MEC hepática se compone de por lo menos cinco tipos genéticos distintos de colágena, siete clases de proteínas no colagénicas, y de un número indeterminado de proteoglicanos y glicosaminoglicanos (Figura 2). Entre las proteínas

encontradas con mayor frecuencia en la MEC hepática se cuentan las colágenas de tipo I, III, IV, y V, aunque también están presentes otras isoformas incluyendo la tipo XVIII, precursora de la endostatina, descrita recientemente.

Figura 2. Composición de la matriz extracelular hepática.



Cada isotipo de colágena difiere en su localización física y función dentro del hígado. Mientras que los tipos I, III, y V, los componentes principales de la colágena fibrilar, se confinan primordialmente en la zona porta y en la pared de la vena central, la colágena tipo IV, en asociación con la laminina y la nidogen-entactina, participa en la formación de un material de baja densidad, semejante a una membrana basal a lo largo de la pared sinusoidal. En esta posición, generalmente está ausente una membrana basal densa a los electrones aunque se pueden detectar la mayoría de sus componentes individualmente. La baja densidad de esta estructura, que semeja una membrana basal, es crítica para permitir la difusión, entre la sangre y las células del hígado y para mantener la función, diferenciada de células tales como hepatocitos y células sinusoidales.

Otros componentes importantes de la MEC hepática son las glicoproteínas, como laminina, fibronectina, tenascina, nidogen, y SPARC, los proteoglicanos entre los que se incluye el heparan, dermatan, y condroitin sulfato, el ácido hialurónico, el biglicano y el perlecano, y la decorina (Rojkind & Greenwel, 1994; Bedossa & Paradis, 2003).

La función principal de la MEC sigue siendo la coherencia y la resistencia mecánicas del hígado, pero también tiene un objetivo en varias funciones biológicas importantes tales como proliferación de la célula, migración, diferenciación, y expresión genética.

Cada célula del hígado tiene la capacidad de producir más de un tipo de proteínas de la MEC. Esta información se resume en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes de la MEC sintetizados por las células normales del hígado

Células del Hígado	Componentes de MEC
Hepatocitos	Colágena tipos I y III Fibronectina (plasmática y celular) Laminina
Células estelares	Colágenas tipos I (solamente miofibroblastos), III, y IV Tenascina (miofibroblastos) Fibronectina (miofibroblastos) Entactina Laminina Undulina
Células Endoteliales	Colágena tipo IV Entactina Trombospondina

(Rojkind & Greenwel, 1994)

La matriz extracelular altamente estructurada, tiene una distribución y organización en el hígado única, El diámetro de las fibrillas depende de varios factores, incluyendo el procesamiento de los extremos carboxilo o amino-

terminales del propéptido y la asociación con otros componentes de la MEC, incluyendo las Colágenas. A lo largo del acino hepático, el fenotipo del hepatocito (y quizá también el de los otros tipos de células que forman el órgano), es variable, debido a la migración y maduración de células originales desde el área portal a la vena terminal.

Por lo tanto, la cantidad y la naturaleza de los componentes de la matriz que se producirán a lo largo de la trayectoria de la migración de los hepatocitos serán diferentes. Dentro del espacio de Disse se pueden visualizar por microscopia electrónica, solamente pequeños ensanchamientos de una estructura semejante a una membrana basal interrumpida. Estas características son importantes al considerar la fisiología normal del hígado y las anormalidades que ocurren durante el desarrollo de la cirrosis hepática.

La concentración de los componentes de la matriz varía considerablemente con la especie animal. Mientras que en la rata la colágena está a razón de 1 mg/g de peso húmedo del hígado, en el ser humano representa 5 mg/g del tejido. Como ya se mencionó, la mayoría de los componentes del tejido conjuntivo se localizan en los espacios vasculares, tales como tríadas portales, áreas perive-nulares, y en la cápsula de Glisson. No obstante, una cantidad pequeña pero significativa está presente en el espacio sinusoidal y más concretamente en el espacio de Disse, como se menciona en la tabla 2.

