



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ACARREADORA  
DEL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINOIDE 5 (IGFBP5)  
DURANTE EL DESARROLLO DE LA  
FIBROSIS HEPÁTICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

**IVETTE IRAIS ROMERO BELLO**



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Q.F.B. Martha Leticia Jiménez Pardo

**VOCAL:** Dr. Ignacio Camacho Arroyo

**SECRETARIO:** Dra. Carolina Guzmán Arriaga

**1er. SUPLENTE:** Dr. Guillermo Celestino Cardoso Saldaña

**2do. SUPLENTE:** M. en C. Ruth Bustamante García

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO  
UNIDAD DE MEDICINA EXPERIMENTAL  
LABORATORIO DE HÍGADO, PÁNCREAS Y MOTILIDAD (HIPAM)**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. CAROLINA GUZMÁN ARRIAGA**

**SUSTENTANTE:**

**IVETTE IRAIS ROMERO BELLO**



## Índice

	<b>Página</b>
<b>I. Resumen</b> .....	8
<b>II. Marco teórico</b>	
a. Fibrosis hepática .....	10
b. Sistema de los factores de crecimiento insulinoide .....	16
c. Generalidades de la IGFBP-5 .....	19
d. IGFBP-5 y su implicación en la fibrosis .....	22
<b>III. Planteamiento del problema</b> .....	25
<b>IV. Hipótesis</b> .....	25
<b>V. Objetivos</b>	
a. Objetivo general .....	26
b. Objetivos particulares .....	26
<b>VI. Material y métodos</b>	
1. Animales y alojamiento .....	27
2. Inducción de fibrosis hepática y grupos experimentales .....	27
3. Extracción de ácido ribonucleico (RNA) total .....	28
4. Obtención de la concentración del RNA total extraído .....	29
5. Integridad del RNA .....	29
6. Síntesis de DNA complementario (cDNA) .....	29
7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	30
8. Gel de agarosa para electroforesis .....	32
9. Extracción de proteínas .....	32
10. Integridad de las proteínas extraídas .....	33
11. Cuantificación de IGFBP-5 en el tejido hepático .....	33
12. Tinciones de H-E, Tricrómica de Masson y Rojo Sirio .....	36



13. Observación de los cortes histológicos con diferentes tinciones .....	36
14. Análisis densitométrico .....	36
15. Análisis estadístico .....	36
<b>VII. Resultados</b>	
a. Fibrosis .....	37
b. Reversión de la fibrosis .....	48
<b>VIII. Discusión</b> .....	56
<b>IX. Conclusiones</b> .....	60
<b>X. Anexo I</b> .....	61
<b>XI. Referencias</b> .....	63

## I. Resumen

La fibrosis hepática es una respuesta cicatrizal a una lesión en el hígado, ya sea aguda o crónica, que puede ser reversible y se caracteriza por la acumulación de matriz extracelular (MEC) en el espacio de Disse. Si la lesión es recurrente, la inflamación crónica y la acumulación de MEC inducirán una sustitución progresiva del tejido normal del hígado por tejido cicatrizal, lo que conduce al desarrollo de cirrosis.

La cirrosis hepática, consecuencia final en la progresión de la fibrosis en el hígado, tiene un mal pronóstico y alta morbi-mortalidad; ocupando una de las 10 principales causas de muerte en México. Si bien se han descrito los mecanismos generales que producen fibrosis en el hígado, recientemente se han propuesto diversas moléculas que podrían tener una participación en la progresión de la fibrosis hepática, tal es el caso de la familia de proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide, también conocidas como IGFBPs por sus siglas en inglés.

Las IGFBPs son una familia de proteínas sintetizadas en el hígado que se unen y modulan las acciones mitogénicas de los factores de crecimiento insulinoide (IGF) 1 y 2.

Se ha reportado en la literatura que algunas de las proteínas de esta familia tienen funciones independientes de los IGFs. En el caso particular de IGFBP-5, ésta puede aumentar la supervivencia de las células estelares hepáticas, que son las principales células pro-fibrogénicas en el hígado.

Además, se ha visto que IGFBP-5 se encuentra estrechamente relacionada con la fibrosis en órganos como pulmón y piel, en las cuales la expresión de IGFBP-5 está incrementada y regula la expresión de proteínas de MEC.

A partir de estas evidencias, en el presente trabajo se determinó la expresión y niveles de IGFBP-5 en la progresión de la fibrosis hepática en un modelo murino,

así como de otras moléculas relacionadas con la activación de las células estelares hepáticas y en la fibrosis ( $\alpha$ -SMA y desmina), mediante la inducción del desarrollo de fibrosis hepática por tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) en ratas macho.

Los resultados obtenidos muestran que conforme aumenta el número de dosis de  $\text{CCl}_4$  en las ratas, el daño hepático incrementa conllevando al desarrollo de fibrosis y finalmente al de cirrosis; además se tuvo un grupo de roedores a los cuales se les retiró el insulto de  $\text{CCl}_4$  por 4 semanas después de 10 semanas de tratamiento con el agente agresor.

Asimismo, se muestra que el mRNA de IGFBP-5 se sobreexpresa en la cirrosis hepática mientras que la cantidad de proteína en el tejido hepático está disminuida. Por otro lado, la expresión de  $\alpha$ -SMA y desmina parece tener una tendencia a aumentar conforme se incrementa el daño hepático.

Estos datos sugieren que la IGFBP-5 podría tener una participación en la última etapa de la fibrosis pero se necesitan más estudios para poder dilucidar mejor el papel de esta proteína en la fibrosis hepática.

## II. Marco teórico

### a. Fibrosis hepática

La fibrosis es la acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC), que resulta de una inflamación crónica no resuelta [1]. Esta inflamación desencadena un proceso de reparación tisular que conduce a la formación de tejido de cicatrizal [1]. Este proceso puede darse en órganos como piel, riñón, pulmón o hígado y se desarrolla por diferentes etiologías.

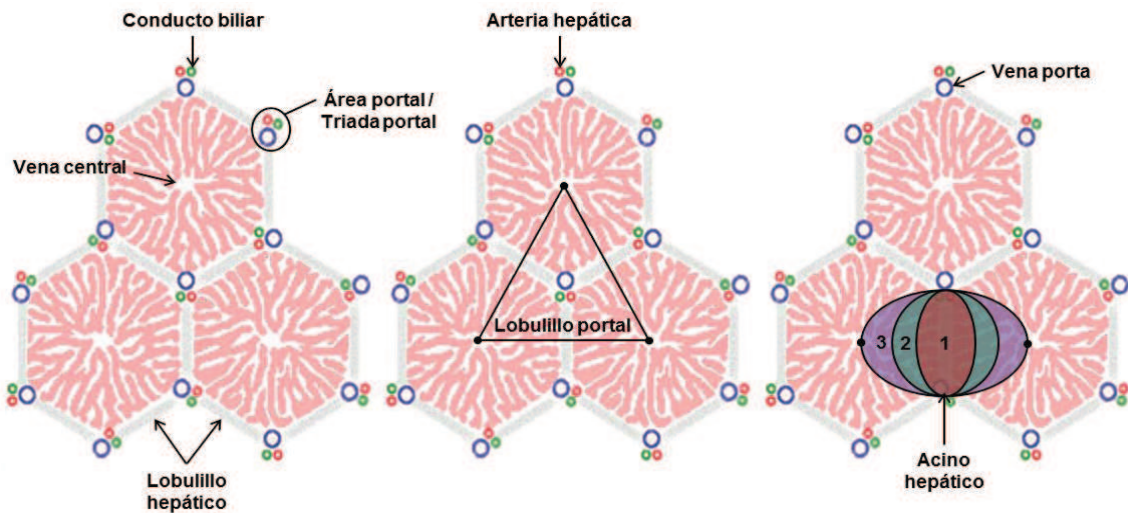
En el hígado, la fibrosis se origina de las hepatitis crónicas virales B o C, enfermedades biliares y autoinmunes, esteatohepatitis alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés) y la enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD, del inglés *non-alcoholic fatty liver disease*).

El hígado es un órgano con una arquitectura considerablemente organizada, esta organización puede tener 3 conceptos de unidad estructural: lobulillo hepático, lobulillo portal o acino hepático, siendo los más comunes el acino y lobulillo hepático, estos 3 conceptos se representan en la Figura 1.

El lobulillo hepático es una unidad con forma hexagonal, siendo la vena hepática terminal, también conocida como vena central, la estructura central de esta unidad y la periferia definida por la triada portal (vena porta, canalículo biliar y arteriola hepática) [2].

Por otro lado, el acino es una unidad de forma de elipse que conecta 2 lobulillos hepáticos, en su periferia se ubican espacios portales y venas hepáticas terminales. Esta unidad funcional es pequeña y se divide en tres zonas; la zona 1 representa el área alrededor de los tractos portales (también conocida como área periportal del lobulillo), la zona 3 representa el área alrededor de la vena central (también conocida como área pericentral del lobulillo) y la zona 2 es una zona en el centro del acino entre las zonas 3 y 1 [3].

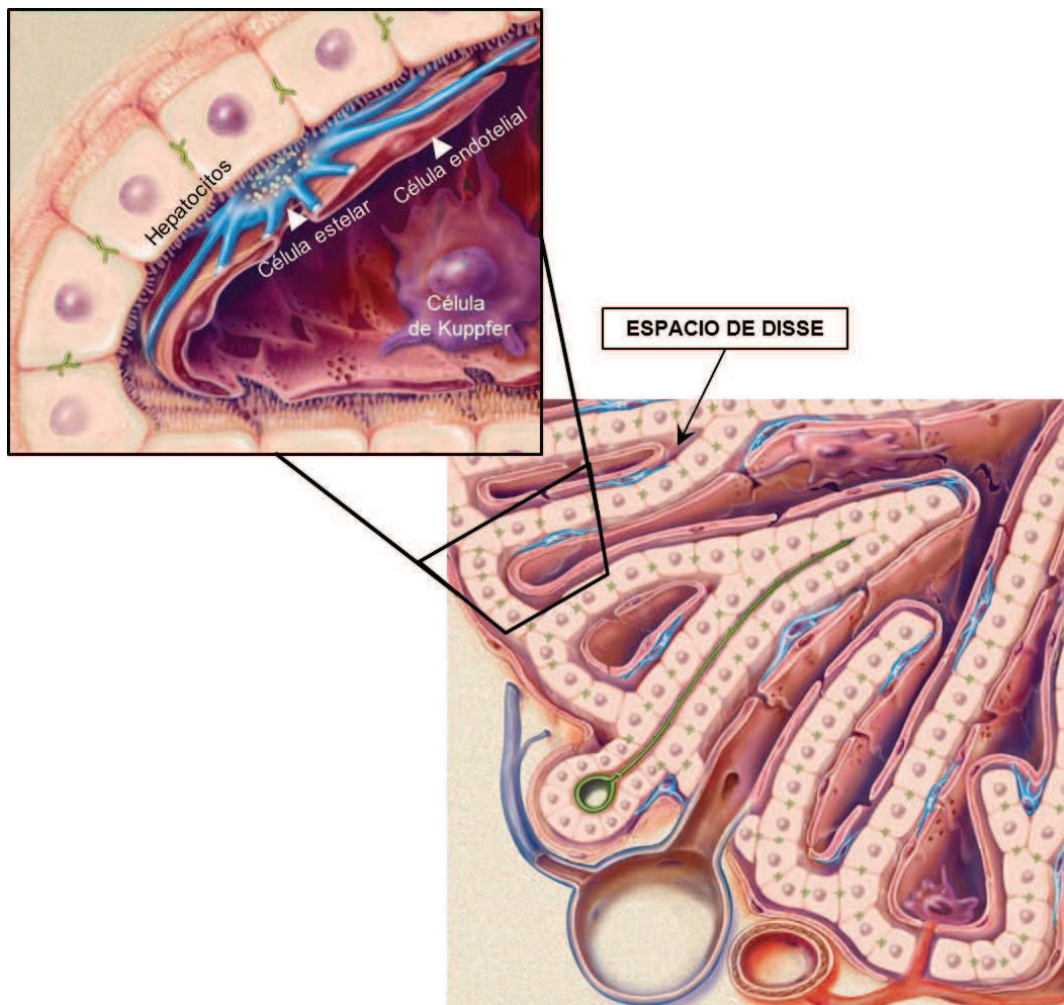




**Figura 1. Esquema de los 3 conceptos de unidad funcional hepática.** Triada o área portal: Vena porta (azul), conducto biliar (verde) y arteria hepática (rojo). El lobulillo hepático se observa con forma hexagonal y en cada vértice una triada portal. El lobulillo portal está formado por 3 lobulillos hepáticos que forman un triángulo, en cada vértice se encuentra una vena central y en el centro una triada portal. El acino hepático con forma de elipse abarca 2 lobulillos hepáticos y se divide en 3 zonas, zona 1 (rojo), zona 2 (verde) y zona 3 (morado). Imagen tomada y modificada de [4].

En el lobulillo hepático podemos encontrar diferentes células que la componen, y se pueden diferenciar esencialmente en 2 tipos: parenquimales y no parenquimales, las primeras son células que componen el parénquima hepático, como los hepatocitos y las células endoteliales; las segundas son básicamente células residentes del tejido hepático, dentro de las cuales están las células estelares (HSC, células que funcionan como depósitos de retinol) y las células de Kupffer (macrófagos residentes del hígado). Las células parenquimales forman parte estructural de la unidad microvascular hepática, la cual es conocida como sinusoides.

El sinusoides tiene un revestimiento endotelial, distinguido por su fenestración, y está separado de los hepatocitos por el espacio subendotelial de Disse [5]. Es en este lugar, donde se encuentran las HSCs y ocurre la acumulación de MEC procedente de la fibrogénesis, como se aprecia en la Figura 2.

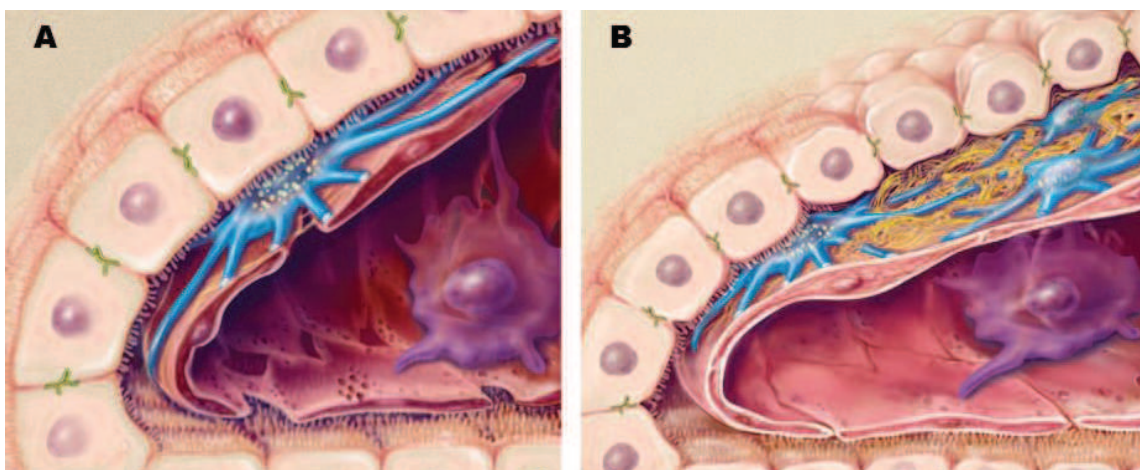


**Figura 2. Estructura del tejido hepático.** En el hígado los hepatocitos están organizados en hileras o cordones. El espacio subendotelial (espacio de Disse) se encuentra entre los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales, en esta zona se ubican las células estelares (azul). Las células de Kupffer (morado) se sitúan de manera intrasinusoidal. Imagen tomada de [6].

