



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO INSULINOIDE I (IGF-I) Y SU RECEPTOR
(IGF-IR) DURANTE EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS
HEPÁTICA EN UN MODELO MURINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JAVIER MORENO GONZÁLEZ



CDMX, 2016



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:	Dra. Elena Zambrano González
VOCAL:	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
SECRETARIO:	Dra. Carolina Guzmán Arriaga
1er. SUPLENTE:	Dr. Guillermo Celestino Cardoso Saldaña
2do. SUPLENTE:	Dra. Ruth Bustamante García

Sitio donde se desarrolló el tema:

Hospital General de México
Departamento de Medicina Experimental
Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM)

Asesor del Tema:

Dra. Carolina Guzmán Arriaga

Sustentante:

Javier Moreno González

“Ser lo que somos y convertirnos en lo que somos capaces de ser es la única finalidad de la vida”

Robert Louis Stevenson

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES	5
3.1 El Hígado humano.....	5
3.2 Epidemiología de las enfermedades hepáticas	6
3.3 Fibrosis Hepática.....	7
3.3.1 Patogénesis del proceso fibrogénico	7
3.3.2 Células Estelares Hepáticas y fibrogénesis.	8
3.3.3 Reversión de la fibrosis.....	10
3.3.4 Diagnóstico y clasificación de las etapas del proceso fibrogénico	11
3.3.5 Biomarcadores del proceso fibrogénico	13
3.4 El Factor de Crecimiento Insulinoide (IGF).....	14
3.4.1 El eje GH/IGF-I	14
3.4.2 Actividad de IGF-I regulada por las proteínas de unión a IGF (IGFBPs)	16
3.4.3 Receptor de IGF-I (IGF-IR) y señalización.....	17
3.4.4 Papel Fisiológico de IGF-I	18
3.4.5 IGF-I/IGF-IR en cirrosis hepática.	20
3.4.6 Efectos de la administración de IGF-I en la cirrosis.	21
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
5. HIPÓTESIS.....	23
6. OBJETIVOS	23
6.1 Objetivo general	23
6.2 Objetivos particulares	23
7. MÉTODOLÓGÍA.....	24
7.1 Inducción de cirrosis en un modelo murino.....	24
7.2 Recolección de muestras y almacenamiento.	24
7.3 Histología	25
7.4 Extracción de RNA total e integridad	25
7.5 Cuantificación de RNA total.....	26
7.6 Obtención de DNA complementario (cDNA)	26
7.7 Diseño de primers para IGF-I e IGF-IR	26
7.8 Estandarización de PCR, amplificación y electroforesis	27
7.9 Densitometría Óptica.....	28
7.10 Extracción de Proteínas y Cuantificación de IGF-I en tejido y suero.....	28

7.10.1	Extracción	28
7.10.2	Cuantificación de IGF-I	29
7.11	Cuantificación de IGFBP-3 en tejido hepático	30
7.12	Análisis Estadístico.....	31
8.	RESULTADOS.....	32
8.1	Inducción de la fibrosis.....	32
8.2	Clasificación Histológica	33
8.3	Expresión de IGF-I en el progreso de la fibrosis.	36
8.4	Expresión de IGF-IR en el progreso de la fibrosis.	36
8.5	Expresión de las proteínas transportadoras de IGF-I (IGFBP-3 y ALS) en el progreso de la fibrosis.....	37
8.6	Cantidad de proteína IGF-I en tejido e IGF-I en suero.	39
8.7	Cantidad de proteína IGFBP-3 en tejido.	40
8.8	Reversión del proceso fibrogénico.....	41
9.	Discusión.....	45
10.	Conclusiones.....	49
11.	REFERENCIAS.....	50

1. RESUMEN

El Factor de Crecimiento Insulinoide I (IGF-I) es una proteína producida principalmente por el hígado, que promueve la proliferación celular a través de la unión con su receptor (IGF-IR). Las concentraciones de IGF-I en suero se han visto reducidas en la cirrosis hepática descompensada, mientras que los niveles de expresión de IGF-IR se incrementan en el hepatocarcinoma celular (HCC). Sin embargo, hay poca evidencia a cerca del comportamiento en la expresión de ambas moléculas durante las diferentes etapas de fibrosis que preceden a la cirrosis o al HCC. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de IGF-I e IGF-IR en la progresión de fibrosis hacia su etapa más avanzada, la cirrosis, en un modelo murino. Para ello, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 3 meses de edad y con un peso aproximado de 250 ± 20 g, a las que les fueron inducidos diferentes grados de fibrosis mediante administración de 8, 12, 20 y 40 dosis de CCl_4 vía i.p., obteniendo 4 grupos en distintas etapas de fibrosis según la escala METAVIR: F1, F2, F3 y F4 (cirrosis) respectivamente. Adicionalmente, se contó con un grupo control que no tuvo ninguna administración del agente hepatotóxico (Grupo F0) y un grupo al que se le administraron 20 dosis de CCl_4 generando una fibrosis en etapa F3 y que además tuvo un mes de recuperación para observar el proceso de reversión del proceso fibrogénico, a este grupo se le denominó como F3-R. El grado de fibrosis se determinó de acuerdo a análisis histológico y mediante la tinción de rojo de Sirio. Se realizó RT-PCR para determinar el patrón de expresión de IGF-I e IGF-IR, así como sus principales proteínas acarreadoras (IGFBP-3) y la Subunidad Ácido Lábil (ALS). La expresión de estos genes se normalizó con la expresión del gen 18S mediante densitometría óptica. Los datos se presentan como Media \pm EE y se analizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. La expresión de IGF-I disminuyó significativamente en el grupo de cirrosis (F4) al ser comparado con F0 y F1. Por otro lado, los niveles de expresión de IGF-IR, IGFBP-3 y ALS no se afectaron durante el proceso fibrogénico. La cantidad de proteína IGF-I en tejido hepático no

tuvo cambios significativos en ninguno de los 4 grupos mientras que IGFBP-3 tuvo una disminución significativa en el grupo F4 con respecto a F1. Con respecto al proceso de reversión, no hubo cambios significativos en el grupo F3-R al ser comparado con el grupo F3 correspondiente en la expresión, ni en la cantidad de proteína de ninguna molécula. A pesar del posible valor diagnóstico de IGF-I en la severidad de la cirrosis, este factor de crecimiento, su receptor y sus proteínas acarreadoras IGFBP-3 y ALS no podrían ser consideradas como biomarcadores del proceso fibrogénico en el hígado.

2. INTRODUCCIÓN

La fibrosis hepática es una respuesta de cicatrización a una lesión en el hígado cuya principal característica es la acumulación de matriz extracelular (MEC) después de una lesión. Cuando la lesión permanece por un periodo constante, la inflamación y la acumulación de MEC provocan una sustitución del parénquima hepático por un tejido cicatrizal. La progresión de la enfermedad con fibrogénesis sostenida lleva a la cirrosis, cuya principal característica patológica es la formación de nódulos de regeneración rodeados de septos fibrosos.

En años recientes 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 (IGFBPs) y el mismo Factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I).

El IGF-I es una hormona polipeptídica secretada en múltiples tejidos por efecto de la hormona del crecimiento (GH), sin embargo, el 90% del péptido circulante es de origen hepático. IGF-I circula en la sangre unido a las IGFBPs, las cuales modulan la biodisponibilidad de IGF-I.

A pesar de que IGF-I tiene diversos efectos en tejidos extra-hepáticos, existen pocos datos sobre el papel que tiene esta hormona en el hígado, lo cual se supone que es debido a la baja cantidad de receptores de IGF-I (IGF-IR) sobre la membrana de los hepatocitos.

Para el propósito de este proyecto se ha considerado el estudio de IGF-I, debido a que se sabe que esta molécula se encuentra relacionada con la cirrosis. Del mismo modo se estudió a IGFBP-3 y ALS, principales proteínas acarreadoras de IGF-I, ya que al igual que éste último han sido relacionadas con dicho padecimiento. Además se estudió el receptor IGF-IR durante el proceso fibrogénico cuya etapa más avanzada, la cirrosis, es considerada el principal factor de riesgo para el desarrollo de hepatocarcinoma celular (HCC), proceso que ha sido asociado con una expresión aumentada de este receptor.

A pesar de lo anterior, no hay suficientes datos sobre la función de estas moléculas durante las etapas de la fibrogénesis previas a la cirrosis o al HCC. Este estudio permitirá identificar si existe algún patrón en la expresión de IGF-I, IGFBP-3, ALS o IGF-IR que esté relacionado con la progresión de la fibrosis hepática.