Los espacios libres del hígado (vasos y conductos biliares) ocupan un volumen relativamente más grande que el de la MEC y desempeñan un papel importante en la fisiología del hígado, puesto que representan los sistemas usados por las células para obtener sus nutrientes y para descargar sus productos metabólicos, incluyendo los necesarios para la comunicación con otras células o con otros tejidos. Cuando cualquiera de los espacios señalados se estrecha o desaparecen, como ocurre con el incremento del tamaño de los hepatocitos o la capilarización del espacio de Disse, respectivamente, la llegada y la salida de sustancias se modifican, lo mismo que su volumen de distribución, así como la presión portal.



Tabla 2. Localización de proteínas no colagénicas en el tejido hepático.

Proteínas no colagénicas	Localización
Fibronectina	Está presente en el estroma portal alrededor de las venas centrales a lo largo de todo el sinusoides en contacto directo con las microvellosidades de los hepatocitos. Ausente en membranas basales. Se localiza en el espacio de Disse, donde forma racimos de material amorfo.
Laminina	Se codistribuye con la colágena tipo IV y está presente en todas las membranas basales. Se localiza en el recubrimiento endotelial de las arterias hepáticas, de la vena porta, y vasos linfáticos. Está también presente alrededor de los conductos biliares, en los axones del nervio, y en las células del músculo liso de las paredes vasculares.
Undulina	Presente en el área portal, dentro de la adventicia de las arterias más grandes, alrededor de la vena central, y en los espacios perisinusoidales. Asociada con Colágenas tipo I y III.
Tenascina	Está presente a lo largo de los sinusoides con un patrón discontinuo. En algunas venas centrales existe en poca cantidad. No ha sido detectada en los tractos portales.
Trombospondina	Localizada en el espacio de Disse y alrededor de los vasos más grandes

(Rojkind&,Greenwel,1994)

## Las Células del Hígado

Entre las células del hígado, los hepatocitos son los de mayor tamaño. Ocupan cerca del 50 al 60% del volumen del órgano y comprenden dos tercios del total de las células hepáticas. Realizan funciones importantes, como ayudar a desintoxicar la sangre y sintetizar las proteínas séricas del transporte (lipoproteína, albúmina y transferrina). Es la principal célula epitelial del órgano, su estructura es poliédrica, con 8 o más superficies, y su tamaño varía entre 25-30  $\mu\text{m}$  de largo, y con 20 a 25  $\mu\text{m}$  de ancho. Los cultivos primarios y secundarios de hepatocitos son útiles para estudiar los mecanismos de regeneración y de diferenciación del hígado.

Históricamente, los hepatocitos en cultivo primario han exhibido una expectativa de vida limitada. Además, cuando son estimulados para dividirse en cultivo, generalmente pierden algunas funciones, como la capacidad sintetizar y secretar albúmina y transferrina. Debido a la estructura del hígado, la membrana del hepatocito presenta tres flancos diferentes, lo mismo ocurre con las funciones que realiza a través de cada uno de ellos, lo que significa que la superficie del hepatocito es asimétrica.

La membrana plasmática basal, o frente sinusoidal, que se extiende con la presencia de muchas microvellosidades cortas, se especializa en el intercambio de metabolitos con la sangre, esto incluye: a) el transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana (e.g., aminoácidos, glucosa, ácidos biliares), b) la secreción de las proteínas del plasma vía la fusión de vesículas secretoras, y c) la internalización de macromoléculas que circulan vía vesículas y poros revestidos de clatrin. La superficie lateral comparte la mayoría de las funciones del frente sinusoidal y se especializa además en la comunicación célula-célula.

Las funciones especializadas de la membrana apical o de los canalículos biliares incluyen: a) el transporte de los ácidos biliares y de los productos de desintoxicación a través de la bicapa de la membrana a la bilis; b) el transporte y liberación de lípidos en el frente canalicular; y c) el suministro de la IgA secretora a la bilis vía la fusión de las vesículas de transporte con la membrana apical. En general estas células participan en casi todas las funciones atribuidas al hígado además de estar equipadas para la resistencia contra el estrés oxidativo.