Durante la fibrogénesis existen muchas alteraciones en la arquitectura hepática, así como en sus células residentes, siendo los principales cambios: 1) la acumulación de MEC en el espacio de Disse, 2) la pérdida de las fenestraciones endoteliales y de las microvellosidades de los hepatocitos y 3) la activación de las HSCs, las cuales adquieren un fenotipo similar a miofibroblastos que es contráctil, proliferativo y fibrogénico [7]. Estas transiciones se pueden observar en la Figura 3.

Por ser, la activación de las HSCs, uno de los sucesos relevantes en la fibrogénesis, involucrada en la perpetuación de la fibrosis, se han identificado varias moléculas como marcadores de ésta activación, pero la principal y más utilizada es  $\alpha$ -SMA, esta molécula también es expresada por células contráctiles, por ejemplo los miofibroblastos. Además, existen diversos estudios que demuestran una correlación entre la severidad de la fibrosis hepática y el número de células estelares activadas presentes en el hígado [8].

Otra molécula que está relacionada con las HSCs es desmina, la cual se expresa en esta estirpe celular pero no puede diferenciar entre células activadas y quiescentes [9, 10]; esta proteína pertenece a los filamentos intermedios del citoesqueleto de estas células.



**Figura 3. Principales modificaciones de la arquitectura hepática durante la fibrogénesis. A:** Hígado normal, los hepatocitos se encuentran alineados, ordenados y con sus microvellosidades, el endotelio sinusoidal presenta sus fenestraciones características, la célula estelar hepática (azul) con sus depósitos de retinol se ubica en el espacio de Disse, y la célula de Kupffer (morado) dentro del sinusoido. **B:** Hígado con fibrosis, distorsión en la morfología de los hepatocitos y pérdida de sus microvellosidades, pérdida de las fenestraciones del endotelio sinusoidal; acumulación de MEC (amarillo) y activación de HSCs (pérdida de los depósitos de retinol, adquisición del fenotipo parecido a miofibroblasto y proliferación celular) en el espacio de Disse, y activación del macrófago residente. Imagen tomada de [6].

Cuando la lesión es aguda o autolimitada, estos cambios son transitorios, y la arquitectura del hígado regresa a la normalidad. Pero si la lesión se sostiene, la inflamación crónica y la acumulación de MEC persisten, no sólo por el aumento de la síntesis de componentes de la matriz sino también por una disminución de los mecanismos fisiológicos de degradación de MEC [11]; que con el tiempo llevará a una sustitución progresiva del parénquima hepático por tejido cicatrizal [5].

La acumulación progresiva de MEC resulta en cirrosis, que es una condición definida por una arquitectura anormal del hígado que se caracteriza por la presencia de septos fibróticos gruesos que rodean a los nódulos de regeneración formados por hepatocitos y una vascularización alterada a nivel sinusoidal con efectos en la circulación portal, y es la principal causa de morbilidad y mortalidad relacionada con el hígado [1, 7]. Además, el hígado cirrótico es un estado precanceroso y se considera el principal factor de riesgo para desarrollar carcinoma hepatocelular.

Desde hace varios años existe el concepto de que la cirrosis es irreversible y hasta el momento esto sigue siendo verídico pero sólo en humanos, ya que actualmente hay evidencia de reversibilidad de la cirrosis en modelos animales experimentales, en los cuales, el incremento en la expresión de un gen, como IGF-I [12] o la eliminación del agente etiológico [13] resulta en la regresión de la fibrosis.

Para el diagnóstico de la fibrosis hepática, la biopsia es la base y representa el estándar de oro para el mismo [14], pero tiene el inconveniente de que es un método invasivo que puede llegar a presentar complicaciones médicas en el paciente; además, podría presentar errores en el muestreo y variabilidad intra e inter observador.

Con respecto a la clasificación de la actividad y estadificación de la fibrosis, uno de los sistemas de puntuación más utilizados es la escala METAVIR, principalmente por su simplicidad. En la Tabla 1 se presenta la escala METAVIR, la cual se

estadifica en 5 etapas, F0-F4 [15, 16]; así como la descripción de cada estadio. Mientras que la Figura 4 representa los estadios de la fibrosis (F1, F2, F3 y F4).

Estadio	Definición del estadio	Descripción
<b>F0</b>	No fibrosis	Sin fibrosis
<b>F1</b>	Fibrosis portal sin septos	Ensanchamiento portal con aspecto estelar sin formación de septos
<b>F2</b>	Fibrosis portal con algunos septos	Ensanchamiento portal con aspecto estelar con septos ocasionales
<b>F3</b>	Numerosos septos sin cirrosis	Presencia de abundantes septos
<b>F4</b>	Cirrosis	Presencia de abundantes septos y nódulos de regeneración

Tabla 1. Escala METAVIR. [15, 17]

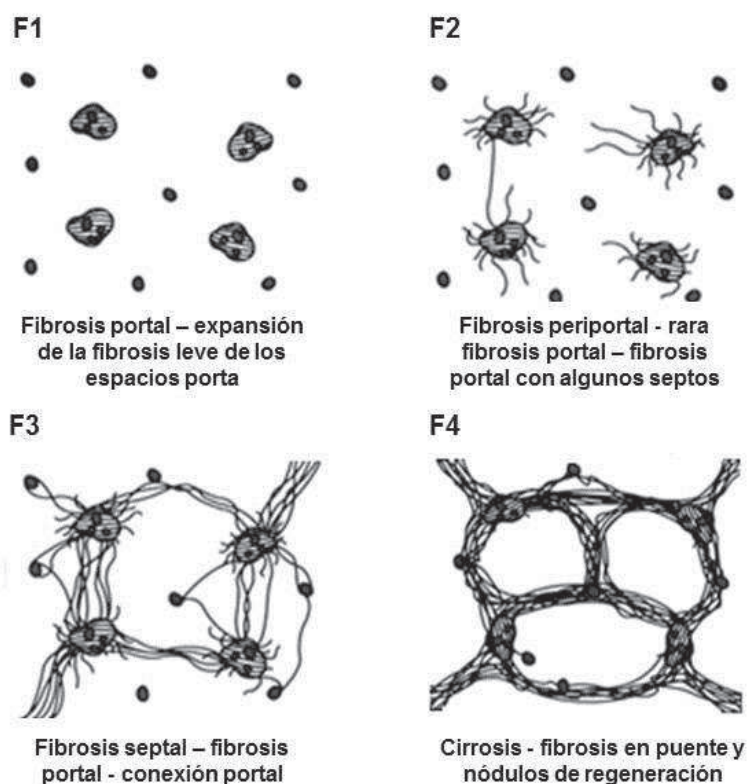


Figura 4. Representación de los diferentes estadios de la fibrosis de acuerdo a la escala METAVIR.[18]

Dadas las desventajas que presenta la biopsia hepática, desde hace ya varios años se han buscado métodos no invasivos que permitan evaluar el grado de fibrosis y la funcionalidad hepática.

Actualmente existen pruebas no invasivas que miden el grado de fibrosis pero su capacidad de diagnóstico es pobre, ya que no poseen una clara diferenciación entre las etapas intermedias de la fibrosis.

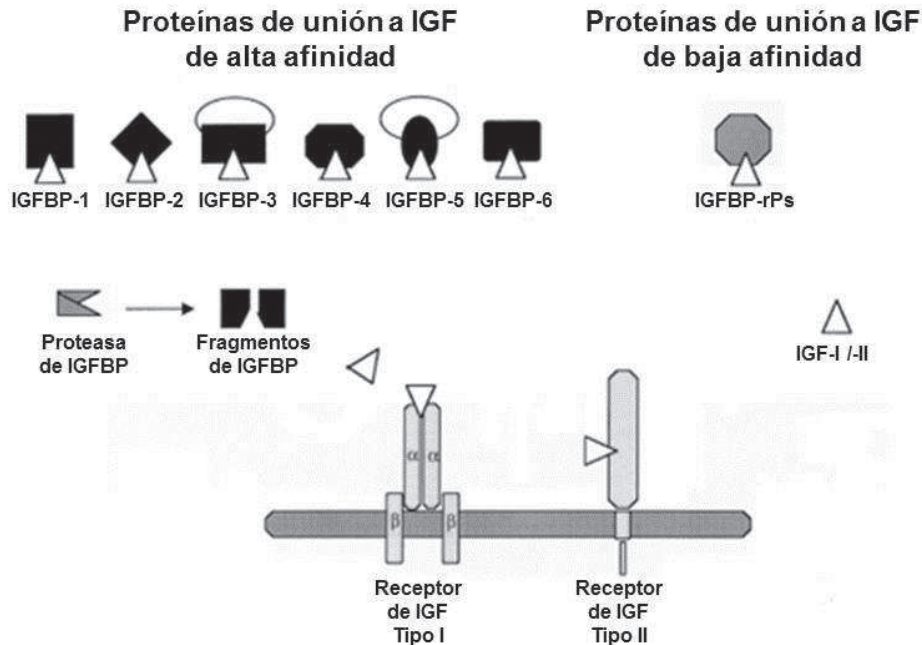
También se han estudiado diferentes moléculas como biomarcadores potenciales (derivadas del daño hepático) y combinaciones de múltiples parámetros (paneles de biomarcadores), algunos de estos parámetros tienen una relación indirecta con la fibrogénesis y sólo unos pocos pueden ser considerados como directamente relacionados con la fibrogénesis [19]; pero ni los marcadores individuales ni los paneles cumplen con los requisitos de un biomarcador no invasivo ideal (molécula específica del hígado, secretada a circulación y sobreexpresada en el daño hepático) para el diagnóstico de la fibrosis.

En años recientes se han propuesto diversas moléculas que podrían tener una participación real en la progresión de la fibrosis hepática. Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la familia de proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide o IGFbps, por sus siglas en inglés, presentan alteraciones significativas en el suero de pacientes con fibrosis, causada por la infección crónica del virus de hepatitis C, comparados con donadores de banco de sangre (controles); siendo la IGFbp-1 la más representativa, con un incremento en los niveles séricos de 25 veces [20].

#### **b. Sistema de los factores de crecimiento insulinoide**

El sistema de los factores de crecimiento insulinoide o IGFs (del inglés, *Insulin-like Growth Factor*) tiene distintos componentes (Figura 5), IGF-I, IGF-II, receptores de IGF I y II, proteínas de unión a los IGFs (IGFBPs) y proteasas de las IGFBPs; sin

embargo, las funciones de algunas de estas moléculas no han sido dilucidadas completamente.



**Figura 5. Componentes del sistema IGF.** En la figura se representan los distintos componentes del sistema IGF: IGF-I y -II (blanco), proteínas de unión a IGF de alta afinidad (negro), proteínas de unión a IGF de baja afinidad (gris), proteasas de las IGFBPs y receptores de IGF tipo I y II. Imagen tomada y modificada de [21].

IGF-I e IGF-II son péptidos hormonales estructuralmente similares a la insulina, de aproximadamente 7 kDa, y altamente homólogos entre sí. Los IGFs son mitógenos que afectan diferentes funciones e interactúan con receptores específicos de superficie celular, IGF-IR e IGF-IIR, así como con el receptor de la insulina. En las células, IGF-I ejerce diversas acciones biológicas, a través de la unión al IGF-IR, como: proliferación celular, diferenciación, migración, supervivencia, metabolismo, contractilidad, entre otras; mientras que el IGF-II se une al receptor tipo II de IGF, estando su función hasta el momento menos esclarecida, además este receptor funciona para ligandos que poseen manosa-6-fosfato [21].

La unión de IGF-I con su receptor induce la activación de múltiples cascadas de transducción de señales, incluyendo la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía del fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3-K)-Akt [22].

En fluidos biológicos, los IGFs están normalmente unidos a sus proteínas acarreadoras (IGFBPs). Estas proteínas presentan características estructurales similares entre ellas, por ejemplo, poseen un gran número de residuos de cisteína altamente conservados.

Se han caracterizado seis IGFBPs (IGFBP1-6) que tienen afinidades altas para IGF-I, incluso mayores que las del IGF-IR con su ligando. Las IGFBPs actúan no sólo como portadores de los IGFs, prolongando su vida media, también funcionan como moduladores de la biodisponibilidad y actividad de los IGFs [21].

En cuanto a las funciones de las IGFBPs, está perfectamente establecido que algunas de estas proteínas inhiben las acciones de los IGFs, como IGFBP-4 e IGFBP-6 [22], mientras que otras las potencian, por ejemplo, la IGFBP-1 puede inhibir o promover la acción de IGF-I dependiendo de su procesamiento post-traducciona [21, 23].

Las acciones de las IGFBPs son moduladas por proteasas de IGFBPs, que dependen a su vez de activadores e inhibidores de proteasas. Estas proteasas son capaces de escindir a las IGFBPs en formas que pueden o no reducir significativamente su afinidad por IGF. Una de las primeras proteasas identificadas fue una proteasa específica para IGFBP-3, la cual está asociada al embarazo y presenta activación desde el primer trimestre [24].

Otro componente del sistema IGF son las proteínas relacionadas con IGFBPs (IGFBP-rPs), estas proteínas presentan secuencias similares de aminoácidos y también pueden unirse a IGF, pero con baja afinidad [21].

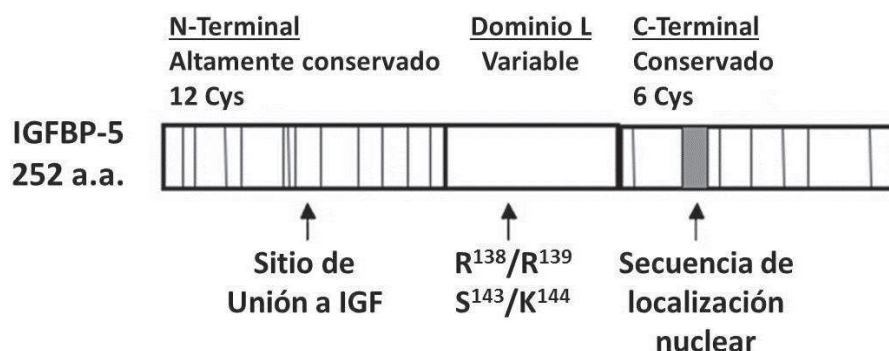


### c. Generalidades de la IGFBP-5

IGFBP-5 pertenece a la familia de IGFBPs y se une a IGF con alta afinidad; tiene un peso de 24-44kDa, comprende 252 aminoácidos y puede presentar modificaciones post-traduccionales como glicosilación y fosforilación [25, 26].

Al igual que el resto de las IGFBPs, la característica primordial de esta proteína es su secuencia primaria, con un gran número de residuos de cisteína altamente conservados. IGFBP-5 presenta 3 dominios: dominio amino-terminal (N-terminal), dominio de región central o media (dominio L) y dominio carboxilo-terminal (C-terminal), como se observa en la Figura 6.

Existen 18 residuos de cisteína en la IGFBP-5: 12 y 6, en los dominios N- y C-terminal, respectivamente. Estos residuos de cisteína dan lugar a la formación de 2 puentes disulfuro, el primero entre la cisteína 9 (Cys<sup>47</sup>) y la cisteína 11 (Cys<sup>60</sup>); y el segundo puente, entre la cisteína 10 (Cys<sup>54</sup>) y la cisteína 12 (Cys<sup>80</sup>) [26].



**Figura 6. Estructura de la IGFBP-5.** El dominio amino-terminal (N-terminal) está altamente conservado, incluyendo 12 residuos de cisteína. El dominio carboxilo-terminal (C-terminal) también se conserva, incluyendo 6 residuos de cisteína. El dominio central (dominio L) es variable. Imagen tomada de [22].

El dominio amino-terminal está altamente conservado y contiene el sitio de unión a IGF. Por otro lado, el dominio central, es más variable en longitud y secuencia de aminoácidos, y frecuentemente contiene sitios para la regulación post-traduccionales

que incluyen glicosilación, fosforilación, y proteólisis. Estas modificaciones sólo se han encontrado hasta ahora en esta región, pero no en los dominios N- o C-terminales [21, 22].