3. ANTECEDENTES

3.1 El Hígado humano

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo y representa aproximadamente el 2% del peso corporal total. Recibe aproximadamente el 25% del flujo sanguíneo y utiliza cerca del 20% del oxígeno que requiere una persona [1]. Anatómicamente, está situado debajo del diafragma y ocupa la mayor parte del hipocondrio derecho y parte del epigastrio en la cavidad abdominopélvica. Está cubierto por una cápsula de tejido conectivo denominada Cápsula de Glisson, que a su vez está rodeada por el peritoneo. El hígado está dividido en dos lóbulos (izquierdo y derecho) por el ligamento falciforme (**Fig. 1A**) [2]. La unidad funcional del hígado es una estructura hexagonal denominada como lobulillo hepático [1, 2] que posee distintos elementos estructurales: 1) el parénquima hepático que está conformado por placas celulares hepáticas que se alejan de la vena central. Estas placas celulares están formadas por dos cordones de hepatocitos entre los cuales se encuentran los canalículos biliares; 2) los sinusoides hepáticos que son espacios vasculares que recorren las placas de hepatocitos y cuyas paredes están formadas por células endoteliales fenestradas. En los sinusoides se encuentran las células de Kupffer. Arteriolas hepáticas y vénulas centrales atraviesan los lobulillos pasando por estos sinusoides hasta llegar a la vena central y, 3) el espacio de Disse que separa las placas de hepatocitos del endotelio y en donde se encuentran las células estelares hepáticas (HSCs) (**Fig. 1B**)

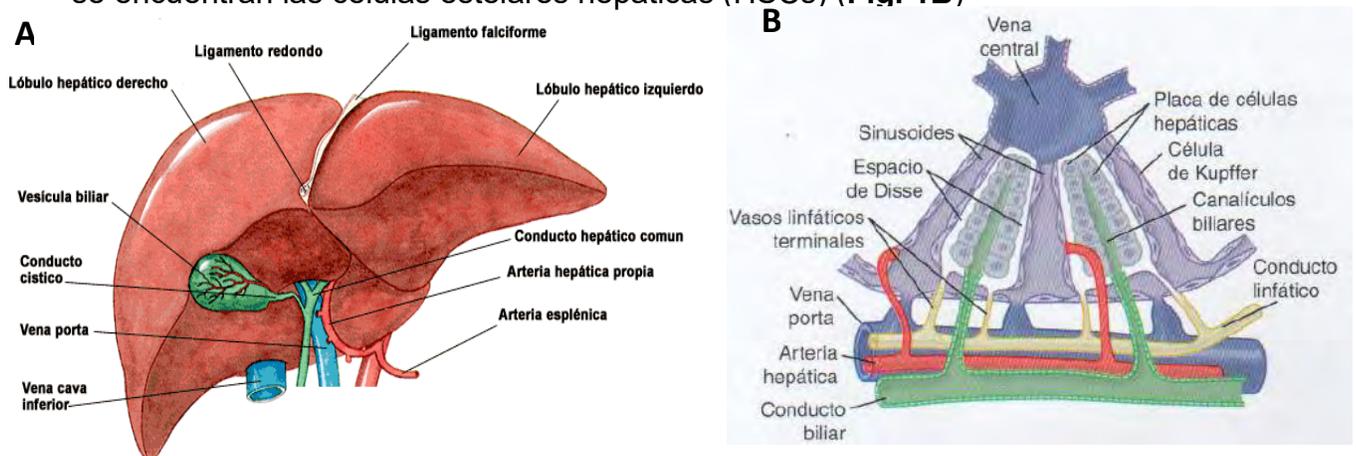


Figura 1. Estructura anatómica del hígado. A) Estructura y elementos más importantes en el hígado de humano. **B)** Esquema de una porción del lobulillo hepático [1].

El hígado tiene una gran cantidad de funciones en el organismo, entre ellas la captación de nutrientes desde el intestino a través de la vena porta. También participa en el almacenamiento de la vitamina A; convierte la vitamina D en 25-dehidrocolecalciferol que es transformada posteriormente en el riñón a 1,25 dihidrocolecalciferol para una correcta absorción del calcio; la vitamina K es utilizada para la síntesis de protrombina y otros factores de coagulación. Este órgano también es responsable del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Tiene actividad de detoxificación de compuestos nocivos por medio de su biotransformación y además tiene la función de secretar la bilis que sirve para emulsionar las grasas y así facilitar su absorción en el intestino delgado [3].

3.2 Epidemiología de las enfermedades hepáticas

Como se ha mencionado anteriormente, el hígado tiene a su cargo una gran diversidad de funciones que son fundamentales para el correcto desempeño del organismo. A nivel mundial el daño al hígado representa una de las principales causas de mortalidad. En México, según datos de Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), hacia el 2012 las enfermedades del hígado representaban la quinta causa de mortalidad en ambos sexos (**Fig. 2**) [4]. La etiología que afecta al hígado es muy diversa, siendo las principales causas de lesión hepática el consumo excesivo de alcohol, la infección por el virus de la hepatitis C, el hígado graso asociado al síndrome metabólico y algunas condiciones genéticas como la hemocromatosis.

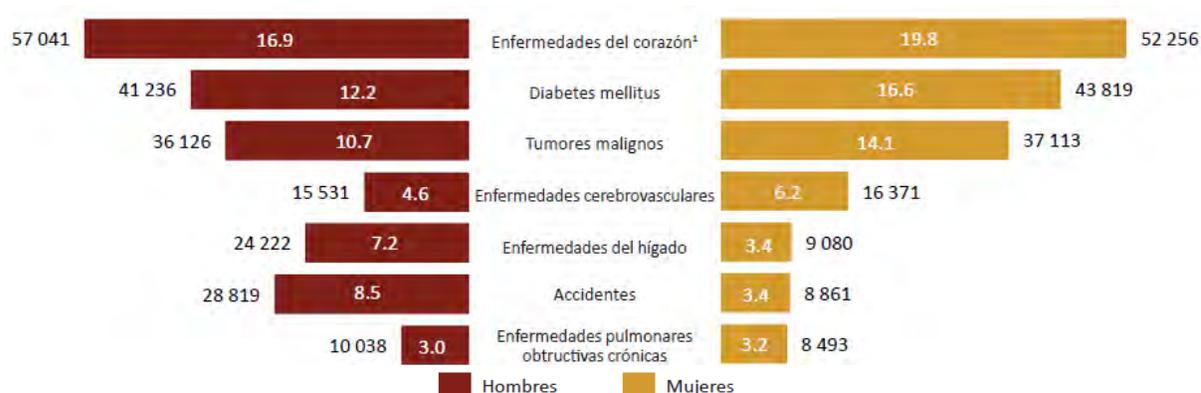


Figura 2. Principales causas de mortalidad en México. Las enfermedades hepáticas representan la quinta causa de mortalidad en ambos sexos [4].

3.3 Fibrosis Hepática

3.3.1 Patogénesis del proceso fibrogénico

La fibrosis hepática es el resultado de un daño que se presenta de manera crónica y que se caracteriza por la acumulación de Matriz Extracelular (MEC) en la mayoría de las enfermedades hepáticas crónicas mencionadas anteriormente (alcoholismo, infecciones virales, autoinmunidad, etc.). La acumulación de las proteínas de MEC distorsiona la arquitectura del hígado formando una cicatriz fibrosa [5]. Cuando la lesión es aguda los cambios son temporales y la arquitectura del hígado puede retornar a su composición normal. Pese a lo anterior, si el daño al tejido hepático es continuo se genera una inflamación crónica y la acumulación de MEC se mantiene llevando al remplazo del parénquima hepático por un tejido cicatrizal [6] y la subsecuente formación de nódulos de regeneración de hepatocitos que definen a la cirrosis. La cirrosis produce disfunción hepatocelular y aumento en la resistencia intrahepática al flujo sanguíneo, generando así insuficiencia hepática e hipertensión portal respectivamente [7]. En la mayoría de los pacientes la progresión a cirrosis ocurre después de un intervalo superior a 20 años. Los pacientes que han desarrollado cirrosis pueden no presentar complicaciones después de varios años, lo que se denomina como un estado de cirrosis compensada, seguido de una fase de progresión rápida, caracterizada por complicaciones específicas denominada como fase descompensada [8]. Las mayores complicaciones clínicas de la cirrosis descompensada incluyen ascitis, falla renal, encefalopatía hepática y sangrado variceal. La cirrosis descompensada se asocia con una baja esperanza de vida y se considera como un factor de riesgo para el desarrollo HCC, siendo el trasplante de hígado la única opción terapéutica [9].