Existen algunas diferencias en su ultraestructura relacionadas con la localización de la célula en el lóbulo hepático. Por ejemplo los hepatocitos que forman parte de la zona periportal tienen mayor número de mitocondrias de mayor tamaño, en comparación con aquellos localizados en la zona perivenular, lo que indica que su actividad metabólica es predominante (Hubbard, 1994).

En el hígado normal, las células del parénquima se dividen raramente, sin embargo, después de una hepatectomía parcial, o en algunas formas de lesión hepática grave, los hepatocitos proliferan rápidamente para restaurar la masa del

órgano. La regeneración hepática está regulada no solamente por factores extracelulares, sino también por sustancias liberadas por las células vecinas no parenquimatosas, que actúan sobre los hepatocitos en forma de interacciones parácrinas. (Kmiec, 2001)

Las células hepáticas restantes, genéricamente son conocidas como células no parenquimatosas o sinusoidales, en comparación con los hepatocitos, representan un porcentaje menor en el volumen celular total del hígado y son más pequeñas.

Las HSCs se localizan en el espacio de Disse, adheridas a las células endoteliales, siendo el principal tipo celular fibrógeno del hígado comprenden el 15% de células residentes en el órgano. En el hígado normal son el principal sitio de almacenamiento de retinoides y constituyen un grupo celular no homogéneo, anatómicamente similares, pero que difieren en la expresión del tipo de moléculas del citoesqueleto, contenido de retinoides y en su producción potencial de moléculas de la MEC. Estas células tienen un origen embriológico impreciso, aunque datos recientes sugieren que se derivan de la cresta neural ya que expresan proteína glial fibrilar ácida; este origen embrionario también se apoya en estudios de células troncales de la cresta neural de ratas, las cuales se diferencian a miofibroblastos que expresan  $\alpha$ -actina de músculo liso, un marcador de HSCs activadas. La orientación perivascular de las HSCs y sus largas prolongaciones citoplásmicas facilitan su interacción con los diversos tipos de células vecinas. Estas prolongaciones son adyacentes a los nervios hepáticos, con las cuales pueden responder a estimulación  $\alpha$ -adrenérgica con un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y liberación de osmolitos (Friedman, 2000). Knittel y cols. (1999a), mediante una técnica de aislamiento celular, por medio de la cual eliminan a las HSCs ricas en vitamina A, consiguió cultivar fibroblastos de hígado de rata normal a los que llamó "miofibroblastos de hígado de rata (MF)". Estas células en contraste con las HSCs, carecen de la expresión de proteína glial fibrilar ácida, desmina y de moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM-1); sin embargo, ambos tipos celulares muestran coincidencia en la mayoría de sus características, con algunas diferencias, entre las cuales podemos mencionar a) su localización, los MF se ubican en las zonas periportales, en las paredes de las venas centrales, y

muy ocasionalmente en el parénquima; las HSCs, por su parte, se encuentran sólo en este último, (Knittel y cols., 1999b); b) durante el daño hepático agudo, el número de HSCs se incrementa predominantemente, mientras que el número de MF literalmente no cambia. En contraste, cuando se trata de una lesión crónica, las dos poblaciones celulares participan en la formación de MEC de alta densidad (cicatriz). Knittel y cols., demuestran que poblaciones de fibroblastos funcionalmente diferentes, están presentes en diferentes compartimentos del hígado normal, responden diferencialmente al daño agudo, y pueden ser detectadas en distintas áreas de hígado fibrótico; sin embargo, ambas poblaciones son consideradas como células fibrogénica (Knittel y cols., 1999b).

Las células endoteliales sinusoidales (SEC) son fenestradas, el número y tamaño de sus ventanas, varía desde 200 nm de diámetro hasta 1µm, según su localización en el sinusoides y la composición de la MEC.