El dominio carboxilo-terminal puede contribuir a la capacidad de unión a IGF e interviene en la interacción de la IGFBP-5 con otras proteínas, por ejemplo, IGFBP-5 se puede unir a la subunidad ácido lábil (ALS, por sus siglas en inglés) a través de un motivo altamente básico en este dominio. Además, este dominio está involucrado con la interacción de IGFBP-5 con otras proteínas como los glicosaminoglicanos de la MEC y con la superficie celular, también presenta motivos de unión a heparina [27, 28] y una secuencia de localización nuclear [22, 29, 30].

Otro ejemplo de la interacción de la IGFBP-5 con otras moléculas, es su capacidad para unirse a proteínas como vitronectina, tenascina, trombospondina-1 (TSP-1), osteopontina [29], así como al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) [31] y a minerales como la hidroxapatita [32]. Si estos factores interactúan con el complejo ALS•IGFBP-5 se desconoce.

La ALS es una glicoproteína de aproximadamente 85 kDa, rica en leucina, que forma complejos ternarios con IGF-I o -II e IGFBP-5 [32] o IGFBP-3, aunque principalmente con esta última [29]. El complejo ternario IGFBP-5, ALS e IGF tiene un peso aproximado de 130 kDa y es más estable en presencia de IGF-I que de IGF-II [32, 33].

Los complejos ternarios de IGFBP-5, proporcionan un depósito para la liberación de IGF y aumentan en gran medida la vida media de este factor de crecimiento, aproximadamente 12-15 hrs [25, 34], esto posiblemente está involucrado en la regulación local de las acciones de IGF; de la misma forma, los complejos binarios (IGF•IGFBP-5) actúan como un reservorio de IGF extracelular pero se desconoce

si este tipo de complejos llegan a múltiples sitios tisulares o se dirigen selectivamente a tejidos particulares [33, 34].

Por otro lado, la capacidad de IGFBP-5 de unirse a otras proteínas puede verse afectada de manera indirecta, porque esta IGFBP presenta modificaciones post-traduccionales [26]. De igual manera, estos cambios en IGFBP-5 pueden alterar su actividad biológica, por ejemplo, modificando su afinidad de unión al IGF [23, 24].

La glicosilación en IGFBP-5 no afecta la unión a IGF, pero modifica otras propiedades, tales como estabilidad, susceptibilidad a la proteólisis y asociación celular [35], y se tiene evidencia de que IGFBP-5 presenta O-glicosilación pero no N-glicosilación [21, 36].

IGFBP-5 contiene 3 sitios de O-glicosilación, en contraste, esta proteína posee 13 sitios potenciales de fosforilación: 5 para CK2 (caseína-cinasa 2), 1 para PKA (cinasa dependiente de AMP cíclico), 4 para PKC (cinasa dependiente de calcio y fosfolípidos) y 3 sitios para MAPK (cinasa activada por mitógenos) [29, 37].

Algunos estudios proponen que IGFBP-5 puede ser secretada como una fosfoproteína, sin embargo, no existe evidencia sobre el efecto de la fosforilación en las acciones de IGFBP-5 y por consiguiente, se desconoce si la fosforilación puede modular la biodisponibilidad de IGF en los niveles del complejo binario o en el complejo ternario con ALS, como en el caso de otras IGFBPs [29, 36]; no obstante, se ha considerado la posibilidad de que el grado de fosforilación podría estar directamente relacionado con la estabilidad, la vida media de la proteína de unión [37] y la interacción con proteínas en su camino hacia el núcleo, ya que la fosforilación es un mecanismo usual para modular la actividad de las proteínas [30].

En el caso de la proteólisis, se ha demostrado que esta modificación post-traducciona l disminuye hasta 7 veces la afinidad de unión de IGFBP-5 a IGF [23, 35], lo que podría dar como resultado un incremento de la actividad de IGF; en contraste, la unión de IGF a IGFBP-5 protege a ésta última de la proteólisis. Esta protección no es exclusiva del factor de crecimiento, también puede ser brindada por glicosaminoglicanos [30] y otros componentes de MEC, incluyendo la heparina y el heparán sulfato [23, 26].

Hay varias proteasas que escinden específicamente a IGFBP-5, tales como las proteasas plasmáticas asociadas al embarazo (PAPPs) A y A2 [26, 29], los miembros 9 y 12 de la familia de desintegrinas y metaloproteasas (ADAM) y un miembro de la cascada proteolítica del complemento, Cs1 [24, 26]. Además de estas proteasas específicas, existen otras proteasas que pueden degradar IGFBPs y otras proteínas.

#### **d. IGFBP-5 y su implicación en la fibrosis**

IGFBP-5 se expresa en varios tejidos y tipos celulares, mostrando mayor abundancia en el riñón, pero niveles bajos en el hígado [23] y en éste, se expresa en HSCs tanto quiescentes como transdiferenciadas [38] .

Las características estructurales que posee IGFBP-5 le confieren diversas funciones; su función clásica es regular la biodisponibilidad de IGFs, se conoce que IGFBP-5 tiene la capacidad tanto de estimular [39, 40] como de inhibir [41, 42] las acciones de IGF [22, 29, 43]. Además presenta acciones independientes a estos factores de crecimiento [24, 26, 30, 44].

El primer hallazgo sobre las acciones independientes de IGFBP-5 fue reportado por Andress y colaboradores en 1992 , en el cual se muestra que bajo condiciones no patológicas, un fragmento de IGFBP-5 de 23 kDa, derivado de osteoblastos, tiene la capacidad de estimular la mitogénesis de estas células en ausencia de

IGF-I [45]. En contraste, se ha investigado el papel de IGFBP-5 en estas mismas células pero bajo condiciones patológicas, como el osteosarcoma, y se ha evidenciado que IGFBP-5 inhibe el crecimiento de los osteoblastos en este tipo de cáncer [46-48].

IGFBP-5 se ha vinculado con varios tipos de cánceres, no sólo con osteosarcoma, tales como cáncer de mama [49-51], de próstata [52], de ovario [53] y cáncer pancreático [54].

Esta proteína no sólo se relaciona en estas patologías, también se ha observado que puede contribuir a la fibrogénesis [55, 56]. IGFBP-5 ha sido relacionada con fibrosis en pulmón [57], piel [58] e intestino [40]. Por ejemplo, se ha demostrado la sobreexpresión de esta proteína en tejido pulmonar de pacientes que presentan fibrosis pulmonar idiopática (IPF, por sus siglas en inglés) [57] y en tejido epitelial de pacientes con esclerosis sistémica, condición patológica que se caracteriza por fibrosis en la piel y órganos internos debido a la proliferación de fibroblastos y a la excesiva producción de MEC [58].

Asimismo, se ha observado que IGFBP-5 incrementa la producción de colágena y fibronectina y es capaz de inducir la transdiferenciación fibroblasto/miofibroblasto [57-59] en estas enfermedades fibrosantes; esta proteína también puede incrementar la proliferación de fibroblastos en el corazón [60].

Por otra parte, existe un estudio que demuestra que IGFBP-5 puede inducir la expresión de Egr-1, el cual es un factor de transcripción que regula la síntesis de MEC, y es mediante este factor de transcripción, por el cual IGFBP-5 podría promover la producción de fibronectina [61]. Algunos estudios han reconocido que toda la evidencia acumulada sobre IGFBP-5 en la fibrosis, le atribuye un papel profibrótico [55, 56] y señalado que este fenotipo profibrótico es independiente de IGF-I y dependiente de la vía de señalización de MAPK [61], aunque no se descarta la posibilidad de implicación de otras vías de señalización.

Cabe mencionar que existen pocos indicios que muestren la participación de IGFBP-5 en la fibrosis hepática y los mecanismos por los cuales puede actuar esta proteína de unión son aún desconocidos. Por ejemplo, uno de estos indicios es el incremento de los niveles séricos de IGFBP-5 en pacientes con hígado graso que presentan fibrosis severa [62].

Otro ejemplo es un estudio en el que se demuestra que IGFBP-5 aumenta la supervivencia de las células estelares activadas mediante la inhibición de su apoptosis [63], lo que podría ocasionar una perpetuación del daño hepático; además, la activación de HSCs es uno de los eventos importantes en la fibrogénesis, ya que este suceso desencadena la diferenciación de estas células en un fenotipo de miofibroblastos [5], las cuales son esencialmente, células contráctiles, proliferativas y responsables del exceso de deposición de MEC, como respuesta principalmente a TGF- $\beta$ 1 (principal citocina pro-fibrótica) [64].

Algunas investigaciones han planteado que todas estas acciones independientes de IGF podrían estar mediadas por la translocación nuclear de IGFBP-5 y/o unión a un receptor [30, 60, 65]. Se conoce que IGFBP-5 tiene un receptor putativo de ~420 kDa en la membrana de células osteoblásticas, éste se fosforila en respuesta a IGFBP-5 y posee actividad cinasa serina/treonina [66]; además, se ha propuesto que este receptor podría ser el receptor tipo V de TGF- $\beta$ 1 [29, 30, 67, 68], ya que este receptor tiene un peso de ~400 kDa, también posee actividad cinasa serina/treonina, e igualmente, IGFBP-5 interacciona con él [68], pero se necesitan más estudios para confirmar esta presunción. La expresión del receptor tipo V de TGF- $\beta$ 1 se ha demostrado en diferentes células, tales como células epiteliales de pulmón y riñón, fibroblastos de riñón, células endoteliales de cordón umbilical, condrocitos y osteoblastos, entre otros [69]; sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado la expresión de este receptor en tejido hepático a pesar de que fue aislado a partir de éste [70] y sería interesante observar en qué estirpe celular se expresa en este órgano.

A pesar de las diversas funciones que tiene IGFBP-5, su papel en la fibrosis hepática es aún desconocida.

### **III. Planteamiento del problema**

La cirrosis hepática, consecuencia final en la progresión de la fibrosis en el hígado, tiene un mal pronóstico, alta morbi-mortalidad y ocupa una de las 10 principales causas de mortalidad en México. Por lo que, conocer los diversos mecanismos por los cuales se desarrolla la fibrosis hepática, así como las moléculas que participan en el progreso de la enfermedad, es relevante.

Una molécula que podría estar involucrada en la fibrogénesis, es IGFBP-5, ya que existen estudios en los cuales se relaciona a esta proteína con enfermedades que cursan con fibrosis, como la fibrosis pulmonar idiopática y la esclerosis sistémica, así como evidencia que sugiere una posible relación de esta proteína con NAFLD, patología hepática que puede llegar a desarrollar fibrosis; por consiguiente, es posible que la IGFBP-5 esté implicada en la fibrosis hepática.

### **IV. Hipótesis**

IGFBP-5 regula la síntesis y acumulación de MEC en enfermedades fibróticas de pulmón, piel e intestino, por lo que estará involucrado en el proceso fibrogénico hepático mostrando una relación directa entre su expresión y el grado de fibrosis, mientras que su expresión disminuirá durante la reversión.

## **V. Objetivos**

### **a. Objetivo general**

Determinar si hay una relación entre la expresión de IGFBP-5 y los diferentes grados de fibrosis en un modelo murino.

### **b. Objetivos particulares**

- ✓ Inducir diferentes grados de fibrosis en un modelo murino.
- ✓ Obtener muestras de tejido hepático de diferentes grados de fibrosis.
- ✓ Extraer RNA del tejido hepático.
- ✓ Obtener cDNA mediante el RNA extraído.
- ✓ Amplificar el gen de IGFBP-5,  $\alpha$ -SMA y desmina a través del método de PCR punto final.
- ✓ Cuantificar a IGFBP-5 en el tejido hepático



## VI. Material y métodos

### 1. Animales y alojamiento

Los animales fueron mantenidos en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM en el Hospital General de México, bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12:12 hrs), así como de temperatura y humedad relativa (23°C; 75% humedad). Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Hospital General de México y están acordes a la NOM-062-ZOO-1999.

Se tuvieron 6 grupos de ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar con un peso inicial de 225±25 g y 3 meses de edad. Cada grupo contó con una n=10.

### 2. Inducción de fibrosis hepática y grupos experimentales

Se indujeron diferentes grados de fibrosis hepática mediante la administración de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) de acuerdo a lo que se describe a continuación. Se administraron 250 µL de una solución de CCl<sub>4</sub> 33% v/v con aceite de oliva, usando este último como vehículo por vía intraperitoneal en un esquema bisemanal (2 veces a la semana) durante 4, 6, 10 y 20 semanas. Los grupos obtenidos fueron nombrados de acuerdo al grado de fibrosis que presentaban (Tabla 2), además se incluyó un grupo control sin fibrosis hepática (F0) al cual no se le administró CCl<sub>4</sub> y un grupo de recuperación; al que se le administró el CCl<sub>4</sub> por 10 semanas, se retiró el agente agresor al cabo de ese tiempo y se dejó un periodo de recuperación de 4 semanas adicionales.

El sacrificio de los animales fue realizado 3 días después de la última administración, se retiró el alimento por un periodo de 4 hrs para garantizar un ayuno en todos los sujetos. Se procedió a la eutanasia con una guillotina y se colectaron muestras de sangre y tejido hepático, de este último una parte se

colocó en una solución de formaldehído al 3.7% v/v con agua destilada para su posterior inclusión en parafina y una más se congeló a -70°C para el análisis molecular.

Grupo	No. de dosis	No. de semanas con administración de CCl <sub>4</sub>	No. de semanas sin administración de CCl <sub>4</sub>
F0	-	-	4
F1	8	4	-
F2	12	6	-
F3	20	10	-
F4	40	20	-
R	20	10	4

**Tabla 2. Esquema de administración del modelo murino para la inducción de fibrosis por medio de CCl<sub>4</sub>.** En esta tabla se muestra el número de dosis administradas de CCl<sub>4</sub> en los diferentes grupos, así como la duración del tratamiento con el agente agresor.

### 3. Extracción de ácido ribonucleico (RNA) total

La extracción de RNA total se hizo mediante el reactivo TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Las muestras de tejido obtenidas se homogeneizaron con 1 mL de dicho reactivo, utilizando un homogeneizador de alta potencia (Polytron<sup>®</sup> PT 1300D). A esta mezcla se añadieron 0.2 mL de cloroformo (J.T.Baker; Center Valley, EUA), se mezcló con un agitador tipo vórtex, y se centrifugó a 13,000 rpm (Eppendorf<sup>®</sup> modelo 5417R) durante 30 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se precipitó el RNA con la adición de 0.5 mL de alcohol isopropílico (J.T.Baker; Center Valley, EUA) durante toda la noche a 4°C, esto último se realizó para maximizar la cantidad de RNA precipitado.

Transcurrido el periodo de precipitación, se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol (J.T.Baker; Center Valley, EUA) libre de ribonucleasas (RNasas) al 75% (v/v), se

homogeneizó y se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Por último, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet ubicado en el fondo del tubo en 0.1 mL de agua libre de RNAsas.

#### 4. *Obtención de la concentración del RNA total extraído*

Para obtener la concentración del RNA total extraído se realizó una dilución 1:200 de RNA con agua desionizada y se leyó a longitudes de onda de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter®, modelo DU-800); si la absorbancia obtenida, de la longitud de onda de 260 nm, era mayor que 1, se realizaba otra dilución (1:1000) y se volvía a leer en el espectrofotómetro. La absorbancia a 280 nm nos indicó la pureza del RNA total extraído, mientras que la de 260 nm se utilizó para obtener la concentración del RNA total extraído.

La concentración se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$(A_{260nm})(40)(Factor\ de\ dilución) = [concentración\ de\ RNA\ total] \mu g/mL$$

#### 5. *Integridad del RNA*

La integridad del RNA fue verificada mediante un gel de electroforesis, el cual se preparó al 1.2% de agarosa, 1.5  $\mu$ L de bromuro de etidio (1mg/mL) y 25 mL de buffer TBE 1x (Tris 89.15mM, Ácido bórico 88.95mM y EDTA 2.02mM). La imagen del gel fue capturada mediante un transiluminador con una lámpara de luz ultravioleta (UV). Las muestras en las que se encontró íntegro el RNA total (presencia de los fragmentos 28S y 18S) se utilizaron para la retrotranscripción.