La fibrosis hepática se asocia con alteraciones tanto en la cantidad como en la composición de la MEC [10]. Seguido de la lesión hepática, células inflamatorias se infiltran al parénquima hepático y las células de Kupffer activadas liberan mediadores fibrogénicos. Además las células estelares hepáticas (HSCs por sus siglas en inglés) proliferan y sufren una activación y cambio fenotípico secretando

grandes cantidades de moléculas de MEC (**Fig. 3**). En etapas avanzadas de la enfermedad, el hígado presenta una acumulación de MEC hasta seis veces mayor que la que presenta un hígado sano, esto incluye un aumento en la cantidad de colágenas (I, III y IV), fibronectina, elastina, laminina y proteoglicanos. Este aumento en la deposición de MEC se origina por dos causas, por un lado un aumento en la síntesis de los componentes de la MEC y por otro lado una disminución en la actividad de degradación por parte de las Metaloproteinasas de Matriz (MMPs). La disminución en la degradación de MEC por parte de las MMPs se da principalmente por una sobreexpresión de sus inhibidores específicos denominados TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) [11].

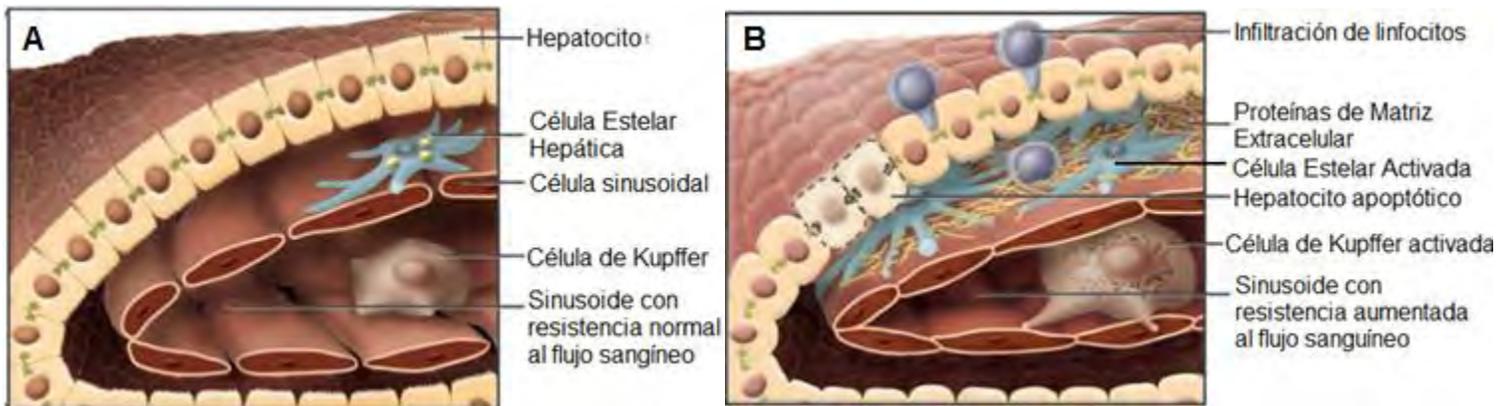


Figura 3. Cambios asociados a la fibrosis hepática. A) Componentes celulares y arquitectura en un hígado sano. **B)** Seguimiento de la lesión hepática, linfocitos inflamatorios se infiltran al parénquima hepático y las células de Kupffer activadas liberan mediadores fibrogénicos. Las HSCs proliferan y sufren una activación caracterizada por la pérdida de sus depósitos de retinol secretando grandes cantidades de proteínas de MEC. Tomada y modificada de [7].

3.3.2 HSCs y fibrogénesis.

Las HSCs son las principales productoras de MEC en el hígado. En un hígado sano estas células residen en el espacio subendotelial de Disse y son el mayor sitio de almacenamiento de vitamina A [12]. En condiciones fisiológicas, las HSCs almacenan el 80% de los retinoides del cuerpo entero en forma de pequeñas gotas en el citoplasma [13]. Cuando hay lesión hepática, las HSCs quiescentes se activan por inducción de TGF- β (Factor de crecimiento transformante β) la citocina

fibrogénica más importante en el hígado, y se transdiferencian en células tipo miofibroblasto, adquiriendo propiedades contráctiles, proinflamatorias y fibrogénicas [12-17].

Estas HSCs transdiferenciadas migran y se acumulan en los sitios en los que se lleva a cabo la reparación del tejido, secretando una gran cantidad de MEC y regulando la degradación de la misma. El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés), producido por las células de Kupffer, es el principal mitógeno para las HSCs activadas y se ha demostrado que su inhibición atenúa la fibrogénesis hepática experimental [18].

Los cambios en la composición de la MEC pueden estimular de manera directa la fibrogénesis. La colágena tipo IV, el fibrinógeno y el activador de plasminógeno tipo urocinasa estimulan a las HSCs residentes activando citocinas latentes tales como TGF- β . Por otro lado las colágenas fibrilares pueden unirse y estimular a las HSCs vía receptor del dominio de discoidina 2 (DDR2) e integrinas [19].

Friedman describe el proceso fibrogénico causado por las HSCs en 3 etapas: iniciación, perpetuación y resolución (**Fig. 4**) [20].

La iniciación se refiere a los cambios primarios fenotípicos de las HSCs los cuales brindan mayor capacidad de respuesta a los factores de crecimiento y finalmente a un incremento de la síntesis de moléculas de MEC. El estímulo parácrino inicial incluye exposición a peróxidos lipídicos, productos de hepatocitos dañados y señales de las células endoteliales y de Kupffer [21-23]. Los cambios iniciales son de tipo parácrino, provenientes de los diferentes tipos celulares ya mencionados: hepatocito, células de Kupffer, leucocitos, células endoteliales sinusoidales, a través de múltiples moléculas y citocinas específicas.

La perpetuación resulta de los efectos de estos estímulos en el mantenimiento del fenotipo activado de las HSCs y la generación de fibrosis. La activación sostenida involucra al menos siete cambios en el comportamiento celular de las HSCs que comprenden: proliferación, quimiotaxis, pérdida de los retinoides, liberación de citocinas, contractilidad, fibrogénesis y degradación de la matriz extracelular. El efecto neto de estos cambios es la acumulación de MEC. Durante esta fase hay estímulos proinflamatorios, profibrogénicos y promitogénicos que actúan de una manera autócrina y parácrina.

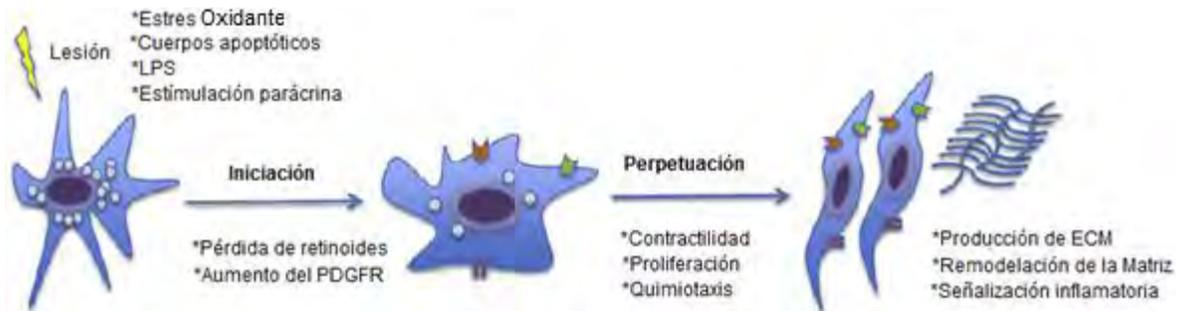


Figura 4. Proceso de activación de las HSCs. Las HSCs son las principales efectoras durante el proceso de fibrosis hepática y sufren activación en un proceso de dos fases. Tomada y modificada de [23].

3.3.3 Resolución de la fibrosis

A medida que la fibrosis hepática progresa, la MEC se torna resistente a degradación por proteasas debido al engrosamiento de los septos fibrosos [22].

En modelos de fibrosis hepática experimental en animales, al retirar el agente etiológico de la enfermedad se promueve la regresión de la fibrosis [23]. Incluso en humanos, el adecuado tratamiento de las enfermedades subyacentes a la fibrosis hepática puede resultar en una reversión de la misma.

La completa recuperación de la fibrosis hepática involucraría remodelación y ruptura de los distintos componentes de la MEC, en su mayoría colágena tipo I. Sin embargo, como ya se mencionó, estudios han demostrado que a pesar de que la expresión del mRNA de las metaloproteinasas de matriz, proteasas encargadas de la degradación de MEC, permanece sin cambios en un hígado normal con respecto a un hígado cirrótico, la actividad de estas Metaloproteínas de Matriz

se ve inhibida por la sobreexpresión de sus inhibidores específicos TIMPs [11,24, 25].

Dado que las HSCs son la principal fuente tanto de MEC como de TIMPs, la resolución de la fibrosis puede requerir dos vías mediante las cuales estas células reduzcan o reviertan su activación: 1) la remoción por medio de apoptosis de la población de HSCs activadas y 2) la posible reversión al fenotipo quiescente [26].