Las células de Kupffer y las células "pit" son residentes normales del espacio sinusoidal: las células de Kupffer son miembros del sistema fagocítico-mononuclear, y las células "pit" corresponden a las células asesinas naturales (NK) (Kmiec, 2001, Rojkind & Greenwel, 1994).

## Apéndice III

### Modelos Experimentales

Generalmente los modelos animales suelen clasificarse según el agente etiológico, de la siguiente manera:

- ❖ Hepatotóxicos
- ❖ Nutricionales o dietarios
- ❖ Inmunológicos
- ❖ Alcohólicos
- ❖ Metabólicos
- ❖ Transgénicos

Las especies animales frecuentemente usadas son ratas, ratones, perros, puerquitos de guinea, monos y babuinos (Tabla.-3). Cada modelo tiene características únicas dependiendo de la naturaleza de la patogénesis de la fibrosis o cirrosis (Scand, 1996).

Tabla 3.- Diferentes Modelos experimentales animales.

Clasificación	Especie	Método Inductivo	Ubicación de la Lesión	Fibrosis	Cirrosis
HEPATOTOXINAS					
CCl <sub>4</sub> Tetracloruro de Carbono	Rata	Inyección subcutánea con sol. al 50%. 1-2 ml/Kg de peso.	Centrolubulillar	>6 semanas	>12sem
				>1-2 semanas	>4 sem
DMNS Dimetilnitrosa mina	Rata	Inyección intraperitoneal 3 veces por semana.	Central-portal	>4 semanas	>13 semanas
	Perro	Oral una vez a la semana	Central-portal	>3-4 semanas	>13 semanas
TAA Tioacetamida	Rata	TAA en agua (300mg/L)  Inyección Intraperitoneal	Central-portal, Portal- Portal; Expansión de tractos portales.	>2-3 meses	>3 meses
	D- galactosamina	Ratas	Inyección Intraperitoneal 500mg/kg de peso		
Nutricional	Rata/ Ratón	Dieta Alta en grasa, baja en colina, baja en proteína.	Centrolubulillar,	>6 semanas	>12-24 sem
INMUNOLÓGICA					
Suero Heterólogo	Rata	Inyección Intraperitoneal de suero de puerco	Periportal, central-portal	>5 semanas	>10 sem
Albumina Heteróloga	Rata	Inyección Intraperitoneal 4 mg de albumina humana, 3 veces durante 30 días.	Periportal	>5-11 semanas	
Células Bacterianas	Rata	Inyección Intraperitoneal de células de Estreptococos (20mg/g de peso)	Periportal granulomatoso	>6 semanas	>10 sem
Alcohólica					
Alcohólica	Rata	Dieta líquida que contenga etanol.	Centrolubulillar	>6 meses	>24 meses

El  $\text{CCl}_4$  es una de las hepatotoxinas comúnmente usadas para la inducción de fibrosis y cirrosis en animales de laboratorio. Las características histológicas principales producidas durante las fases tempranas de intoxicación son, el daño a los hepatocitos y la inflamación significativa. Después de 6-9 semanas de intoxicación, la necrosis de los hepatocitos, la degeneración e infiltración inflamatoria, la regeneración del tejido, la proliferación de las células del Ito y la excreción del tejido conectivo constituyen las características histológicas más notables. La infiltración fibrótica periportal y perivenular parece ser predominante.

La cirrosis micronodular es la consecuencia patológica principal de una intoxicación a largo plazo. Las lesiones en otros órganos causados por la intoxicación son mínimas. Los metabolitos reactivos del  $\text{CCl}_4$  como el radical tricloruro de metilo ( $\text{CCl}_3$ ) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por el sistema de citocromo p450, causan la peroxidación de lípidos, la cual es considerada responsable del daño hepatocelular y el aumento de la producción de tejido conectivo. Con el modelo de  $\text{CCl}_4$  se produce una acumulación anormal de MEC y se observa la disminución de la expresión de colagenasa, y el desbalance en la expresión de los inhibidores de metaloproteínas que sugieren la reducción de degradación de MEC. Varias sustancias que inducen la actividad enzimática del citocromo p450 pueden potenciar la hepatotoxicidad de los metabolitos de  $\text{CCl}_4$  y acelerar la formación de la fibrosis/cirrosis, sin embargo la mortalidad de los animales tratados con la combinación se incrementa. Estos reactivos incluyen fenobarbitona, fosfolipasa D, acetona y etanol. La fibrosis-cirrosis inducida por el  $\text{CCl}_4$  se asemeja a la cirrosis humana en algunos aspectos de morfología y patofisiología, como por ejemplo, en ambos casos la regeneración de hepatocitos ocurre después de la necrosis y la infiltración fibrótica es irreversible en los estados más avanzados de cirrosis (Khan y cols., 2008; Hartley et al., 1999; Scand, 1996).