#### 6. *Síntesis de DNA complementario (cDNA)*

La retrotranscripción se realizó mediante la enzima transcriptasa reversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney (M-MLV) (Promega; Madison WI, EUA).

Inicialmente se preparó un mix de reacción (número de reacciones a realizar + 1) de acuerdo al protocolo incluido en el inserto de la M-MLV con el buffer 5x, los 4 desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTPs, marca Invitrogen; Carlsbad, California) y el oligo dT (Promega; Madison WI, EUA). Este último reactivo se utilizó como cebador para la cola poli-A. Posteriormente se colocó en cada tubo de reacción (debidamente rotulado) el volumen correspondiente a 10 µg de RNA, a partir de la concentración obtenida de la fórmula anteriormente citada, se distribuyó el volumen de 7.25 µL del mix de reacción y se añadió agua libre de RNasas para alcanzar un volumen final de 25 µL. Después de depositar los reactivos en cada tubo, se colocaron en el termociclador (Applied Biosystems® 2720) y se inició la primera etapa de la reacción, la cual consistía en incubar los tubos a 65°C durante 5 minutos; al transcurrir dicho tiempo, se pausó la reacción y se sacaron los tubos del termociclador para ponerlos inmediatamente en hielo y a continuación adicionarle la enzima. Enseguida se agitaron los tubos con un agitador tipo vórtex y se regresaron al equipo para continuar con la reacción.

La segunda y tercera etapa de la reacción consistió en mantener los tubos durante 1 hora a 37°C y después a 70°C por 15 minutos. Al finalizar la reacción, los tubos se almacenaban a -20°C.

### *7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa para amplificar la expresión génica de las moléculas de interés: IGFBP-5,  $\alpha$ -SMA y desmina, y se utilizó el fragmento del gen 18S como control de carga. Para hacer la PCR se usó la enzima Taq DNA polimerasa (Amplificasa®, BioTecMol; Ciudad de México, México) y se siguió el protocolo básico de la técnica, preparando un mix de reacción (número de reacciones a realizar + 1) con agua libre de RNasas, buffer 10x, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, oligonucleótido sentido y antisentido con una concentración de 20 µM, Taq polimerasa y DMSO. Enseguida se colocó un volumen de 23 µL del mix de reacción en cada tubo de reacción para IGFBP-5, y 24 µL para las otras

moléculas ( $\alpha$ -SMA, desmina y 18S); se agregó 2  $\mu$ L del cDNA obtenido de la retrotranscripción para la amplificación de IGFBP-5 y 1  $\mu$ L para la amplificación de los otros genes.

Por otro lado, para la estandarización de cada par de oligonucleótidos (IGFBP-5,  $\alpha$ -SMA y desmina) se probaron diferentes temperaturas y número de ciclos. A partir de estos experimentos se determinaron los ciclos adecuados para llevar a cabo la amplificación de los genes.

Las condiciones a las cuales se efectuó la PCR se muestran en la Tabla 3 y los oligonucleótidos utilizados en las reacciones en la Tabla 4.

Nombre del gen a amplificar	Temperatura de alineamiento	Número de ciclos
<b>IGFBP-5</b>	60°C	45
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	61°C	35
<b>Desmina</b>	62°C	35
<b>18S</b>	60°C	30

**Tabla 3. Condiciones de las PCRs realizadas.** En esta tabla se presentan las condiciones a las que fueron realizadas las amplificaciones de las moléculas de interés. El tiempo al que se mantuvieron las etapas de la PCR fue de 30 segundos, esto se efectuó de igual forma en todas las moléculas.

Nombre de la secuencia	Tamaño del producto (pb)	Oligonucleótido	Secuencia
IGFBP-5	457	Sentido	CACACACTCTCGCTCTCCTG
		Anti-sentido	ACCTTCGGGGAGTAGGTCTC
$\alpha$ -SMA	249	Sentido	GAGATGGCCACTGCTGCT
		Anti-sentido	GCCTGGGTACATGGTAGTGC
Desmina	362	Sentido	GGAACAGCAGGTCCAGGTAG
		Anti-sentido	GTCGGATCTCCTCCTCCAG
18S	219	Sentido	CGCGGTTCTATTTTGTTGGT
		Anti-sentido	AGTCGGCATCGTTTATGGTC

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la expresión génica.** En esta tabla se observan los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación de cada uno de los genes estudiados.

### 8. Gel de agarosa para electroforesis

Para evidenciar la expresión de los genes de interés, se utilizó un gel de agarosa al 1.2%, se elaboró a un volumen final de 120 mL con TBE 1x (Tris 89mM, Ácido bórico 89mM y EDTA 2mM) y 10  $\mu$ L de bromuro de etidio (1mg/mL). Se adicionaron 5  $\mu$ L de buffer de carga (Glicerol 20% v/v, Azul de bromofenol 1mg/mL, Xilencianol 1mg/mL) al volumen final de la PCR y se cargó un volumen de 15  $\mu$ L de esta mezcla en cada pozo del gel de agarosa. Enseguida se encendió la fuente de poder y se corrió el gel a 90 V. La imagen del gel fue capturada mediante un transiluminador con lámpara de luz UV.

### 9. Extracción de proteínas

Se pesaron 100 mg de tejido hepático de cada muestra a analizar y se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL, previamente rotulados. Después se efectuó la ruptura de la membrana mediante un método físico no mecánico, al someter las muestras tisulares a ciclos de congelación y descongelación, congelándolas a

-70°C en nitrógeno líquido y descongelándolas en hielo; se repitió un total de 5 veces cada ciclo de congelación-descongelación. Posteriormente, se agregaron 200 µL de PBS estéril a cada tubo y se maceraron las muestras con ayuda de una jeringa de insulina estéril, a continuación, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, previamente etiquetado. Las muestras proteicas fueron almacenadas a -70°C.

#### *10. Integridad de las proteínas extraídas*

Para conocer si el proceso de extracción de proteínas no afectó a éstas, se elaboró un gel de SDS-PAGE, con un gel concentrador al 4% [Tris 1.5M pH=6.8, Acrilamida 4.1M/Bis-acrilamida 0.05M, Dodecilsulfato de sodio (SDS) 10%, Tetrametiletilendiamina (TEMED), Persulfato de amonio (PSA) 10%] y un gel separador al 10% (Tris 1.5M pH=8.8, Acrilamida 4.1M/Bis-acrilamida 0.05M, SDS 10%, TEMED, PSA 10%). Las muestras fueron preparadas, antes de ser cargadas en el gel, con buffer de carga de Laemmli 2x (Bio-Rad; CA, EUA) mezclado previamente con 50 µL de β-mercaptoetanol, en una proporción 1:9 muestra-buffer; seguida de una incubación a 95°C por 1 minuto. El gel fue teñido con una solución de azul de Coomassie (Azul de Coomassie G250 0.05%, Isopropanol 25%, Ácido acético 7%) y observado con luz visible.

#### *11. Cuantificación de IGFBP-5 en el tejido hepático*

Se cuantificó la proteína presente en el tejido hepático mediante el kit de arreglo en suspensión (Milliplex®, MIGFBPMAG-43K), el cual es un multianálisis cuantitativo de perfiles proteicos. Este método se efectuó para cuantificar IGFBP-5 en las muestras proteicas obtenidas de los diferentes grupos del modelo murino a partir del tejido hepático.

El ensayo se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con previa preparación del protocolo (mapa de la placa) y de la curva estándar, como se

detalla a continuación: primero se preparó la placa agregando 200  $\mu\text{L}$  de Assay Buffer en cada pozo, agitándola por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente decantándola, después se añadió 25  $\mu\text{L}$  de Assay Buffer a los pozos de los estándares, controles y muestras, 50  $\mu\text{L}$  de Assay Buffer a los pozos del blanco, 25  $\mu\text{L}$  de los estándares o controles a los pozos establecidos, 25  $\mu\text{L}$  de las muestras a los pozos de las muestras y 25  $\mu\text{L}$  de las esferas a cada pozo, a continuación se incubó en agitación toda la noche a 4°C.

Al término de la incubación, se realizaron lavados de la siguiente forma, primero se puso la placa en el bloque de separación magnética de placas y se dejó 1 minuto, después se aspiró el contenido de cada pozo, sin quitar la placa del bloque de separación magnética, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de Wash Buffer, se agitó la placa (quitándola previamente del bloque), se volvió a poner la placa en el bloque durante 1 minuto y por último se aspiró el contenido de cada pozo; este proceso se repitió 4 veces más. Después de los lavados, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  del anticuerpo de detección en cada pozo y se incubó la placa por 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de estreptavidina-ficoeritrina en cada pozo y se volvió a incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, a continuación se realizaron 5 lavados, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de Sheath Fluid en cada pozo y se realizó la lectura de la placa en el equipo Luminex 200®.

Las concentraciones de la curva estándar realizada para este ensayo, así como la gráfica de ésta, se presentan en la Tabla 5 y Figura 7, respectivamente.

Para garantizar la fiabilidad del ensayo se utilizaron controles de calidad (Tabla 6) y los valores obtenidos para IGFPB-5 estuvieron dentro del rango esperado; además, la sensibilidad del experimento fue de 0.32 ng/mL



Tubo	IGFBP-5 (ng/mL)	Intensidad de fluorescencia (FI)
Estándar 1	0.41	13.3
Estándar 2	1.23	19.5
Estándar 3	3.70	40
Estándar 4	11.11	102.5
Estándar 5	33.33	391.3
Estándar 6	100.00	1689.8
Estándar 7	300.00	4133.3

Tabla 5. Concentraciones de IGFBP-5 en la curva estándar.

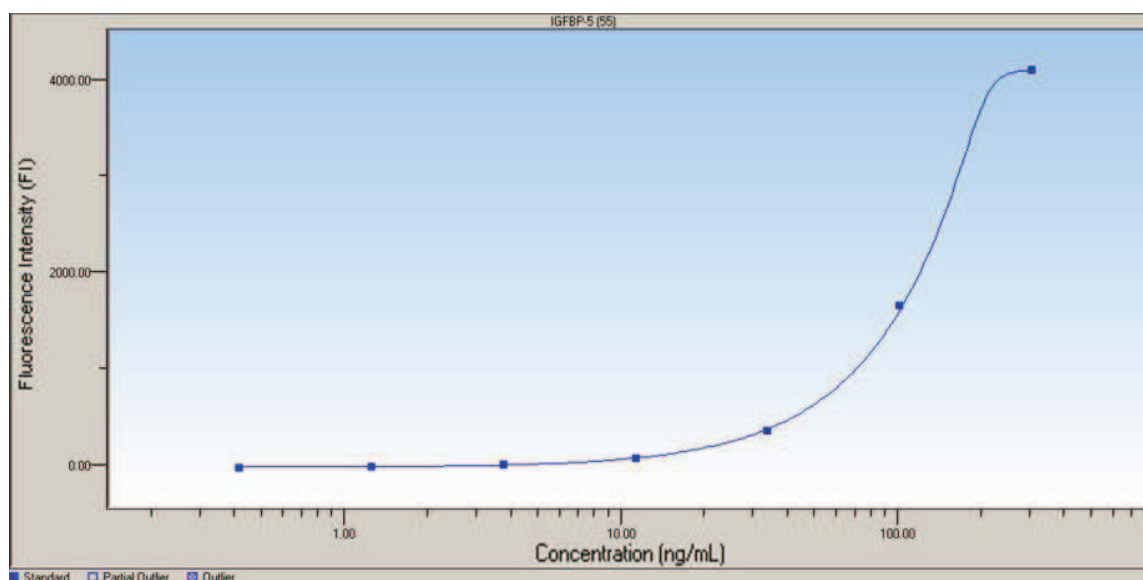


Figura 7. Curva estándar de IGFBP-5. Las concentraciones de IGFBP-5 de las muestras, se obtuvieron a partir de ésta curva.

	Límite inferior (ng/mL)	Límite superior (ng/mL)	Valor obtenido
Control I	3.3	6.8	5.4
Control II	23	47	41

Tabla 6. Rango de los valores esperados de los controles de calidad y valor obtenido.

## *12. Tinciones de Hematoxilina-Eosina, Tricrómica de Masson y Rojo Sirio*

Para demostrar el grado de fibrosis que poseía cada muestra se realizaron tinciones histológicas.

A partir del tejido hepático en formaldehído, obtenido del sacrificio de los roedores, se deshidrató la muestra en una serie gradual de alcohol de concentración creciente; después las muestras fueron incluidas en parafina y con ayuda de un micrótopo se obtuvieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor de cada muestra del bloque de parafina y se depositaron en portaobjetos (previo etiquetado). Después, se eliminó la parafina con xilol y se rehidrató el tejido en una serie alcohólica de concentración decreciente.

Posteriormente se realizaron las diferentes tinciones conforme a los protocolos establecidos en la literatura (ver Anexo I) [71].

## *13. Observación de los cortes histológicos con diferentes tinciones.*

Los tres tipos de tinciones se observaron en campo claro en un microscopio Nikon Microphot-Fxa, que tiene acoplado un sistema digital, y se obtuvieron imágenes representativas con dicho sistema de microscopía y el software Nikon ACT. Para la tinción de Rojo de Sirio, además se empleó luz polarizada para evidenciar la presencia de colágenas.

## *14. Análisis densitométrico*

A las imágenes de los geles de electroforesis se les efectuó un análisis de densitometría óptica, utilizando el software ImageJ, y así poder determinar la expresión relativa de los genes de interés.

## 15. Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo mediante una prueba de ANOVA de una vía con una prueba Tukey (post-hoc), además de una t-student para comparar a los grupos de la reversión de la fibrosis (F3 y R); empleando el software GraphPad Prism versión 6. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un intervalo de confianza del 95%, por lo tanto, se consideraron como estadísticamente significativos los datos que tuvieran una  $p < 0.05$ .

## VII. Resultados

### a) *Fibrosis*

Para evidenciar el desarrollo de fibrosis en el modelo experimental, se obtuvieron imágenes representativas del hígado, así como de cortes histológicos con diferentes tinciones.

En la Figura 8 se observan los cambios macroscópicos que presenta el hígado de los grupos conforme avanza la fibrosis. La Figura 8A muestra un hígado sin fibrosis, de textura lisa y brillante, en contraste, la Figura 8B expone un hígado fibrótico, con textura rugosa y de coloración pálida-opaca. Por su parte, la Figura 8C exhibe un hígado cirrótico con una diferencia más marcada, en cuanto a textura y color, comparada con las dos figuras anteriores (A, B), además de que se distinguen adherencias (flecha amarilla) a la pared abdominal.