Mientras que la segunda vía no se ha observado *in vivo*, cada vez hay más evidencia que señala la apoptosis como el mecanismo más importante mediante el cual la reversión de la fibrosis es posible.

Las HSCs presentan apoptosis mediada por CD95 y por la expresión del Ligando inductor de apoptosis relacionado al Factor de Necrosis Tumoral (TRAIL) y por medio de las células Natural Killer que inducen la apoptosis de las HSCs por medio del mecanismo de TRAIL [27]. El papel de las Natural Killer es consistente con estudios que reportan que en el envejecimiento la función de éstas disminuye y se acelera la fibrosis [28].

3.3.4 Diagnóstico y clasificación de las etapas del proceso fibrogénico

La evaluación de la fibrosis hepática se ha llevado a cabo durante mucho tiempo mediante el estudio histológico de una muestra de tejido. La biopsia hepática se ha considerado como el mejor estándar en la evaluación del proceso fibrogénico [29].

Existen diversas escalas para determinar el grado de daño histológico al hígado: Ishak, METAVIR, Knodell, Scheuer y Ludwig [30-34]. La escala de Ishak y la de METAVIR son los sistemas de clasificación más ampliamente aceptados para la evaluación de la fibrosis (**Tabla 1**). En la escala de METAVIR sólo la hepatitis y la necrosis determinan el grado de actividad, mientras que en la escala de Ishak, el

infiltrado portal y la necrosis confluyente son incluidos junto con los dos parámetros anteriores.

Grado de Fibrosis	METAVIR	Ishak
F0	Sin fibrosis	Sin fibrosis
F1	Fibrosis portal sin septos	Fibrosis en algunas áreas portales con o sin septos fibrosos cortos
F2	Fibrosis con mínimos septos	Fibrosis en la mayoría de las áreas portales con o sin septos fibrosos cortos
F3	Fibrosis con numerosos septos	Fibrosis en la mayoría de las áreas portales con puentes ocasionales porta-porta
F4	Cirrosis	Fibrosis en área porta con marcado puenteo porta-porta y porta-central
F5		Puenteo porta-porta o porta-central con nódulos ocasionales (cirrosis incompleta)
F6		Cirrosis, probable o definitiva

Tabla 1. Escala ISHAK y METAVIR. La escala METAVIR y de Ishak son las más utilizadas en la valoración de la fibrosis hepática.

A pesar de que es el mejor estándar, la biopsia hepática está muy lejos de ser un “estándar de oro” pues su fiabilidad es restringida ya que la muestra tomada representa sólo una de cada 50 000 partes del hígado, esto asociado al hecho de que la distribución de los septos fibrosos puede ser heterogénea. Además de lo anterior, la biopsia hepática resulta ser un método invasivo que involucra dolor y complicaciones mayores en un 40% y 0.5% de los pacientes respectivamente [35]. Asimismo, puede ocurrir un error en el muestreo sobre todo cuando el espécimen que es tomado resulta pequeño. La posibilidad de error, puede ser entre 33% y 50% en ambos lóbulos. En un estudio de biopsia por laparoscopia en el que las muestras fueron obtenidas de ambos lóbulos, se encontró en una tercera parte de los pacientes una diferencia de al menos un grado de fibrosis entre los dos lóbulos [36]. Aunado a lo anterior, el examen histológico resulta propenso a variaciones intra- e inter-observador y no es capaz de predecir la progresión de la enfermedad

[37]. Finalmente, la biopsia hepática tiene un alto costo para los pacientes al requerir vigilancia por el riesgo de sangrado [38].

3.3.5 Biomarcadores del proceso fibrogénico

Por todas las limitantes en el uso de la biopsia hepática, se ha intentado reemplazar su uso con el de métodos no invasivos como los biomarcadores séricos, éstos son comúnmente clasificados en biomarcadores de Clase I o biomarcadores de Clase II.

Los biomarcadores de fibrosis de Clase I son fisiopatológicamente derivados de cambios en los tipos celulares fibrogénicos, particularmente en las HSCs y miofibroblastos [39], es decir, reflejan la actividad del proceso fibrogénico o fibrólítico. Sin embargo, estos biomarcadores no indican la etapa o la transición fibrótica del órgano. Algunos ejemplos de este tipo de biomarcadores son: péptido N terminal de procolágena tipo III (PIIINP), ácido hialurónico, laminina, MMP-2 y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF por sus siglas en inglés).

A diferencia de los biomarcadores de Clase I, los de Clase II estiman el grado de fibrosis y en general comprenden pruebas clínicas que no reflejan el metabolismo de la MEC o los cambios en las células fibrogénicas, es decir, su relación con la fibrogénesis es indirecta. Esta categoría comprende una gran cantidad de escalas bioquímicas y combinaciones multiparamétricas o paneles que son seleccionados por varios modelos estadísticos y algoritmos matemáticos. En general, estos paneles son pruebas de laboratorio que están sujetas a cambios en el suero o plasma de los pacientes con fibrosis o cirrosis. Los parámetros medidos comprenden aquellos de necrosis tales como ALT y AST, pruebas de coagulación, proteínas de transporte, bilirrubina y algunos parámetros de la MEC. Los paneles más empleados son el FibrotestTM y el ActitestTM, este último también permite evaluar la actividad necroinflamatoria, sin embargo existen gran variedad de índices tales como: APRI, índice PGAA, índice Bonacini, índice Forns, FibroIndex y Hepascore entre otros [40-45].

A pesar de que se han propuesto muchos biomarcadores, en la actualidad no existe ninguno capaz de reemplazar a la biopsia hepática en la evaluación de la fibrosis debido principalmente a su pobre capacidad de diferenciar entre estados intermedios en el proceso fibrogénico. Es por ello que se continúan buscando nuevas moléculas que sean de utilidad para mejorar el diagnóstico de la fibrosis hepática.

3.4 El Factor de Crecimiento Insulinoide (IGF)

El sistema del factor de crecimiento insulinoide está formado por tres ligandos, tres receptores y al menos seis proteínas de unión de alta afinidad que trabajan en conjunto para regular el metabolismo, proliferación, diferenciación y apoptosis en la mayoría de las células. Los tres ligandos son la insulina, IGF-I e IGF-II. Cada uno de estos ligandos tiene alta afinidad por sus receptores específicos que son el receptor de insulina (IR), receptor de IGF-I (IGF-IR) y el receptor de IGF-II (IGF-IIR) respectivamente. Además, el eje IGF está formado por proteínas de unión a IGF denominadas IGFBPs (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins) y proteasas de IGFBPs [46].

3.4.1 El eje GH/IGF-I

IGF-I e IGF-II son polipéptidos de aproximadamente 7kDa que comparten el 62% de su secuencia de aminoácidos [47] y el 50% de homología con la estructura de la insulina. Inicialmente estas moléculas fueron nombradas como somatomedinas por mediar las actividades de la hormona del crecimiento (GH), también conocida como somatotropina. Sin embargo, después se les dio su nombre actual para resaltar su similitud con la insulina [48].

IGF-I es el principal mediador de las funciones de la GH en el desarrollo embrionario y el crecimiento postnatal. La GH, que es sintetizada en la hipófisis anterior, se encuentra bajo un delicado control entre la hormona liberadora de la

hormona del crecimiento (GHRH por sus siglas en inglés o somatocrinina) y la hormona inhibidora de la hormona del crecimiento (GHIH o somatostatina), ambas liberadas por el hipotálamo como resultado de factores sistémicos, metabólicos y hormonales [49]. Una vez liberada la GH, ésta se une a sus receptores en el hígado activando una ruta de señalización que lleva a la transcripción de diversos genes, entre ellos el de IGF-I [50]. Estos transcritos codifican para diversas pre-proteínas que sufren modificaciones post-traduccionales y maduran por escisión proteolítica en ambos extremos, lo cual resulta en un polipéptido de 70 aminoácidos que corresponde a IGF-I [51]. El IGF-I producido inhibe la secreción de la GH actuando por dos mecanismos: primero, actúa directamente en la hipófisis inhibiendo la expresión del gen de la GH [52] y por otro lado, estimula la secreción de la somatostatina en el hipotálamo, que a su vez inhibe la síntesis de la GH [53-55]. De esta manera, se establece un sistema de retroalimentación negativa entre la GH e IGF-I (**Fig. 5**).