La fibrosis o cirrosis inducida por el  $\text{CCl}_4$  no es un modelo muy real para post-hepatitis o cirrosis alcohólicas, pero mantiene una relación con el desarrollo de hepatocarcinoma.

La DMNS y la TAA son dos agentes carcinogénicos hepáticos muy comunes. La DMNS es metabolizada por los microsomas a sus metabolitos, los cuales causan un mal funcionamiento de los hepatocitos, al unirse en forma covalente a moléculas esenciales de la célula (ácidos nucleicos, proteínas). El metabolismo de la DMNS genera una metionina metilada activa que posiblemente causa mutaciones en los ácidos nucleicos y proteínas, lo que permite la necrosis hepatocelular. A diferencia del CCl<sub>4</sub>, la DMNS no causa esteatosis en los hepatocitos. Otra característica importante del modelo es que la fibrosis o cirrosis parece ser progresiva por varios meses después de descontinuada la intoxicación. El modelo ha sido usado para estudiar la expresión de varios componentes de MEC *in situ* y para evaluar la confiabilidad de los marcadores en suero para fibrosis (Ryhänen y cols., 1996).

La TAA es un reactivo hepatotóxico clásico usado para la inducción de cirrosis hepática y ha sido recientemente usada para inducir fibrosis en ratas. Durante el desarrollo de fibrosis inducida por TAA en las ratas se observa disminución en la fenestración del endotelio sinusoidal y la formación de una membrana basal unida a la estructura del espacio de Disse. Con este modelo fue definida, por hibridación *in situ*, la relación entre la expresión de los proteoglicanos biglicanos y decorinas y las citocinas fibrogénicas, como el factor de crecimiento transformante  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) (Webb y cols., 2008).

D-galactosamina(N-gal), es otra hepatotoxina que *in vivo* induce un daño al hígado similar al producido por el virus de la hepatitis, por disminución de trifosfato de uridina (UTP) y otros nucleótidos de uridina y como consecuencia la disminución de la síntesis de RNA y proteínas de membrana. La sustancia es usualmente usada para la inducción aguda de daño al hígado por requerir una repetida administración peritoneal a ratas. Después de 20-40 inyecciones (7-13 semanas) hay expansión de los tractos portales, prominente proliferación de los conductos biliares y a intervalos largos, formación gradual de septos fibrosos con el desarrollo de cirrosis (Scand, 1996).



La fibrosis hepática inducida por una dieta alta en grasa, baja en colina, baja en proteína o baja en metionina o etionina produce fibrosis o cirrosis nutricional. Estudios tempranos con este modelo mostraron una relación central entre el contenido de grasa en la dieta y la severidad de la cirrosis inducida por la deficiencia de colina. En este modelo se confirmó que el valor en suero del péptido III de procolágena (PIIINP) predice en un cierto plazo el contenido de hidroxiprolina y colágena en ratas fibróticas. Sin embargo, se han considerado como desventajas de este modelo el que la respuesta en los animales cambia con las distintas especies dependiendo de la susceptibilidad a la deficiencia colina, la duración prolongada del experimento, y la dificultad para el estudio de los estados patológicos (Ruwart y cols., 1993).