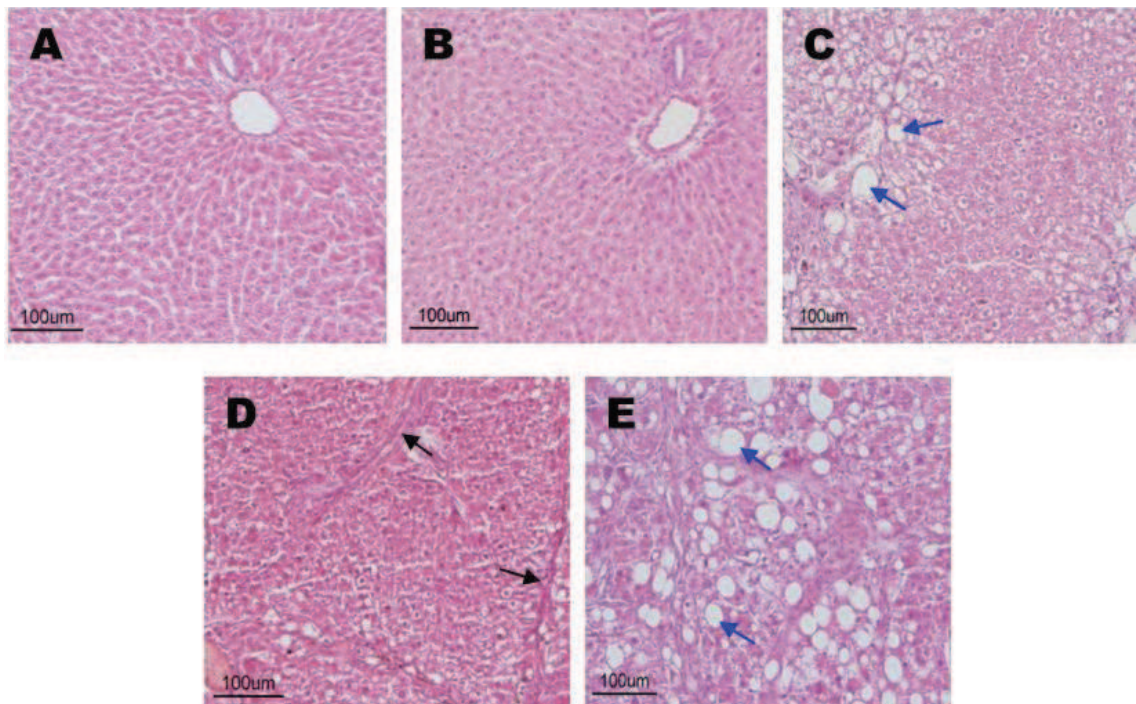


**Figura 8. Progresión macroscópica del daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub>.** Se presentan imágenes representativas del tejido hepático que evidencian los cambios macroscópicos provocados por la fibrogénesis inducida por los diferentes esquemas de administración con CCl<sub>4</sub>, en los grupos F0 (**A**), F3 (**B**) y F4 (**C**). *La flecha amarilla señala la adherencia.*

### – Histología –

- Tinción Hematoxilina-Eosina

Se analizó la microarquitectura hepática mediante la tinción de hematoxilina-eosina (H-E). En la Figura 9, se presentan las tinciones H-E de los grupos F0 (**A**), F1 (**B**), F2 (**C**), F3 (**D**) y F4 (**E**); en el grupo F0 (Figura 9A) se observa una arquitectura organizada de los lobulillos hepáticos, en el grupo F1 (Figura 9B) se comienza a percibir un ligero daño en la estructura hepática, para el grupo F2 (Figura 9C) se distingue un daño más evidente, así como la aparición de esteatosis (flechas azules). En el grupo F3 (Figura 9D), se observa no sólo una arquitectura desorganizada sino también la presencia fibras de colágena (flechas negras), así como esteatosis. El grupo F4 (Figura 9E) exhibe una completa pérdida de la arquitectura hepática acompañada de una extensa esteatosis.



**Figura 9. Imágenes representativas de las tinciones H-E del proceso fibrogénico en el hígado de rata.** Se observan imágenes de las tinciones de hematoxilina-eosina del tejido hepático de los grupos F0 (A), F1 (B), F2 (C), F3 (D) y F4 (E), que evidencian los cambios microscópicos provocados en el hígado durante la administración de las diferentes dosis de  $\text{CCl}_4$ , principalmente, desorganización de la arquitectura hepática, esteatosis y formación de septos. *Las flechas negras denotan fibras de colágena. Las flechas azules señalan la presencia de esteatosis.* Aumento: 80x

- Tinción Rojo de Sirio

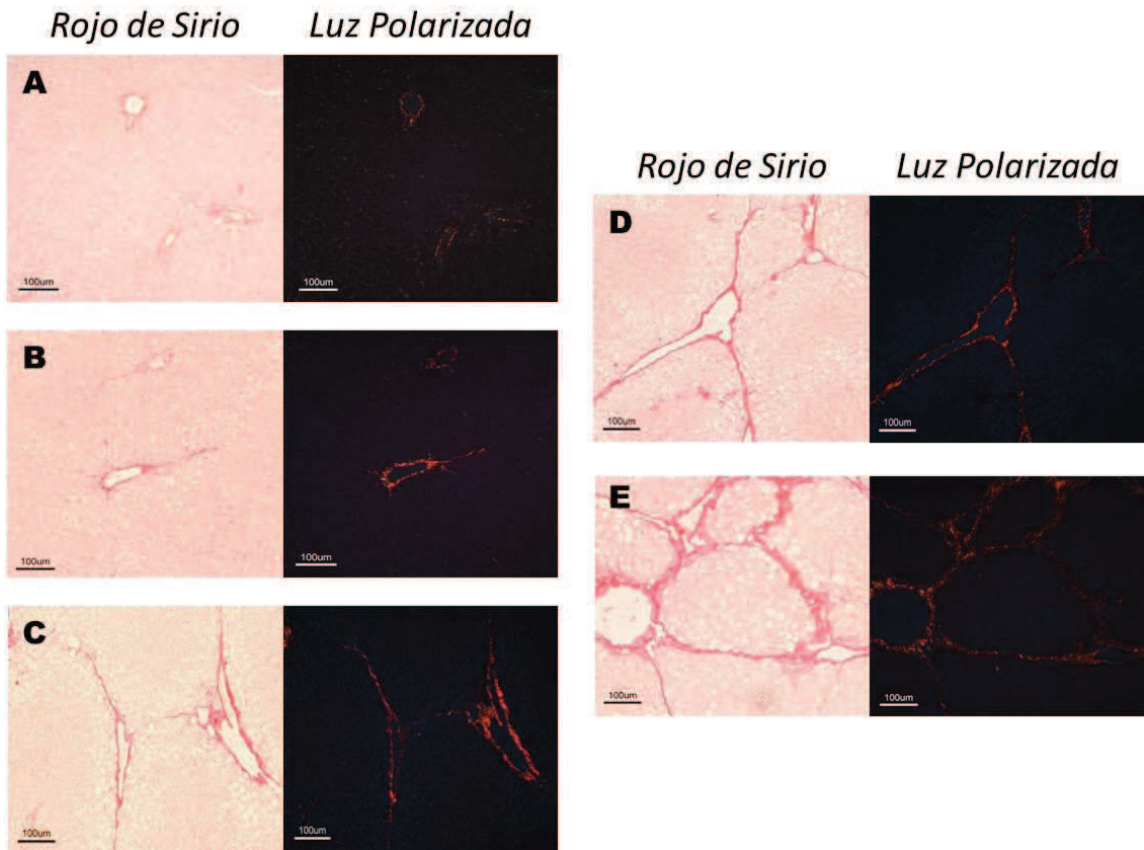
Para hacer más evidente la presencia del incremento y acumulación de colágena en MEC en las etapas de la fibrogénesis, se empleó la tinción rojo de sirio en los cortes histológicos. Asimismo, se incidió luz polarizada sobre la laminilla teñida para manifestar la presencia de fibras de colágena (tipo I, II y III), las cuales se reconocieron dependiendo el color que presentaran, amarillo–naranja-rojo, azul y verde, respectivamente. En la Figura 10 se observan las tinciones de rojo de sirio

(lado izquierdo) y observadas con luz polarizada (lado derecho), de los grupos durante el desarrollo de la fibrosis: F0 (**A**), F1 (**B**), F2 (**C**), F3 (**D**) y F4 (**E**).

En la Figura 10A (grupo F0), se observa una arquitectura organizada de los lobulillos hepáticos (Rojo de Sirio) y una ligera presencia, principalmente, de colágena tipo I (Luz Polarizada) debida al recambio natural de MEC en el hígado; en la Figura 10B (grupo F1) se comienza a visualizar fibrosis portal en la imagen de Rojo de Sirio, así como algunas pequeñas fibras de colágena que se originan en el área portal, mientras que en la imagen con luz polarizada, se denota la presencia de colágena tipo I en la región portal y en las tenues fibras que derivan de esta región.

Por otra parte, en la Figura 10C (grupo F2) en el apartado Rojo de Sirio, se aprecia no sólo fibrosis portal sino también algunas fibras de colágena que sobresalen del área portal, y en el apartado de luz polarizada se muestra colágena tipo I tanto en la fibrosis portal como en las fibras de colágena originadas en esta región. La Figura 10D (grupo F3, Rojo de Sirio), expone un grado de fibrosis mayor, con aumento de acumulación de colágena, presencia de algunos septos, fibrosis portal y en puente (áreas portales unidas entre sí o con venas centrolobulillares por fibras de colágena), y en la imagen con luz polarizada se distingue que la colágena tipo I predomina en la abundante matriz extracelular.

Por último, la Figura 10E (grupo F4) exhibe las características del grupo F3, además de un incremento más notable en el grosor de las fibras de colágena (cirrosis), en la sección Rojo de Sirio, y en la sección de luz polarizada, se observa que el tipo de colágena que destaca en la excesiva acumulación de MEC es la colágena tipo I.



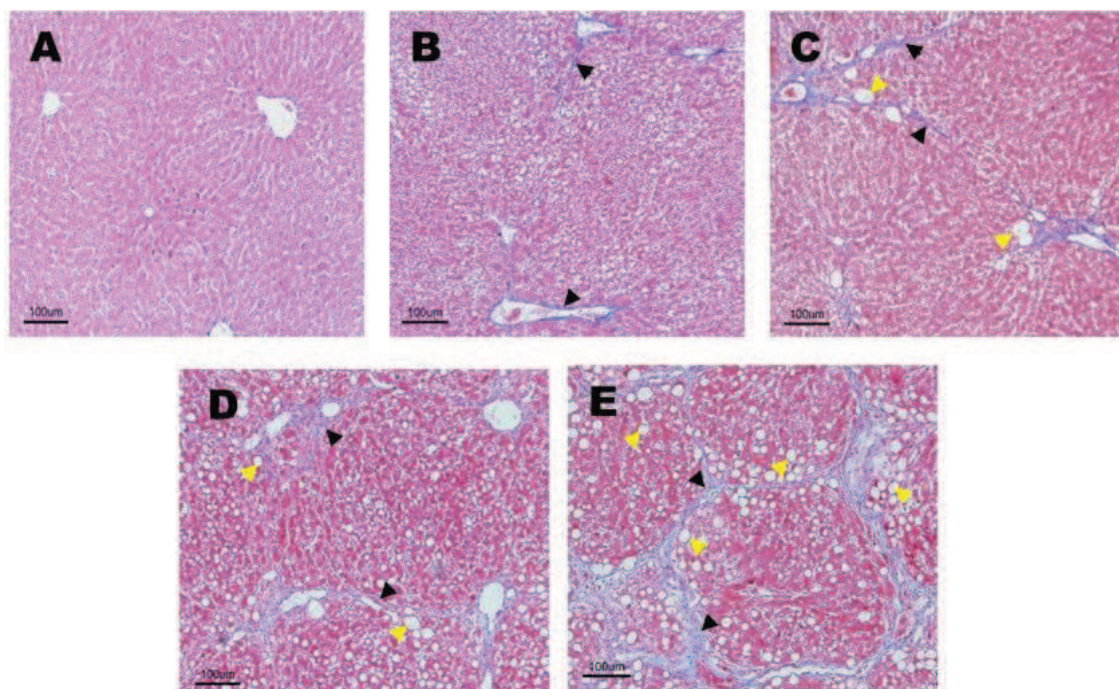
**Figura 10. Imágenes representativas de las tinciones con rojo de sirio, en campo claro y con inducción de luz polarizada, del proceso fibrogénico en el hígado de rata.** Se observan imágenes de las tinciones de rojo de sirio en campo claro (lado izquierdo) y con luz polarizada (lado derecho) del tejido hepático de los grupos F0 (**A**), F1 (**B**), F2 (**C**), F3 (**D**) y F4 (**E**), que evidencian el aumento de colágena inducida durante la administración de las diferentes dosis de  $\text{CCl}_4$ . La coloración rojiza en el apartado izquierdo, indica la presencia de colágena y al incidir luz polarizada se manifiesta la diferencia del tipo de colágena, tipo I (amarillo–naranja-rojo), tipo II (azul) y tipo III (verde). Aumento: 80x

- Tinción Tricrómica de Masson

Se examinó la acumulación de MEC durante la fibrogénesis, no sólo mediante la presencia de colágena sino también de los otros componentes de la matriz extracelular, a través de la tinción tricrómica de Masson. En la Figura 11 se muestra este tipo de tinción de los diferentes grupos obtenidos del modelo experimental: F0 (**A**), F1 (**B**), F2 (**C**), F3 (**D**) y F4 (**E**), en las que se hacen notorios los componentes de MEC en color azul-morado.

En el grupo F0 (Figura 11A) se observa una arquitectura hepática organizada con su matriz extracelular basal alrededor de los conductos; mientras que en el grupo F1 (Figura 11B) se distingue principalmente un incremento en la acumulación de MEC en las áreas portales y pequeñas prolongaciones originadas de estas regiones (puntas de flechas negras). Para el grupo F2 (Figura 11C) se denota la presencia de esteatosis (puntas de flechas amarillas), así como un alargamiento de las prolongaciones (puntas de flechas negras) de tal manera que casi se tocan entre ellas. El grupo F3 (Figura 11D) no sólo se destaca una acumulación abundante de MEC, también fibrosis en puente (puntas de flechas negras) y esteatosis (puntas de flechas amarillas), y en el grupo F4 (Figura 11E) se muestran las características del grupo F3, además de la existencia de nódulos de regeneración.

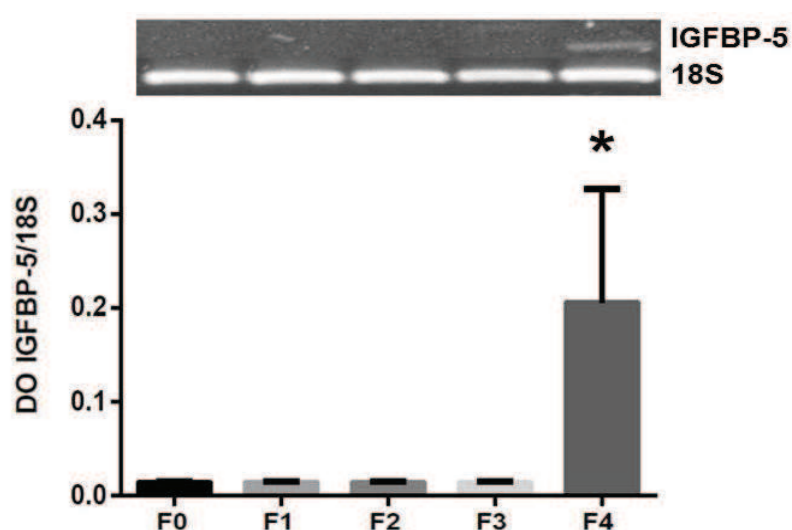




**Figura 11. Imágenes representativas de la tinción tricrómica de Masson del proceso fibrogénico en el tejido hepático de rata.** Se observan imágenes de la tinción tricrómica de Masson en los cortes histológicos hepáticos de los grupos F0 (A), F1 (B), F2 (C), F3 (D) y F4 (E), que evidencian los cambios microscópicos provocados en el hígado durante la administración de las diferentes dosis de  $\text{CCl}_4$ , principalmente, acumulación excesiva de MEC, esteatosis y desorganización de la arquitectura hepática. *Las puntas de flechas negras denotan acumulación de MEC. Las puntas de flechas amarillas señalan la presencia de esteatosis.* Aumento: 80x

– Expresión relativa de IGFBP-5 –

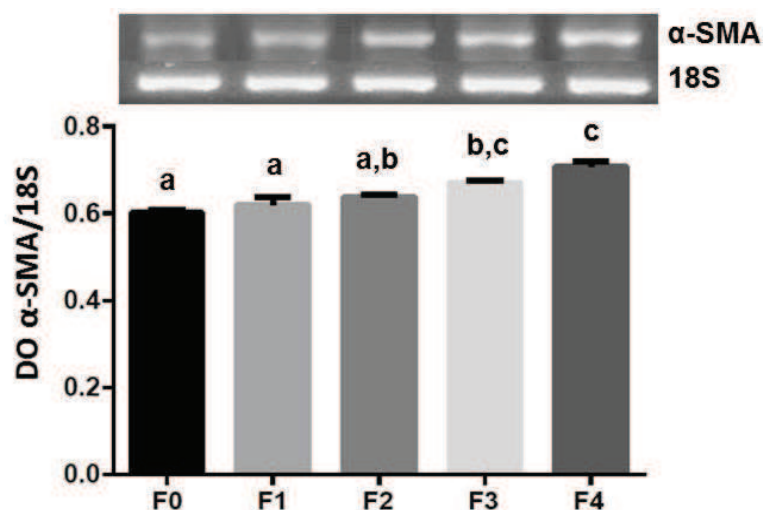
La expresión de IGFBP-5, en los diferentes grupos del modelo de inducción de fibrosis, se observa en la Figura 12; en la que se muestra la representación gráfica de la expresión relativa de este gen, así como una imagen representativa de la electroforesis. Se encontró una sobreexpresión de IGFBP-5 en el grupo F4, cuyos sujetos tienen cirrosis hepática, consecuencia final de la fibrosis hepática.