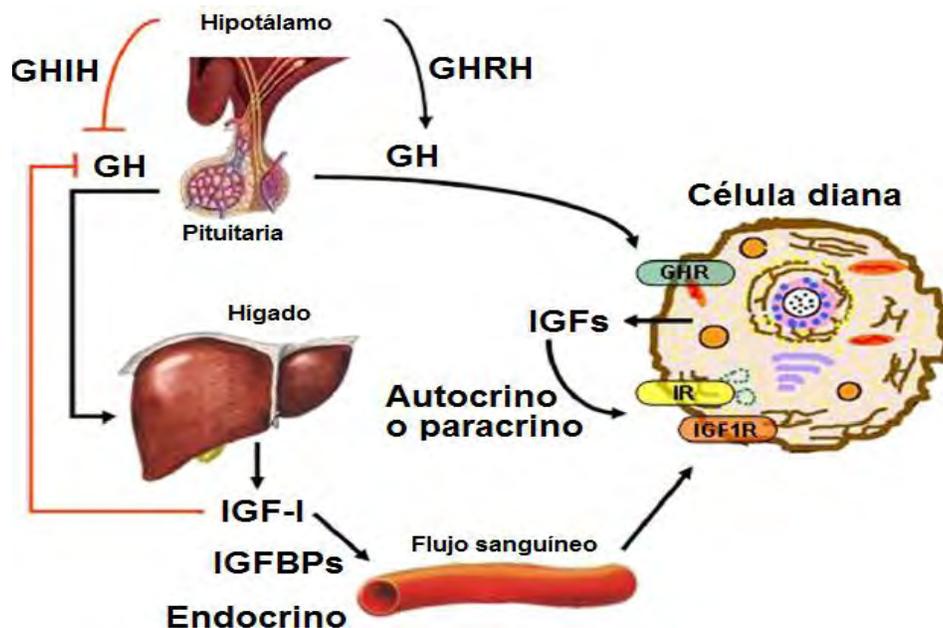


Figura 5. Eje GH/IGF-I. En el organismo, IGF-I es producido por el hígado principalmente y sus concentraciones séricas se encuentran bajo control de la GH. A su vez, la GH es regulada por la GHIH y GHRH provenientes del hipotálamo. IGF-I es generalmente liberado a la circulación pero puede ser producido para actuar de manera autócrina o parácrina. Tomada y modificada de [55].

3.4.2 Actividad de IGF-I regulada por IGFBPs

Como una hormona con un amplio rango de papeles fisiológicos, los niveles de IGF-I deben ser estrictamente controlados como se ha demostrado en resultados *in vivo*: seis formas de proteínas de unión a IGF-I de alta afinidad, un gran número de proteasas de IGFBPs, variaciones alélicas y un “splicing” alternativo son algunos de los mecanismos por los cuales IGF-I se mantiene en rangos fisiológicos adecuados para el organismo (286.1 ± 52.4 ng/mL, en adultos entre 21-40 años de edad) [56].

IGF-I es una hormona que tiene gran importancia en estados embriológicos y postnatales. Aunque es principalmente producido por el hígado (cerca del 90% del IGF-I circulante es producido por este órgano), cada tejido puede secretarlo para fines autócrinos o parácrinos [57]. Una vez que IGF-I es sintetizado en respuesta al estímulo de la GH, es liberado al torrente sanguíneo donde circula unido a sus proteínas de unión IGFBPs e interactúa con receptores específicos en los órganos diana como el músculo, hueso, intestino y testículos, entre otros. Como se ha mencionado anteriormente, existen al menos seis IGFBPs (IGFBP-1 a IGFBP-6) de alta afinidad que transportan a IGF-I en circulación. Éstas participan de manera importante en la biodisponibilidad de IGF-I y su síntesis se encuentra bajo control metabólico y hormonal. De manera general, las funciones de las IGFBPs son: 1) transportan IGF-I en plasma y controlan el flujo de éste desde el espacio vascular hacia los tejidos; 2) aumentan el tiempo de vida media de IGF-I y regulan su aclaramiento metabólico; 3) funcionan como un medio de localización específica celular o tisular y 4) modulan de manera directa la interacción de IGF-I con su receptor y de esta manera regulan indirectamente sus acciones biológicas [58].

Más del 90% de IGF-I circulante se encuentra unido a IGFBP-3 y a la subunidad ácida lábil (ALS) para formar un complejo ternario de 150 kDa que permite prolongar su tiempo de vida media de 10 minutos a 15 horas y, en general, llevar a cabo sus funciones fisiológicas [59-60]. No sólo IGFBP-3 puede unirse a IGF-I, otras IGFBPs también lo transportan y sólo el 1% circula en forma libre. La alta eficiencia en la unión de IGF-I se debe a un exceso en la presencia de IGFBPs (50

veces más alta que IGF-I) y a la alta afinidad en la unión [60- 61]. Sin embargo, el complejo IGF-I/IGFBP-3/ALS es muy grande para pasar a través del endotelio vascular y llegar a IGF-IR. Por lo anterior, se requiere de proteasas plasmáticas que degraden el complejo ternario, específicamente a ALS, y así formar un complejo binario que sea capaz de cruzar el endotelio vascular. La posterior proteólisis de IGFBP-3, y en general de las IGFBPs, por proteasas plasmáticas o tejido específicas libera a IGF-I y permite su señalización [58].

De manera general, se considera que IGFBP-1, IGFBP-3 e IGFBP-5 activan la señalización de IGF-I mientras que IGFBP-2, IGFBP-4 e IGFBP-6 la inhiben [62-63]. Además de las funciones anteriores, algunas de las IGFBPs tienen actividades independientes de IGF-I como son la inducción de la apoptosis e inhibición de la proliferación celular en algunos tumores en el caso de IGFBP-3.

3.4.3 Receptor de IGF-I (IGF-IR) y señalización.

El IGF-IR es un receptor transmembranal de tipo tirosina-cinasa que está compuesto de dos homodímeros (dos subunidades α y dos subunidades β) unidos por puentes disulfuro. La subunidad α (130-135kDa) se encuentra localizada extracelularmente y contiene los sitios de unión a IGFs, mientras que la subunidad β (90-97 kDa) atraviesa la membrana celular hasta llegar al citoplasma en donde se encuentra el dominio tirosina-cinasa [64-66]. IGF-IR es principalmente activado por IGF-I. Sin embargo también puede ser activado por IGF-II e insulina aunque con mucho menor afinidad (2-5 y 100-1000 veces menor afinidad respectivamente) [67]. Seguido de la unión de IGF-I, IGF-IR sufre un cambio conformacional que activa el dominio tirosina-cinasa, llevando a la autofosforilación de tirosinas específicas y proteínas de acoplamiento específicas que incluyen a la proteína Shc y al sustrato del receptor de insulina (IRS-1) [68]. De esta manera distintas cascadas de señalización son activadas (**Fig. 6**). En general, dos vías principales son activadas por la señalización de IGF-I/IGF-IR: 1) la fosforilación de IRS-1 activa a PI3K (fosfatidil inositol 3 cinasa), ésta a su vez

activa la ruta AKT-mTOR que lleva al aumento en la absorción de glucosa, síntesis de proteínas, supervivencia celular e inhibición de la apoptosis [69]; y 2) la fosforilación de la proteína Shc activa la vía RAS-RAF-ERK, relacionada a la diferenciación, migración y proliferación celular [70].

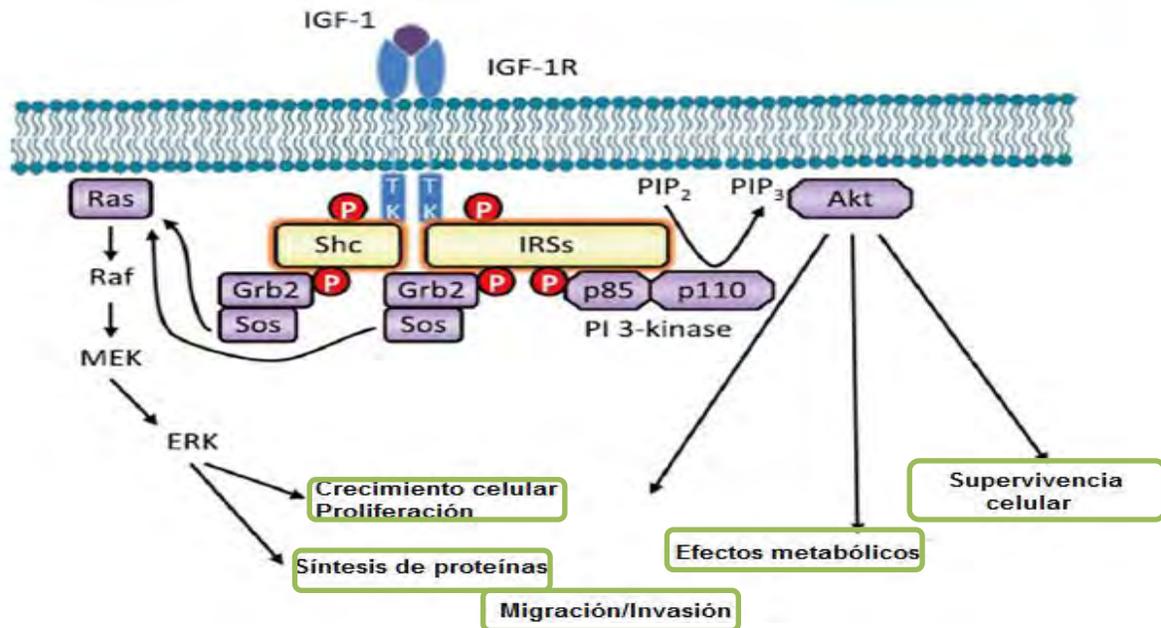


Figura 6. Rutas de señalización dependientes de IGF-1R. La unión de IGF-I o IGF-II promueve la actividad tirosina-cinasa intrínseca y la autofosforilación. La asociación de moléculas específicas induce la señalización principalmente a través de MAPK y PI3K. Tomada y modificada de [66].