La fibrosis hepática también puede ser inducida inmunológicamente por varios métodos. Los ratones infectados con *Schistosoma mansoni* desarrollan granulomas en el hígado, los cuales incrementan la síntesis de MEC como resultado de la respuesta inflamatoria e inmunológicas a los huevos del parásito. El modelo tiene características patológicas similares a la equistosomiasis humana, y la ventaja de que la síntesis y degradación de MEC han sido usadas para probar la eficacia de agentes antifibróticos, como la colchicina, interferon  $\gamma$ , praziquantel y para determinar la expresión de las isoformas de TGF- $\beta$  en el hígado.

Por su parte, la fibrosis hepática inducida mediante inyecciones de albúmina humana muestra algunas diferencias en la expresión en los tipos de procolágena y TGF- $\beta$ , con respecto a la fibrosis inducida por CCl<sub>4</sub>.

Se ha demostrado por inmunohistoquímica, en el modelo de fibrosis inducido por suero porcino en la rata, que no solo proliferan las células del Ito, sino también los fibroblastos y tienen una función en el desarrollo de la fibrogénesis hepática. El modelo inmunológico de fibrosis hepática ha sido usado en el estudio de la capilarización del sinusoides durante el proceso fibrótico (Wyler, 1991; Scand, 1996).

Otra manera de inducir fibrosis hepática es a través del suministro de alcohol.

El control de la ingesta de etanol por animales experimentales, especialmente en roedores, ha presentado problemas para establecer el control de la ingesta. El modelo francés de Tsukamoto (rata) provee aparentemente un control de la ingesta completo, permitiendo el estudio del papel relativo del etanol y la nutrición durante el curso de la exposición alcohólica, con una alta reproducibilidad experimental. El resultado obtenido de este modelo apoya fuertemente la contribución de la hipoxia centrolobulillar como un mecanismo patogénico de la necrosis hepática por alcohol. En contraste con otros modelos, en el daño inducido con etanol, el aumento de peroxidación de lípidos no es evidente en fases tempranas pero si puede demostrarse cuando ha avanzado el daño hepático.

Esto sugiere que la peroxidación de lípidos no es un prerrequisito para la necrosis hepática alcohólica pero tal vez es un factor de inicio para la fibrogénesis en este modelo. Sin embargo los ensayos inmunohistoquímicos no muestran la proliferación significativa de las células del Ito y no se encontró fibrosis en este modelo después de 1-2 meses de administración intragástrica de etanol (Arnon y cols., 1995).

El ratón rino, un mutante con un gen autosómico recesivo que produce un tegumento anormal y fibrosis hepática espontánea, ha sido usado para examinar mecanismos inmunológicos de fibrosis hepática (Scand, 1996).

Los modelos animales son necesarios para estudiar la patogénesis y el tratamiento de estas enfermedades. El tiempo transcurrido desde la inflamación inicial producida por el daño en el hígado, a la formación de fibrosis o cirrosis en humanos, es mucho más larga que en algunas especies animales. Sin embargo, aunque los modelos animales no pueden precisamente recapitular la enfermedad humana con precisión, pueden servir para enriquecer la comprensión del mecanismo patogénico de la fibrosis hepática.

En este contexto, la evaluación precisa de la magnitud de la fibrosis hepática adquiere gran relevancia, para el manejo de pacientes con enfermedades hepáticas crónicas. La cuantificación del grado de fibrosis en el hígado permite etapificar el proceso patológico, desde sus fases iniciales hasta el establecimiento

de la cirrosis. Ello posee implicaciones para el pronóstico de los pacientes con enfermedades hepáticas, particularmente en escenarios clínicos como la infección por el virus de la hepatitis C, la esteato-hepatitis no alcohólica o el trasplante hepático. Además en la actualidad, el detener la progresión y, eventualmente revertir la fibrogénesis se está constituyendo en un blanco terapéutico de interés cuya medición precisa es deseable. El estudio histológico continúa siendo el patrón de comparación (“estándar de oro”) para la evaluación de la fibrosis hepática. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la biopsia hepática adolece de limitaciones significativas para este proceso (*Arrese, 1996*).