**Figura 12. Expresión relativa de IGFBP-5 durante el proceso fibrogénico en el hígado de rata.** Se presenta la expresión relativa de IGFBP-5 en tejido hepático, realizada mediante una retrotranscripción y posteriormente una PCR punto final. ANOVA de una vía con post-hoc Tukey. \* $p < 0.05$  es significativamente diferente.  $N = 6$ . 18S fue utilizado como control de carga. Los valores representan la media  $\pm$  E.E.M. Las unidades de densidad óptica (DO) son arbitrarias.

– Expresión relativa de  $\alpha$ -SMA –

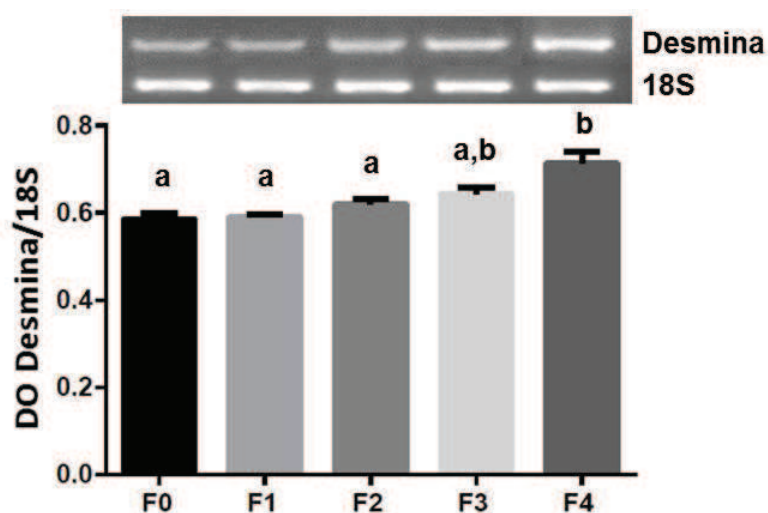
Del mismo modo, la expresión de  $\alpha$ -SMA fue evaluada, como se muestra en la Figura 13. En esta figura se representa gráficamente la expresión de este gen, ésta no fue estadísticamente diferente entre los grupos F0, F1 y F2; mientras que el grupo F3, el cual denota una fibrosis severa, y el grupo F4, que manifiesta la presencia de cirrosis, tuvieron diferencias estadísticamente significativas con los grupos F0 y F1, pero no entre ellos; solamente el grupo F4 fue significativamente diferente con respecto al grupo F2.



**Figura 13. Expresión relativa de  $\alpha$ -SMA durante el proceso fibrogénico en el hígado de rata.** Se muestra la expresión relativa de  $\alpha$ -SMA en tejido hepático, efectuada mediante una retrotranscripción y posteriormente una PCR punto final. ANOVA de una vía con post-hoc Tukey. Las barras que no comparten letras son estadísticamente diferentes con  $p < 0.05$ .  $N=6$ . *18S* fue utilizado como control de carga. Los valores representan la media  $\pm$  E.E.M. Las unidades de densidad óptica (DO) son arbitrarias.

– Expresión relativa de desmina –

La expresión de desmina está representada gráficamente en la Figura 14. En esta figura, la expresión del gen en los hígados de los roedores está aumentada en aquellos sujetos que presentaron cirrosis hepática (grupo F4), comparada sólo con los que tienen ausencia de fibrosis (grupo F0) o que presentan una fibrosis leve y/o moderada (grupos F1 y F2).

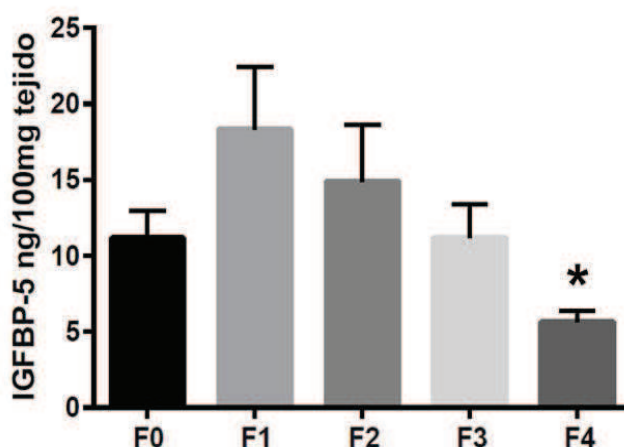


**Figura 14. Expresión relativa de desmina durante el proceso fibrogénico en el hígado de rata.** Se determinó la expresión relativa de desmina en tejido hepático, realizada a través de una retrotranscripción y posteriormente de una PCR punto final. ANOVA de una vía con post-hoc Tukey. Las barras que no comparten letras son estadísticamente diferentes con  $p < 0.05$ .  $N=6$ . 18S fue utilizado como control de carga. Los valores representan la media  $\pm$  E.E.M. Las unidades de densidad óptica (DO) son arbitrarias.

– Niveles de proteína de IGFBP-5 –

Se cuantificó la cantidad de proteína en nanogramos (IGFBP-5) presentes en 100 mg de tejido hepático, procedente de las muestras extraídas de los roedores, los resultados fueron representados en una gráfica (Figura 15).

En la Figura 15, las ratas que fueron administradas con 40 dosis de  $\text{CCl}_4$  (grupo F4) y que, en consecuencia presentaron cirrosis hepática, se observa claramente una disminución de la cantidad de proteína presente en el hígado de estos animales, comparada con los grupos F0, F1, F2 y F3.

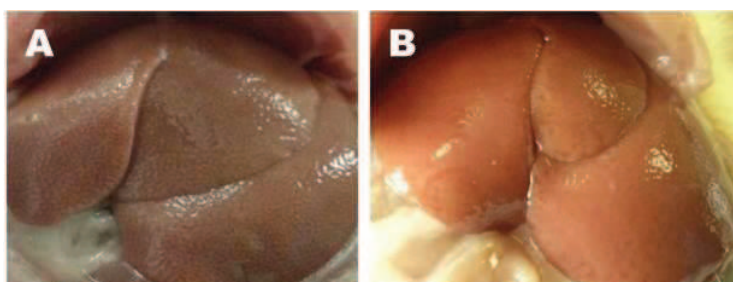


**Figura 15. Cantidad de IGFBP-5 en tejido hepático de rata durante el proceso fibrogénico.** Se muestra la cantidad de IGFBP-5 en 100 mg de tejido hepático. Se obtuvo esta cuantificación a través del método de arreglo en suspensión. ANOVA de una vía con post-hoc Tukey. \* $p < 0.05$  es significativamente diferente.  $N=6$ . Los valores representan la media  $\pm$  E.E.M.

### ***b) Reversión de la fibrosis***

Para demostrar la reversión de la fibrosis en el modelo murino, se obtuvieron imágenes representativas de las diferentes tinciones utilizadas, así como del hígado.

En la Figura 16, el grupo R (**B**), al cual se le retiró el agente agresor por 4 semanas, demuestra una posibilidad de reversión del proceso fibrogénico, principalmente porque la textura se aprecia un poco más lisa y brillante comparada con el grupo al que no se le dejó un tiempo de recuperación, grupo F3 (**A**).



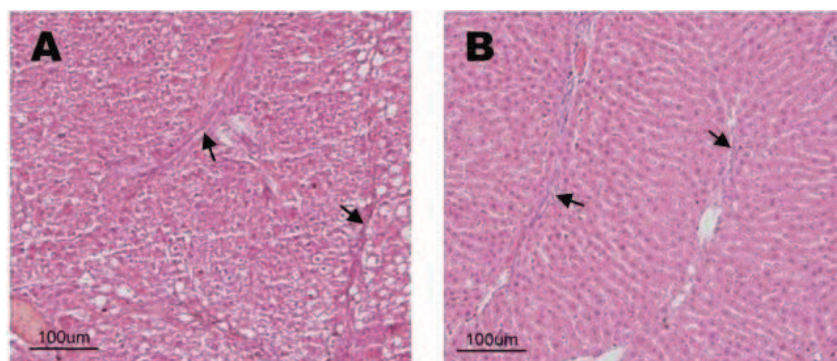
**Figura 16. Imágenes representativas del efecto obtenido al retirar el agente agresor en el hígado de rata.** Se observan imágenes de tejido hepático que evidencian los cambios macroscópicos provocados al retirar el  $\text{CCl}_4$  en el grupo R (**B**), principalmente, un cambio en la textura y el color, comparado con el grupo F3, que tenía el mismo número de dosis pero sin las 4 semanas de recuperación (**A**).

### – Histología –

- Tinción Hematoxilina-Eosina

En la Figura 17 se expone el efecto que tuvo el tiempo de recuperación del grupo R, comparado con el grupo que no lo tuvo (F3). En el grupo F3 (Figura 17A) se observa una arquitectura desorganizada y también la presencia de septos limitados por fibras de colágena (flechas negras), así como esteatosis. Mientras

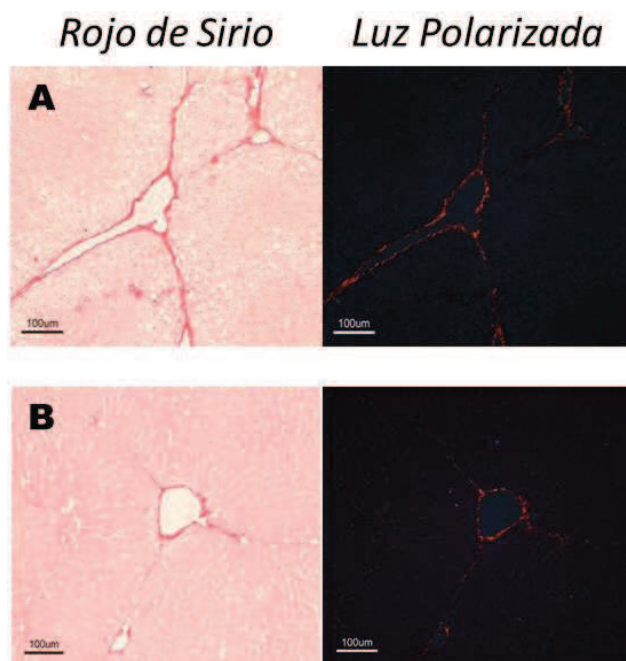
que en el grupo R (Figura 17B) se aprecia una arquitectura hepática ligeramente más organizada, al igual que la ausencia de esteatosis y la disminución del tejido cicatrizal (flechas negras).



**Figura 17. Imágenes representativas de las tinciones H-E del efecto obtenido al retirar el agente agresor en el tejido hepático.** En las tinciones H-E se aprecia un cambio a nivel microscópico de la posible reversión del daño hepático (generado por la administración de  $\text{CCl}_4$ ) en el grupo R (B), grupo al que se le dio un periodo de recuperación (4 semanas sin administración de  $\text{CCl}_4$  antes de la toma de muestra), comparado con el grupo F3 (A), al cual no se le dio ese periodo. *Las flechas negras indican las fibras de colágena.* Aumento: 80x

- Tinción Rojo de Sirio

En la Figura 18 se muestra el efecto de proporcionar un tiempo de recuperación al grupo R, comparado con el grupo que no lo tuvo (F3). El grupo F3 (Figura 18A) expone una abundante acumulación de colágena, presencia de varios septos, fibrosis portal y en puente (Rojo de Sirio), con una considerable presencia de colágena tipo I (Luz Polarizada). Mientras que el grupo R (Figura 18B) manifiesta una disminución del tejido cicatrizal (Rojo de Sirio), así como una arquitectura hepática ligeramente más organizada, y una reducción de colágena tipo I (Luz Polarizada).

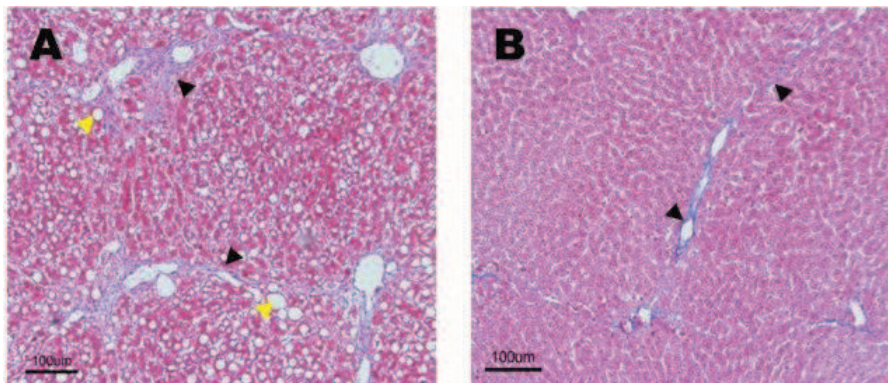


**Figura 18.** Imágenes representativas de las tinciones con rojo de sirio, en campo claro y al incidir luz polarizada, del efecto obtenido al proporcionar un periodo de recuperación. En las tinciones rojo de sirio, tanto en campo claro (lado izquierdo) como con la incidencia de luz polarizada (lado derecho), se aprecia una disminución de las fibras de colágena generadas por la administración de  $\text{CCl}_4$  en el grupo R (**B**), grupo al que se le dio un periodo de recuperación (4 semanas sin administración de  $\text{CCl}_4$  antes de la toma de muestra), comparado con el grupo F3 (**A**), al cual no se le dio ese periodo. La coloración rojiza en el apartado izquierdo indica la presencia de colágena y al incidir luz polarizada se manifiesta la diferencia del tipo de colágena, tipo I (amarillo–naranja-rojo), tipo II (azul) y tipo III (verde). Aumento: 80x



- Tinción Tricrómica de Masson

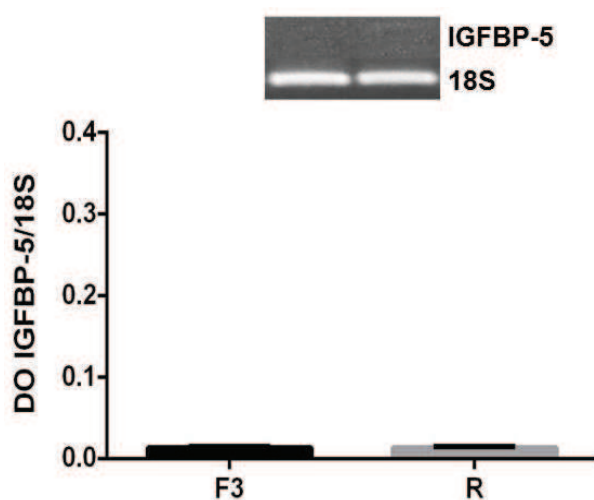
Con respecto a la tinción tricrómica de Masson realizada en los cortes histológicos hepáticos, en la Figura 19 se expone la disminución del tejido cicatrizal en el grupo R, el cual fue provisto de un periodo de recuperación, comparado con el grupo que no lo tuvo (grupo F3). En la Figura 19A (grupo F3) se observa una arquitectura desorganizada, la presencia de esteatosis (puntas de flechas amarillas), un exceso de MEC y fibrosis en puente (puntas de flechas negras). Mientras que en la Figura 19B (grupo R) se aprecia una disminución del daño hepático, mediante una arquitectura hepática más organizada, ausencia de esteatosis y reducción del tejido cicatrizal (flechas negras).