3.4.4 Papel Fisiológico de IGF-I

IGF-I es un factor de crecimiento que tiene distintas funciones en el organismo. En el metabolismo de proteínas reduce la proteólisis y estimula su síntesis [71]. En el caso del músculo aumenta la masa muscular. IGF-I estimula la captación de glucosa periférica e inhibe la producción de glucosa hepática y la secreción de glucagon [70]. Por lo anterior, se considera que IGF-I tiene un efecto antidiabetogénico o hipoglucemiante parecido al de la insulina. Se piensa que este efecto de IGF-I tiene como objetivo contrarrestar la acción hiperglucemiante de la

GH y con ello lograr una situación de euglucemia. En el caso de la resistencia a la insulina, además de estimular el uso de glucosa por parte de los tejidos periféricos, IGF-I reduce la resistencia insulínica y disminuye la secreción de la hormona actuando sobre las células beta del páncreas [72]. IGF-I aumenta la síntesis de colágena en el hueso facilitando el transporte y la incorporación de L-prolina y contribuye a mantener la masa ósea. Posee efectos sobre los testículos [73] y aumenta la producción de testosterona, lo que al mismo tiempo contribuye a aumentar la masa ósea y muscular. Además, demuestra tener efectos en el intestino ya que en ratones transgénicos que sobreexpresan IGF-I la longitud y la masa de intestino delgado se encuentran aumentadas así como la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas del yeyuno [74]. También se sabe que tiene un efecto trófico sobre el sistema nervioso central, estimulando un aumento en el crecimiento neuronal, en el tamaño del cerebro y en el área cortical de ratones transgénicos con sobreexpresión cerebral de IGF-I [75] (**Figura 7**).

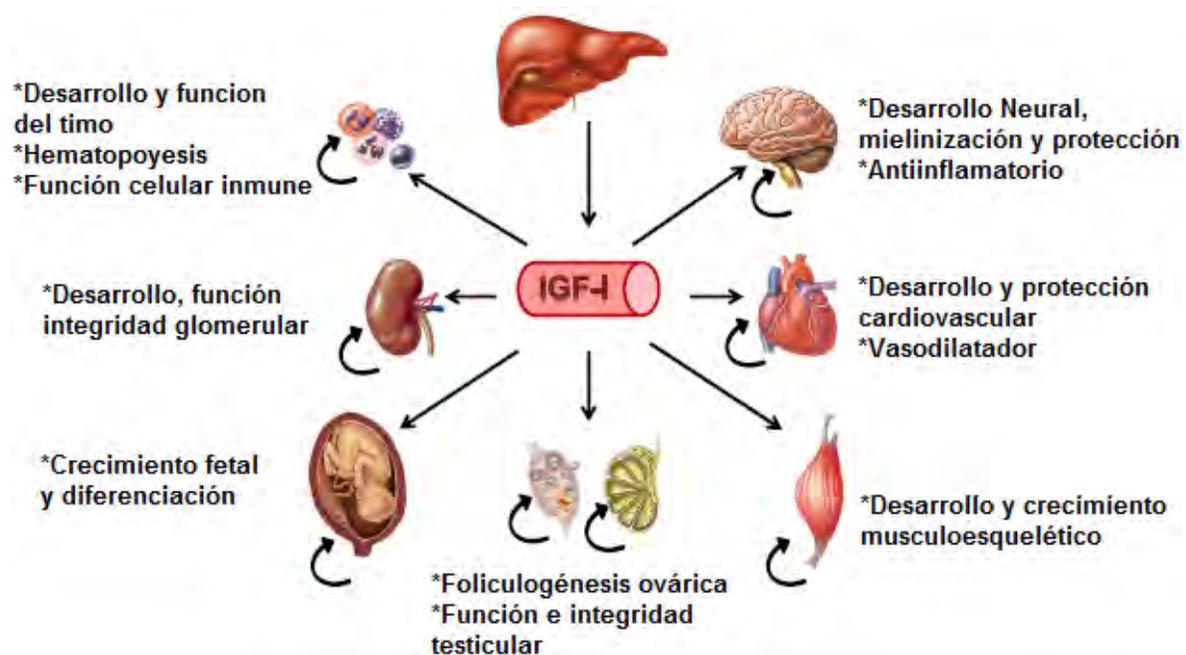


Figura 7. Papel fisiológico de IGF-I en el organismo. El hígado contribuye con 90% del IGF-I total del organismo. Sin embargo, cada órgano es capaz de producirlo para fines autócrinos. Tomada y modificada de [56].

3.4.5 IGF-I/IGF-IR en cirrosis hepática.

El papel de IGF-I en la patogénesis de la cirrosis hepática ha sido ampliamente estudiado. En pacientes con cirrosis hepática, el eje IGF se encuentra afectado y estas alteraciones se asocian con concentraciones de IGF-I en suero disminuidas. Las bajas concentraciones de IGF-I se asocian con complicaciones frecuentes de la cirrosis como son la desnutrición, resistencia a la insulina, osteopenia e hipogonadismo entre otras alteraciones [76-77]. Esta reducción en suero de las concentraciones de IGF-I se ha correlacionado no sólo con la presencia de cirrosis, sino con la severidad y el grado de disfunción hepática al presentarse concentraciones decrecientes en etapas avanzadas de la cirrosis [78]. La disminución de las concentraciones de IGF-I en la cirrosis hepática se atribuye a dos factores principales: 1) la disminución de los receptores de la GH que ha sido observada en el hígado cirrótico y 2) la deteriorada capacidad de síntesis por parte del hígado que se debe a la disfunción hepática y a la reducción de la masa hepatocelular que se presenta en la cirrosis descompensada.

En un estudio publicado en 2013 [79], pacientes hospitalizados por complicaciones de la cirrosis hepática presentaron niveles decrecientes de IGF-I e IGFBP-3 de acuerdo a la severidad de la enfermedad hepática crónica según la escala de Child-Pugh que asigna las clasificaciones A, B y C de acuerdo con criterios bioquímicos y la presencia o ausencia de complicaciones clínicas de la cirrosis. De esta manera, los pacientes que se encontraban en la clase C de la escala (enfermedad hepática crónica más severa) presentaron niveles significativamente menores que aquellos que se encontraban en la clasificación A. Resultados similares fueron reportados por Wu et al, quienes reportaron concentraciones séricas de IGF-I significativamente más bajas en pacientes con cirrosis cuando fueron comparados con un grupo control y donde se destaca que entre pacientes cirróticos, aquellos con disfunción hepática más severa, presentaban las concentraciones más bajas de IGF-I [80].

La participación de IGF-I en la cirrosis hepática también ha sido estudiada en modelos animales. En un modelo de inducción de cirrosis hepática en ratas por

administración de tioacetamida, no se observaron cambios tras 3 meses de administración del agente hepatotóxico a pesar de la presencia de cirrosis micronodular. Sin embargo, al generar una cirrosis macronodular (6 meses de administración de tioacetamida), se demostró una reducción significativa en la expresión del gen de IGF-I [81].

Con respecto a IGF-IR existen pocos estudios de su participación en la cirrosis hepática, y la situación de este receptor no es completamente clara, ya que mientras algunos autores reportan que IGF-IR se encuentra regulado positivamente, otros apoyan lo contrario [82]. La mayoría de los autores se han enfocado en su estudio durante el desarrollo y progresión del hepatocarcinoma. La señalización de IGF-IR es un regulador esencial para el crecimiento y el desarrollo, como se ha mencionado anteriormente. Datos de estudios epidemiológicos y modelos experimentales han demostrado la participación de este sistema en el desarrollo de diversos tipos de cáncer [83].

En el año 2010 se realizó una investigación en la que se estudiaron diversos mecanismos moleculares de la participación del sistema IGF en el desarrollo de HCC temprano en pacientes, y entre los cuales se determinó la activación de la señalización de IGF-IR. Como parte de los resultados se observó que este receptor se encontraba activado en 21.4% de las muestras de HCC pero en ninguna muestra del tejido cirrótico adyacente al tejido malignizado. Esta activación de IGF-IR fue correlacionada positivamente con los niveles del mRNA de IGF-II. Por lo anterior, se sugiere que IGF-II es el responsable para la activación de IGF-IR en el proceso de malignización de los hepatocitos [84].

3.4.6 Efectos de la administración de IGF-I en la cirrosis.

Se ha demostrado que IGF-I tiene un papel terapéutico en la cirrosis hepática humana. En un estudio piloto, la administración intravenosa de IGF-I recombinante (rhIGF-I) en pacientes con cirrosis hepática avanzada mejoró la funcionalidad del

hígado, lo cual fue observado mediante el aumento de las concentraciones de albúmina sérica [85].

Por otra parte, se ha demostrado que la administración de IGF-I expresado por vectores virales, antes de la inducción de cirrosis previene el desarrollo de la enfermedad en ratas [86]. Además, en un estudio en el que se presentaba cirrosis establecida en un modelo murino, se demostró que la administración de estos vectores virales que expresan IGF-I lleva a la completa reversión de la cirrosis hepática mediante el aumento en la expresión de moléculas hepatoprotectoras y antifibrogénicas como las metaloproteínas de matriz y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), así como mediante la disminución de factores profibrogénicos como TGF- β , CTGF y los TIMPs, entre otros [87].

Dado que IGF-I ejerce un efecto hepatoprotector y anti-inflamatorio, se ha considerado que su deficiencia durante la cirrosis hepática puede crear un microambiente intrahepático que permita a los hepatocitos la desdiferenciación y que se facilite el desarrollo de HCC. Lo contrario se ha visto en hígados con cirrosis en los que la expresión de IGF-I aumenta la diferenciación de los hepatocitos cirróticos y mejora su función.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las concentraciones en suero del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I) y sus proteínas transportadoras IGFBP-3 y la subunidad ácida lábil (ALS) se han visto reducidas en pacientes que cursan con cirrosis hepática establecida y disminuyen de acuerdo al grado de severidad de la misma. Por otro lado, la expresión del receptor del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-IR) se ha visto aumentada en los casos de hepatocarcinoma celular (HCC). Sin embargo, hay poca evidencia a cerca del comportamiento en la expresión de estas moléculas durante las etapas tempranas del proceso fibrogénico. Por lo anterior, el presente trabajo propone el estudio de la expresión de IGF-I e IGF-IR en la progresión del proceso de fibrosis hepática en un modelo murino.

5. HIPÓTESIS

La expresión génica de IGF-I, IGFBP-3 y ALS en hígado disminuirá progresivamente en las distintas etapas del proceso fibrogénico al igual que la proteína en suero, mientras que en el proceso de reversión se observará un aumento en la cantidad de mRNA y de proteína. Por otra parte la expresión de IGF-IR será mayor en la cirrosis con respecto a las etapas tempranas de la fibrosis.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Estudiar la expresión de IGF-I, IGFBP-3, ALS e IGF-IR durante el desarrollo de fibrosis inducida por tetracloruro de Carbono (CCl₄) en un modelo murino, así como durante el proceso de reversión de la fibrosis.

6.2 Objetivos particulares

- a) Estudio de la expresión de IGF-I, IGFBP-3, ALS e IGF-IR en tejido hepático de ratas.
- b) Cuantificación de IGF-I e IGFBP-3 en las muestras de suero de los distintos grupos.
- c) Análisis estadístico de la expresión de IGF-I, IGFBP-3, ALS e IGF-IR en tejido hepático de ratas, así como de la concentración sérica de IGF-I e IGFBP-3.

7. METODOLOGÍA

7.1 Inducción de cirrosis en un modelo murino.

Para establecer el modelo de cirrosis se contó con 6 grupos de ratas macho de la cepa Wistar de 250g ± 20g de peso y de 3 meses de edad. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, 75% HR y 23°C respectivamente. El protocolo se aprobó por el Comité de Ética en Investigación del Hospital General de México conforme a la Norma Oficial Mexicana **NOM-062-ZOO-1999**, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Para la inducción de la fibrosis hepática se administraron vía intraperitoneal dosis de 250 µL de CCl₄ al 33% v/v en aceite de oliva dos veces por semana para obtener diferentes etapas de daño fibrótico de acuerdo a la escala METAVIR en 6 distintos grupos. El esquema de administración para cada grupo se muestra en la **figura 8**.

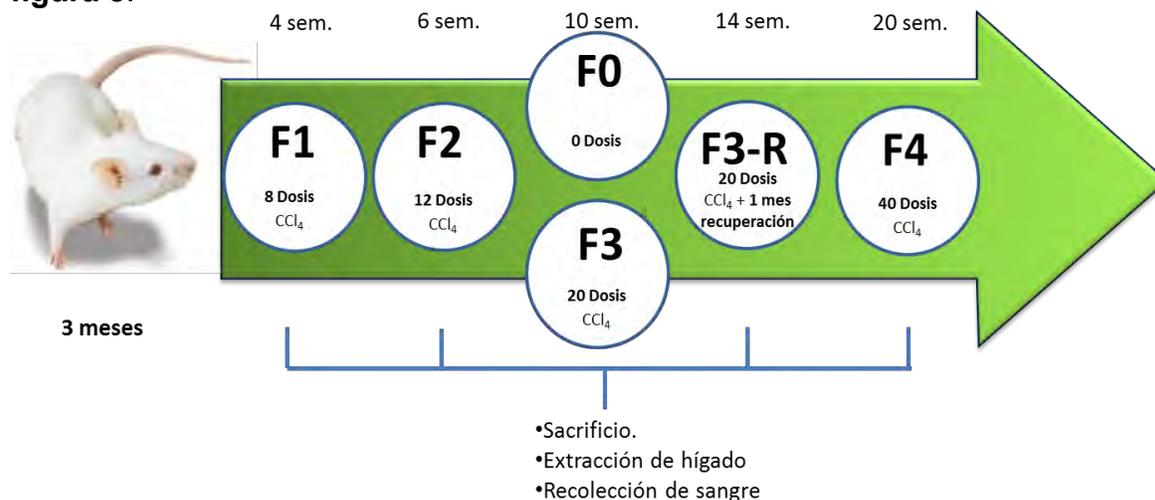


Figura 8. Esquema de administración de CCl₄. Las administraciones de CCl₄ se hicieron dos veces por semana hasta completar las dosis correspondientes.

7.2 Recolección de muestras y almacenamiento.

Los animales de cada grupo fueron sacrificados 3 días después de haber concluido el periodo de administración correspondiente. Se conservó sangre total

y tejido hepático del cual se conservaron 2 muestras que fueron congeladas y mantenidas a -70°C y una tercera muestra que fue fijada en paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4 para su posterior inclusión en parafina. Se obtuvo el suero mediante centrifugación y fue conservado a -70°C .

7.3 Histología

Las muestras de tejido hepático fijadas en paraformaldehído fueron incluidas en parafina y se realizaron 3 cortes histológicos de 5 micras por cada muestra para realizar 3 tinciones distintas: Hematoxilina y eosina (H-E), Tricrómica de Masson y Rojo de Sirio.

7.4 Extracción de RNA total e integridad

La extracción de RNA Total se llevó a cabo mediante el método de Trizol. Una parte del tejido hepático en congelación se homogenizó con 1 ml de reactivo TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando un Polytron PT 1300 D (Kinematica AG). El homogenizado se transfirió a tubos eppendorf de 1,5mL y se añadieron 200µl de cloroformo. El homogenizado se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C usando una centrifuga 5417 R (Eppendorf). La fase superior (fase orgánica) fue conservada y transferida a tubos eppendorf de 1.5mL, previamente tratados con RNase Zap (Ambion), a la cual se le agregaron 500µl de alcohol isopropílico para precipitar el RNA total. Las muestras se almacenaron por una noche a -20°C y posteriormente fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C . Se descartó el sobrenadante y el botón se trató con 1ml de EtOH al 75% v/v en agua DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich). El homogenizado se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C . El sobrenadante fue descartado, mientras que el botón se resuspendió en 100µl de agua libre de RNasas (H_2O + DEPC 0.1%) y se almacenó a -80°C .

La integridad del RNA se determinó mediante una electroforesis en gel de Agarosa al 1% utilizando Bromuro de Etidio como revelador.