**Figura 19. Imágenes representativas de las tinciones tricrómicas de Masson del efecto obtenido al suprimir la administración de CCl<sub>4</sub> en ratas.** En las tinciones se aprecia un cambio a nivel microscópico de la reversión del daño hepático en el grupo R (B), grupo al que se le proporcionó un tiempo de recuperación (4 semanas sin administración de CCl<sub>4</sub> antes de la toma de muestra), comparado con el grupo F3 (A), al cual no se le concedió ese periodo. *Las puntas de flechas negras indican la acumulación de MEC. Las puntas de flechas amarillas denotan la presencia de esteatosis. Aumento: 80x*

– Expresión relativa de IGFBP-5 –

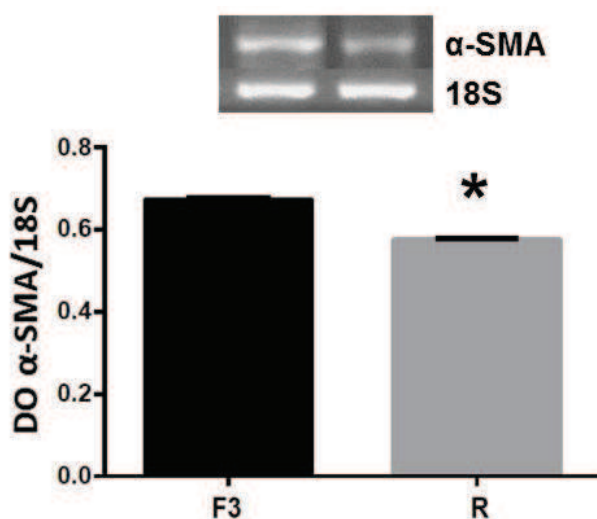
Con respecto a la expresión relativa de IGFBP-5, en la Figura 20 se hace una representación gráfica junto con el gel de electroforesis de ésta, del grupo F3 y R; dicha expresión no se vio afectada de alguna manera por la ausencia del agente agresor.



**Figura 20. Efecto obtenido en la expresión relativa de IGFBP-5 al proporcionar un periodo de recuperación.** Se presenta la expresión relativa de IGFBP-5 en tejido hepático de los grupos F3 y R, obtenida mediante una retrotranscripción y posteriormente una PCR punto final. Se realizó una t-student con  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa.  $N = 6$ . 18S fue utilizado como control de carga. Los valores representan la media  $\pm$  E.E.M. Las unidades de densidad óptica (DO) son arbitrarias.

– Expresión relativa de  $\alpha$ -SMA –

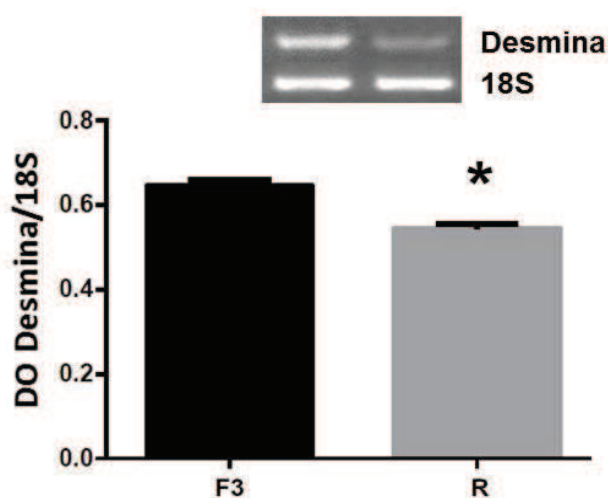
El tiempo de recuperación que se dio al grupo R resultó en una disminución de la expresión de  $\alpha$ -SMA, comparada con el grupo administrado con la misma dosificación de  $\text{CCl}_4$  pero sin el periodo de recuperación (grupo F3), como se puede apreciar en la Figura 21.



**Figura 21. Efecto obtenido en la expresión relativa de  $\alpha$ -SMA al retirar el  $\text{CCl}_4$ .** Se muestra la expresión relativa de  $\alpha$ -SMA en tejido hepático de los grupos F3 y R, obtenida a través de una retrotranscripción, seguida de una PCR punto final. Se realizó una t-student, \* $p < 0.05$  es significativamente diferente.  $N = 6$ . 18S fue utilizado como control de carga. Los valores representan la media  $\pm$  E.E.M. Las unidades de densidad óptica (DO) son arbitrarias.

– Expresión relativa de desmina –

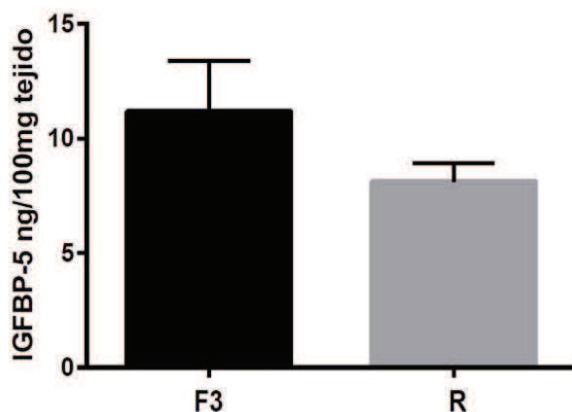
Por otro lado, al comparar al grupo F3 y R, fibrosis severa y fibrosis leve-moderada, respectivamente; el resultado fue una disminución en la expresión relativa de desmina en el tejido hepático de aquellos roedores que presentaban una fibrosis leve-moderada, como se observa en la Figura 22. Este resultado es similar al obtenido en la expresión relativa de  $\alpha$ -SMA.



**Figura 22. Efecto obtenido en la expresión de desmina después de un periodo de recuperación.** Se determinó la expresión relativa de desmina en tejido hepático de los grupos F3 y R, efectuada a través de una retrotranscripción, seguida de una PCR punto final. Se realizó una t-student, \* $p < 0.05$  es significativamente diferente.  $N = 6$  18S fue utilizado como control de carga. Los valores representan la media  $\pm$  E.E.M. Las unidades de densidad óptica (DO) son arbitrarias.

– Niveles de proteína de IGFBP-5 –

Con relación a la cantidad de IGFBP-5 presente en el tejido hepático después de proporcionar un periodo de recuperación (ausencia de  $\text{CCl}_4$ ) no se observó diferencia estadística como se muestra en la Figura 23.



**Figura 23. Efecto obtenido al proporcionar un tiempo de recuperación sobre los niveles de proteína en el hígado de rata.** Se muestra la cantidad de IGFBP-5 en 100 mg de tejido hepático. Esta cuantificación se obtuvo a través del método arreglo en suspensión. Se realizó una t-student con  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa.  $N = 6$ . Los valores representan la media  $\pm$  E.E.M.

## VIII. Discusión

En el presente trabajo se muestra que aunque el mRNA de IGFBP-5 se sobreexpresa en la etapa más avanzada de la fibrosis, la cirrosis, la cantidad de proteína en el tejido hepático está disminuida; y que conforme el daño aumenta, hay un incremento de la activación de las células estelares activadas, presumiblemente debido a un aumento de éstas células.

Los resultados obtenidos de la histología del tejido hepático de los roedores del modelo experimental comprueban que la administración de diferentes dosis de CCl<sub>4</sub> induce distintos grados de fibrosis en estos animales. Al retirar el insulto (CCl<sub>4</sub>) por un periodo de 4 semanas, se demuestra, macro y microscópicamente, la reversión de la fibrosis hepática.

IGFBP-5 se expresa en varios tejidos y tipos celulares, mostrando mayor abundancia en el riñón, pero niveles bajos en el hígado sano [23], en el cual es expresada por las HSCs [38]. Varios grupos de investigación han sugerido que IGFBP-5 puede estar relacionada con la fibrogénesis [55, 56]. Se ha demostrado que tanto la expresión como los niveles de proteína de IGFBP-5 están incrementados en sujetos que presentan patologías como la fibrosis pulmonar idiopática [57] y la esclerosis sistémica [58] en comparación con aquellos que no presentan fibrosis.

A nivel hepático, uno de los hallazgos más importantes que apoyan la hipótesis de que IGFBP-5 podría estar involucrada en el desarrollo de la fibrosis es el hecho de que esta proteína favorece la supervivencia de las células estelares activadas así como de los miofibroblastos humanos *in vitro*, mediante la inhibición de su apoptosis [63]. Otras evidencias han sugerido que IGFBP-5 podría ser un ligando del receptor V de TGF- $\beta$ 1 [68], que es la principal citocina pro-fibrogénica. Más aún, en pulmón y piel se ha documentado que la sobreexpresión de IGFBP-5,

tanto *in vivo* como *in vitro*, incrementa la expresión de componentes de MEC, como colágena y fibronectina [55, 57, 58].

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que IGFBP-5 se encuentra sobreexpresada a nivel del mRNA, en el tejido hepático, en la cirrosis, etapa más avanzada de la fibrosis (Figura 12). Sin embargo, los niveles de proteína de IGFBP-5 en el tejido hepático se encuentran disminuidos en la misma etapa (Figura 15): Esta discrepancia podría deberse a diferentes circunstancias: 1) la proteólisis de IGFBP-5 podría estar aumentada en el tejido hepático en la cirrosis. 2) la afección generalizada en la síntesis de proteínas, que es uno de los marcadores clínicos durante la cirrosis, siendo particularmente la albúmina y los factores de coagulación las proteínas más afectadas, por lo cual se podrían proponer alteraciones a nivel traduccional que afectaran a IGFBP-5. Y finalmente, 3) podría estar incrementada la secreción a la circulación de esta proteína. Esta última conjetura puede ser reforzada por un estudio, en el cual demuestran un aumento de las concentraciones séricas de IGFBP-5 en sujetos con fibrosis severa debida a la enfermedad por hígado graso [62].

Por otra parte, los resultados respecto a la expresión de desmina tiene un comportamiento parecido al de  $\alpha$ -SMA, se observa una tendencia a aumentar conforme se desarrolla la fibrosis; en la Figura 14 se observa que la expresión de desmina está elevada significativamente en el grupo que presenta cirrosis (grupo F4), comparada con aquellos que no tienen fibrosis o muestran fibrosis pero sin llegar a la cirrosis (grupo F0-F2); esto sugiere que existe un aumento en el número de células estelares, sin poder diferenciar si están activadas o no, porque tanto las HSCs quiescentes como las que están activadas y/o transdiferenciadas a miofibroblastos expresan este filamento intermedio del citoesqueleto [9, 10].

En cuanto a la expresión de  $\alpha$ -SMA, marcador más común utilizado para evidenciar la activación de las células estelares, ésta presenta una tendencia a incrementar conforme aumenta el grado de fibrosis; en la Figura 13 se observa

que  $\alpha$ -SMA presenta un incremento entre los grupos que tienen fibrosis severa y cirrosis (grupos F3 y F4, respectivamente) con respecto a aquellos que presentan fibrosis leve o no fibrosis (grupos F1 y F0, respectivamente), esto nos sugiere que hay un aumento en la activación de las células estelares (HSCs), ya sea en su grado de activación o en su número lo cual se ha relacionado con la severidad de la fibrosis hepática [8].

En conjunto, los resultados de  $\alpha$ -SMA y desmina, nos indican que existe una mayor activación de HSCs y un mayor número de éstas en la cirrosis, lo que podría explicar el porqué de la sobreexpresión de IGFBP-5 en esta etapa, ya que las HSCs son células hepáticas que expresan IGFBP-5, y cuando están activas y transdiferenciadas en una mayor magnitud [38].

Hasta donde tenemos conocimiento, no hay evidencia disponible respecto a IGFBP-5 y la reversión de la fibrosis. En este caso no se observó diferencia entre el grupo con fibrosis (F3) y el grupo de reversión (R), probablemente porque en el primer grupo la expresión era baja de antemano, quizás si se estudiara la reversión a partir de la etapa de cirrosis, lo cual no ocurre en humanos pero si en el modelo experimental empleado, se observaría una disminución de la expresión de este gen. Se requieren realizar más estudios para establecer su participación en la reversión de la fibrosis hepática.

En este sentido, una observación importante es la expresión de desmina en la reversión de la fibrosis, que al igual que  $\alpha$ -SMA, está disminuida significativamente en el grupo R, comparada con el grupo F3 (Figura 22); esto en conjunto con los resultados de  $\alpha$ -SMA, nos indica que dicha disminución puede ser debido a una baja en el número de células estelares asociada al decremento en su activación o en el número de las células activadas [5, 72]. La apoptosis ha sido propuesta como el mecanismo principal involucrado en la reducción de las HSCs activadas, [5, 6, 72, 73]; en este sentido, la disminución de IGFBP-5 en el tejido podría favorecer la reversión de la fibrosis por eliminación de HSC (Figura 23), ya que



esta proteína puede aumentar la supervivencia de las HSCs activadas al inhibir su apoptosis [63].

Una de las limitaciones del presente estudio es la técnica utilizada para observar la expresión de IGFBP-5, PCR punto final, tal vez mediante una técnica más sensible, por ejemplo PCR tiempo real, se podría haber distinguido algún cambio en la expresión de IGFBP-5 entre las etapas iniciales e intermedias de la fibrogénesis hepática. Además, se carece de los datos en suero de IGFBP-5, lo cual podría haber corroborado la conjetura de que la secreción de esta proteína está aumentada en la cirrosis y disminuida en la reversión.

No está bien definido el papel de IGFBP-5 en el proceso fibrogénico hepático pero vinculando todo lo anterior nos puede dar un indicio de que IGFBP-5 podría estar involucrada en la perpetuación del daño hepático ya que todas las evidencias mostradas sugieren que IGFBP-5 es un factor pro-fibrótico y se sobreexpresa en la cirrosis; sin embargo, se necesitan más estudios al respecto para confirmar esta suposición y así determinar el papel de esta proteína en la fibrosis hepática y en su progreso hasta el desarrollo de HCC.

En futuras investigaciones acerca de IGFBP-5, se debería considerar observar la expresión de esta proteína en el tejido hepático, así como sus niveles, tanto en tejido como en suero, en un modelo experimental que vaya de una fibrosis severa hasta hepatocarcinoma, por ejemplo, un modelo experimental de tioacetamida, ya que hasta el momento no se cuenta con suficiente evidencia que indique si IGFBP-5 está relacionada con HCC.

## **IX. Conclusiones**

IGFBP-5 se sobreexpresa a nivel del mRNA mientras que la proteína en el tejido disminuye en la última etapa de la cirrosis.

La reversión de la fibrosis, previamente inducida por la administración de CCl<sub>4</sub>, es promovida al proporcionar un periodo de recuperación, retirando el agente agresor, y presumiblemente por una disminución en el número de HSCs.

IGFBP-5 podría estar relacionada en la reversión de la fibrosis pero se necesitan más estudios para confirmar esto.

## X. Anexo I

### – *Hematoxilina-Eosina* –

1. Desparafinado: colocar la laminilla en la estufa durante 30 minutos a 60°, después sumergir en xilol de 10 a 15 minutos.
2. Hidratación: alcohol absoluto por 5 minutos, alcohol de 96° durante 5 minutos y alcohol de 70° por 5 minutos.
3. Lavar en H<sub>2</sub>O destilada.
4. Hematoxilina por 5 minutos.
5. Lavar en H<sub>2</sub>O durante 2 minutos.
6. Eosina alcohólica por 1 minuto.
7. Deshidratar: primero en alcohol de 70°, después en alcohol de 96°, enseguida en alcohol absoluto, y por último en xilol.
8. Montaje.

### – *Rojo de Sirio* –

1. Desparafinado: colocar la laminilla en la estufa durante 30 minutos a 60°, después sumergir en xilol de 10 a 15 minutos.
2. Hidratación: alcohol absoluto por 5 minutos, alcohol de 96° durante 5 minutos y alcohol de 70° por 5 minutos.
3. Lavar en H<sub>2</sub>O destilada.
4. Ácido fosfomolibdico por 5 minutos.
5. Solución picro-rojo de sirio durante 2 horas
6. Lavar en ácido clorhídrico durante 5 minutos.
7. Lavar en H<sub>2</sub>O del grifo.
8. Hemalum de Mayer de 30 a 60 segundos
9. Lavar en H<sub>2</sub>O del grifo.

10. Deshidratar: primero en alcohol de 70°, después en alcohol de 96°, y por último en xilol.

11. Montaje.

– *Tricrómica de Masson* –

1. Desparafinado: colocar la laminilla en la estufa durante 30 minutos a 60°, después sumergir en xilol de 10 a 15 minutos.
2. Hidratación: alcohol absoluto por 5 minutos, alcohol de 96° durante 5 minutos y alcohol de 70° por 5 minutos.
3. Lavar en H<sub>2</sub>O destilada.
4. Hematoxilina de Weigert por 5 minutos.
5. Lavar en H<sub>2</sub>O destilada durante 10 minutos.
6. Fucsina de Ponceau por 5 minutos.
7. Ácido fosfomolibdico durante 5 minutos.
8. Verde luz de 5 a 7 minutos.
9. Deshidratar: primero en alcohol de 70°, después en alcohol de 96°, y por último en xilol.
10. Montaje.

## XI. Referencias

1. Schuppan, D. and Y.O. Kim, *Evolving therapies for liver fibrosis*. J Clin Invest, 2013. **123**(5): p. 1887-901.
2. Krishna, M., *Anatomía microscópica del hígado*. Clinical Liver Disease, 2013. **2**(S5): p. 109-112.
3. Beath, S.V., *Hepatic function and physiology in the newborn*. Seminars in Neonatology, 2003. **8**(5): p. 337-346.
4. Ebaid, A., *Analytical solutions for the mathematical model describing the formation of liver zones via Adomian's method*. Comput Math Methods Med, 2013. **2013**: p. 547954.
5. Hernandez-Gea, V. and S.L. Friedman, *Pathogenesis of liver fibrosis*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 425-56.
6. Friedman, S.L.A., M.J.P. , *Reversing Hepatic Fibrosis*. Science & Medicine, 2002. **8**: p. 194-205.
7. Lee, U.E. and S.L. Friedman, *Mechanisms of hepatic fibrogenesis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(2): p. 195-206.
8. Moreira, R.K., *Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis*. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2007. **131**: p. 1728-1734.
9. Salguero Palacios, R., et al., *Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice*. Lab Invest, 2008. **88**(11): p. 1192-203.
10. Yokoi, Y., Namihisa, T., Kuroda, H., Komatsu, I., Miyazaki, A., Watanabe, S., Usui, K., *Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells)*. Hepatology, 1984. **4**(4): p. 709-714.
11. Elpek, G.O., *Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(23): p. 7260-76.
12. Sobrevalls, L., et al., *Insulin-like growth factor I gene transfer to cirrhotic liver induces fibrolysis and reduces fibrogenesis leading to cirrhosis reversion in rats*. Hepatology, 2010. **51**(3): p. 912-21.

13. Issa, R., et al., *Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: Evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking* ☆. *Gastroenterology*, 2004. **126**(7): p. 1795-1808.
14. Sobia Hassan, S.S., and Shahnaz Imdad Kehar, *Review of diagnostic techniques of hepatic fibrosis*. *Journal Pakistan Medical Association*, 2014. **64**: p. 941-945.
15. Group, P.B.a.T.P.f.t.M.C.S., *An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C*. *Hepatology*, 1996. **24**: p. 289-293.
16. Poynard, T., P. Bedossa, and P. Opolon, *Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C*. *The Lancet*, 1997. **349**(9055): p. 825-832.
17. Shiha, G., Zalata, K., *Ishak versus METAVIR: Terminology, Convertibility and Correlation with Laboratory Changes in Chronic Hepatitis C*, in *Liver Biopsy*, D.H. Takahashi, Editor. 2011. p. 155-170.
18. Batts, K.P., and Ludwig, J., *Chronic Hepatitis. An Update on Terminology and Reporting*. *The American Journal of Surgical Pathology*, 1995. **19**(12): p. 1409-1417.
19. Gressner, O.A. and C. Gao, *Monitoring fibrogenic progression in the liver*. *Clinica Chimica Acta*, 2014. **433**: p. 111-122.
20. Guzmán C., K.R., Kershenobich D., Gutierrez-Reyes G., *Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1 Levels in Chronic Hepatitis C Patients*. *Hepatology*, 2010. **52**(S1): p. 1232A-1232A.
21. Vivian Hwa, Y.O., and Ron G. Rosenfeld, *The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Superfamily*. *Endocrine Reviews*, 1999. **20**(6): p. 761–787.
22. Duan, C. and Q. Xu, *Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions*. *Gen Comp Endocrinol*, 2005. **142**(1-2): p. 44-52.
23. Kevin M. Kelley, Y.O., Sharron E. Gargosky, Zoran Gucev, Tomoko Matsumoto, Vivian HWA, Lilly NG, Diane M. Simpson, Ron G. Rosenfeld, *Insulin-like Growth Factor-binding Proteins (IGFBPs) and Their Regulatory*

- Dynamics*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1996. **28**: p. 619-637.
24. Baylink, S.M.a.D.J., *IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms*. Journal of Endocrinology, 2002. **175**: p. 19-31.
  25. Baxter, R.C., *Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins as Glucoregulators*. Metabolism, 1995. **44 (Suppl 4)**: p. 12-17.
  26. Beattie, J., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): a critical member of the IGF axis*. Biochem J, 2006. **395**(1): p. 1-19.
  27. Address, D.L., *Heparin Modulates the Binding of Insulin-like Growth Factor (IGF) Binding Protein-5 to a Membrane Protein in Osteoblastic Cells*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(47): p. 28289–28296.
  28. Fowlkes, J.L., Thrailkill, Kathryn M., George-Nascimento, Carlos, Rosenberg, Carlyn K. and Serra, Delila M. , *Heparin-Binding, Highly Basic Regions within the Thyroglobulin Type-1 Repeat of Insulin-Like Growth Factor (IGF)-Binding Proteins (IGFBPs) -3, -5, and -6 Inhibit IGFBP-4 Degradation*. Endocrinology, 1997. **138**: p. 2280-2285.
  29. Firth, S.M., and Baxter, R. C., *Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins*. Endocrine Reviews, 2002. **23**(6): p. 824-54.
  30. M R Schneider, E.W., A Hoeflich and H Lahm, *IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own*. Journal of Endocrinology, 2002. **172**: p. 423-440.
  31. Jeong Nam, T., Busby, Walker Jr. and Clemmons, David R. , *Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-5 Binds to Plasminogen Activator Inhibitor-I*. Endocrinology, 1997. **138**: p. 2972-2978.
  32. Stephen M. Twigg, M.C.K., Jürgen Zapf, and Robert C. Baxter, *Insulin-like Growth Factor-binding Protein 5 Complexes with the Acid-labile Subunit*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**: p. 28791–28798.
  33. Twigg, S.M., *Insulin-like Growth Factor (IGF)-binding Protein 5 Forms an Alternative Ternary Complex with IGFs and the Acid-labile Subunit*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(11): p. 6074-6079.

34. Robert C. Baxter, S.M., and Sue M. Firth, *Molecular Distribution of IGF Binding Protein-5 in Human Serum*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2002. **87**(1): p. 271–276.
35. Bach, L.A., S.J. Headey, and R.S. Norton, *IGF-binding proteins--the pieces are falling into place*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(5): p. 228-34.
36. Mark E. Graham, D.M.K., Sue M. Firth, Phillip J. Robinson, and Robert C. Baxter, *The in Vivo Phosphorylation and Glycosylation of Human Insulin-like Growth Factor-binding Protein-5*. Molecular & Cellular Proteomics, 2007. **6**: p. 1392-1405.
37. J.A. Coverley, R.C.B., *Phosphorylation of insulin-like growth factor binding proteins*. Molecular and Cellular Endocrinology, 1997. **128**: p. 1-5.
38. Boers, W., et al., *Transcriptional profiling reveals novel markers of liver fibrogenesis: gremlin and insulin-like growth factor-binding proteins*. J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16289-95.
39. John I. Jones, A.G., Walker H. Busby Jr., Cecilia Camacho-Hubner, and David R. Clemmons, *Extracellular Matrix Contains Insulin-like Growth Factor Binding Protein-5: Potentiation of the Effects of IGF-I*. The Journal of Cell Biology, 1993. **121**: p. 679-687.
40. Zimmermann, E.M., Li, L., Hou, Y. T., Cannon, M., Christman, G. M., Bitar, K. N., *IGF-I induces collagen and IGFBP-5 mRNA in rat intestinal smooth muscle*. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 1997. **273**(4): p. G875-G882.
41. Mukherjee, A., E.M. Wilson, and P. Rotwein, *Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 blocks skeletal muscle differentiation by inhibiting IGF actions*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(1): p. 206-15.
42. Imai, Y., Busby, W. H. Jr, Smith, C. E., Clarke, J. B., Garmong, A. J., Horwitz, G. D., Rees, C., Clemmons, D. R., *Protease-resistant form of insulin-like growth factor-binding protein 5 is an inhibitor of insulin-like growth factor-I actions on porcine smooth muscle cells in culture*. J Clin Invest, 1997. **100**(10): p. 2596-2605.



43. Ewton, D.Z., Coolican, S. A., Mohan, S., Chernausek, S. D., Florini, J. R., *Modulation of insulin-like growth factor actions in L6A1 myoblasts by insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5: a dual role for IGFBP-5*. Journal of Cellular Physiology, 1998. **177**(1): p. 47-57.
44. Gökçe Güllü, S.K.a.M.A., *Functional roles and clinical values of insulin-like growth factor-binding protein-5 in different types of cancers*. Chinese Journal of Cancer, 2012. **31**(6): p. 266-280.
45. Address, D.L.B., R. S., *Human osteoblast-derived insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(31): p. 22467-22472.
46. Luther, G.A., et al., *IGFBP5 domains exert distinct inhibitory effects on the tumorigenicity and metastasis of human osteosarcoma*. Cancer Lett, 2013. **336**(1): p. 222-30.
47. Su, Y., et al., *Insulin-like growth factor binding protein 5 suppresses tumor growth and metastasis of human osteosarcoma*. Oncogene, 2011. **30**(37): p. 3907-17.
48. Schneider, M.R., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits growth and induces differentiation of mouse osteosarcoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(2): p. 435-42.
49. Butt, A.J., et al., *Enhancement of tumor necrosis factor-alpha-induced growth inhibition by insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5), but not IGFBP-3 in human breast cancer cells*. Endocrinology, 2005. **146**(7): p. 3113-22.
50. Butt, A.J., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29676-85.
51. Akkiprik, M., et al., *Multifunctional roles of insulin-like growth factor binding protein 5 in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(4): p. 212.
52. Miyake, H., Pollak, M., and Gleave, M. E., *Castration-induced Up-Regulation of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-5 Potentiates Insulin-like Growth Factor-I Activity and Accelerates Progression to Androgen*

- Independence in Prostate Cancer Models*. Cancer Research, 2000. **60**(11): p. 3058–3064.
53. Wang, H., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein 2 and 5 are differentially regulated in ovarian cancer of different histologic types*. Mod Pathol, 2006. **19**(9): p. 1149-56.
  54. Johnson, S.K., et al., *Differential expression of insulin-like growth factor binding protein-5 in pancreatic adenocarcinomas: identification using DNA microarray*. Mol Carcinog, 2006. **45**(11): p. 814-27.
  55. Allan, G.J., J. Beattie, and D.J. Flint, *Epithelial injury induces an innate repair mechanism linked to cellular senescence and fibrosis involving IGF-binding protein-5*. J Endocrinol, 2008. **199**(2): p. 155-64.
  56. Sureshbabu, A., et al., *IGFBP-5 induces epithelial and fibroblast responses consistent with the fibrotic response*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 4): p. 882-5.
  57. Joseph M. Pilewski, L.L., Adam C. Henry, Alycia V. Knauer, and Carol A. Feghali-Bostwick, *Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins 3 and 5 Are Overexpressed in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Contribute to Extracellular Matrix Deposition*. American Journal of Pathology, 2005. **166**: p. 399-407.
  58. Yasuoka, H., et al., *Insulin-like growth factor binding protein 5 induces skin fibrosis: A novel murine model for dermal fibrosis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(9): p. 3001-10.
  59. Yasuoka, H., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein-5 induces pulmonary fibrosis and triggers mononuclear cellular infiltration*. Am J Pathol, 2006. **169**(5): p. 1633-42.
  60. Song, S.E., et al., *IGFBP5 mediates high glucose-induced cardiac fibroblast activation*. J Mol Endocrinol, 2013. **50**(3): p. 291-303.
  61. Yasuoka, H., et al., *The fibrotic phenotype induced by IGFBP-5 is regulated by MAPK activation and egr-1-dependent and -independent mechanisms*. Am J Pathol, 2009. **175**(2): p. 605-15.

62. Colak, Y., et al., *Serum concentrations of human insulin-like growth factor-1 and levels of insulin-like growth factor-binding protein-5 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with liver histology*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2012. **24**(3): p. 255-61.
63. Sokolovic, A., et al., *Insulin-like growth factor binding protein 5 enhances survival of LX2 human hepatic stellate cells*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2010. **3**: p. 3.
64. Forbes, S.J. and M. Parola, *Liver fibrogenic cells*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(2): p. 207-17.
65. Tripathi, G., et al., *IGF-independent effects of insulin-like growth factor binding protein-5 (Igfbp5) in vivo*. FASEB J, 2009. **23**(8): p. 2616-26.
66. Andress, D.L., *Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates phosphorylation of the IGFBP-5 receptor*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 1998. **274**: p. E744–E750.
67. Baxter, R.C., *Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2000. **278**: p. E967–E976.
68. Leal, S.M., Huang, S.S., and Huang, J.S., *Interactions of High Affinity Insulin-like Growth Factor-binding Proteins with the Type V Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor in Mink Lung Epithelial Cells*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(10): p. 6711-6717.
69. O'Grady, P., Huang, S. S., Huang, J. S., *Expression of a new type high molecular weight receptor (type V receptor) of transforming growth factor beta in normal and transformed cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **179**(1): p. 378-385.
70. O'Grady, P., Kuo, M. D., Baldassare, J. J., Huang, S. S., Huang, J. S., *Purification of a new type high molecular weight receptor (type V receptor) of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) from bovine liver. Identification of the type V TGF- $\beta$  receptor in cultured cells*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(13): p. 8583-8589.

71. Constandinou C, H.N., and Iredale JP, *Modeling Liver Fibrosis in Rodents*. *Methods Mol Med*, 2005. **117**: p. 237–250.
72. Kong, D., et al., *Clearance of activated stellate cells for hepatic fibrosis regression: molecular basis and translational potential*. *Biomed Pharmacother*, 2013. **67**(3): p. 246-50.
73. Iredale, J.P., Benyon, R. C., Pickering, J., McCullen, M., Northrop, M., Pawley, S., Hovell, C., Arthur, M. J. P., *Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis: hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(3): p. 538–549.