7.5 Cuantificación de RNA total

Del RNA total extraído, se realizaron diluciones 1:100 en agua para cada muestra y la absorbancia fue determinada mediante un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter) a una longitud de onda de 260nm. Con la absorbancia obtenida se calculó la concentración de RNA total y a partir de ésta se determinó la dilución a realizar para cada muestra con el fin de obtener una concentración de 10 µg/µl de RNA total en cada caso.

7.6 Obtención de DNA complementario (cDNA)

A partir de cada muestra de RNA con una concentración de 10 µg/µl se realizó la síntesis de cDNA mediante una rt-PCR utilizando el Kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las reacciones se realizaron de acuerdo al inserto. Brevemente, en un tubo de 0.2 mL se colocaron 5 µl de amortiguador 5X (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15mM de MgCl₂ y 0.1 M de DTT), 1 µl de oligo dT (500 µg/ml), 1.25 µl de dNTP mix 10 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 10 µg de RNA total y 1 µl de la enzima M-MLV RT (200 unidades). Se agregó agua libre de RNasas para obtener un volumen de reacción final de 25 µL. La reacción se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp® PCR system 2700 (Applied Biosystems).

7.7 Diseño de primers para IGF-I e IGF-IR

Para el diseño de los oligonucleótidos a utilizar en la amplificación de los genes de interés se llevó a cabo una búsqueda de los cDNA de los genes de IGF-I, IGFBP-3, ALS e IGF-IR en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y posteriormente se utilizó el programa Primer 3 (versión 0.4.0) para la obtención de las secuencias de los oligonucleótidos. Además se usó el gen constitutivo 18S como un control endógeno. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la **tabla 2**.

Gen	Cadena	Secuencia	Tamaño del Producto
IGF-I	Forward	TGGTGGACGCTCTTCAGTTC	123 pb
	Reverse	TCCGGAAGCAACACTCATCC	
IGF-IR	Forward	TCCGTGGCTGGAACTCTTC	270 pb
	Reverse	TGGTCTTCTCACACATGGGC	
IGFBP-3	Forward	TGCTGGGAGTGTGGAAAGC	330 pb
	Reverse	TTGGAAGGGCGACACTGTTT	
ALS	Forward	CAGAAGCTGTACCTGGACCG	392 pb
	Reverse	CTCAGACAGTTGCCGGAGAG	
18S	Forward	CGCGGTTCTATTTTGTGGT	219 pb
	Reverse	GGTCGGCATCGTTTATGGTC	

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos utilizados.

7.8 Estandarización de PCR, amplificación y electroforesis

Para estandarizar las condiciones en las que se realizó la PCR para amplificar cada gen, se realizaron diversos ensayos partiendo de un “pool” del cDNA de muestras control sintetizado previamente. Se probaron diferentes temperaturas (60°C, 61°C y 62°C) y diferente número de ciclos (25, 30, 35, 40 y 45 ciclos) para cada gen. Las condiciones finales para amplificar cada gen se describen en la **tabla 3**.

Gen	Cantidad de cDNA	Temperatura de alineamiento	Numero de Ciclos
IGF-I	1 µl	60°C	35
IGF-IR	1 µl	60°C	35
IGFBP-3	1 µl	61°C	30
ALS	1 µl	61°C	30
18S	1 µl	60°C	28

Tabla 3. Condiciones finales de PCR para cada gen.

Una vez establecidas las condiciones de PCR, se llevó a cabo la reacción de cada gen para cada muestra. Brevemente, en un tubo de 0.2 mL se colocaron 2.5 µl de amortiguador 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl; 100 µg/ml gelatina, 1.5 mg/ml BSA; 1% Tritón X100), 2.5 µl de MgCl₂ (30mM), 1 µl de Oligo Forward (20mM), 1 µl Oligo Reverse (20mM), 1 µl de dNTP mix 10 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1 µl de cDNA (10 µg/µl) y 0.4 µl de la enzima Amplificasa® (5U/µl). Se agregó agua libre de RNasas para obtener un volumen de reacción final de 25 µL. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Veriti® 96-Well (Applied Biosystems).

A los productos de PCR se les agregaron 5 µL de Buffer de Carga. La mezcla fue homogenizada en un Vórtex y 15 µL fueron cargados en un gel de Agarosa 1.2% con bromuro de Etidio incorporado que se corrió en una cámara de electroforesis con amortiguador TBE 1X (Tris Base 90 mM, ácido bórico mM, EDTA 2mM pH 8.0) a 90 V. Las bandas de los productos de PCR fueron reveladas con luz UV (302 nm) en un trasiluminador acondicionado a una cámara digital (Kodak)

7.9 Densitometría Óptica

La densitometría óptica se realizó utilizando el programa Image J (NIH, EUA). Para ello se comparó la intensidad de las bandas de cada gen estudiado (IGF-I, IGFBP-3, ALS e IGF-IR) con la de la banda correspondiente al gen 18S.

7.10 Extracción de Proteínas y Cuantificación de IGF-I en tejido y suero

7.10.1 Extracción

Del tejido en congelación se utilizó una porción de 100 mg para la extracción de proteínas. Para ello, se sometió cada muestra a ciclos de congelación y descongelación (5 ciclos) para romper la membrana celular. Una vez concluidos los ciclos se agregaron 200 µL de PBS 1X para homogenizar el tejido. El

homogenizado se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recolectado y utilizado para la cuantificación de IGF-I en tejido.

Se realizó la cuantificación de la proteína total mediante el método de Bradford y se observó la integridad mediante un gel de poliacrilamida (10/4%) teñido con Azul de Comassie.

7.10.2 Cuantificación de IGF-I

La cuantificación de IGF-I en tejido se realizó a partir de una dilución 1:24 del sobrenadante obtenido en la extracción de proteínas. Además se cuantificó IGF-I en suero a partir de una dilución 1:1000 de las muestras de suero almacenadas previamente. La determinación se llevó a cabo utilizando el estuche comercial Quantikine® ELISA Mouse/Rat IGF-I Immunoassay (R&D Systems, MN Catálogo MG100). El procedimiento se realizó de la siguiente manera: Se agregaron 50µL del diluyente calibrador RD5-38 a cada pozo de la placa (96 pozos). Al mismo tiempo se agregaron 50 µL del estándar, control o muestra correspondiente en cada pozo. La placa fue cubierta e incubada por 2h a temperatura ambiente en un agitador de microplaca IKA® MSI *Minishaker* a 500 ± 50 rpm. Enseguida, los pozos se lavaron con *Wash Buffer*, el proceso de lavado se repitió 5 veces. Al finalizar los ciclos de lavado se agregaron 100 µL del conjugado Mouse/Rat IGF-I a los 96 pozos. La placa fue cubierta e incubada 2h a temperatura ambiente en el agitador de microplaca. Se repitieron los 5 ciclos de lavado y se añadieron 100 µL de la Solución Sustrato (Reactivo de color A + Reactivo de color B) a cada pozo. La placa se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. Finalmente se añadieron 100 µL de la Solución de paro a los 96 pozos. Todas las muestras se hicieron por duplicado. La densidad óptica de cada pozo se determinó utilizando un lector de microplaca a 450nm.

7.11 Cuantificación de IGFBP-3 en 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 proteínicos. Este método se efectuó para cuantificar IGFBP-3 en las muestras proteínicas obtenidas de los diferentes grupos del modelo murino a partir del tejido hepático.

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con previa preparación del protocolo y de la curva estándar. Brevemente: se agregaron 200 μ L de *Assay Buffer* en cada pozo, agitándola por 10 minutos a temperatura ambiente y decantándola al final de este tiempo, después se añadieron 25 μ L de *Assay Buffer* en cada pozo de los estándares, controles y muestras, 50 μ L de *Assay Buffer* a los pozos del blanco y 25 μ L de los estándares, controles o muestra a los pozos correspondientes. Finalmente se agregaron 25 μ L de las esferas a cada pozo. La placa 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 μ L de *Wash Buffer*, se retiró el bloque magnético y la placa se agitó durante 1 minuto. Se volvió a poner la placa en el bloque durante 1 minuto y por último se aspiró el contenido de cada pozo. El proceso de lavado se repitió 2 veces para un total de tres lavados como se indica en el inserto. Al finalizar los lavados, se agregaron 500 μ L del anticuerpo de detección en cada pozo y la placa fue incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se adicionaron 50 μ L de estreptavidina-ficoeritrina en cada pozo y se volvió a incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 3 lavados (como se describió anteriormente) y se agregaron 100 μ L de Sheath Fluid en cada pozo para realizar la lectura de la placa en el equipo Luminex 200[®] (BioRad, Hercules, CA).

La cantidad de proteína de IGFBP-3 se calculó con base en la curva estándar (**Figura 9**). La sensibilidad del ensayo fue de 0.04 ng/mL y los valores de controles de calidad del ensayo estuvieron dentro del rango esperado (**Tabla 4**).

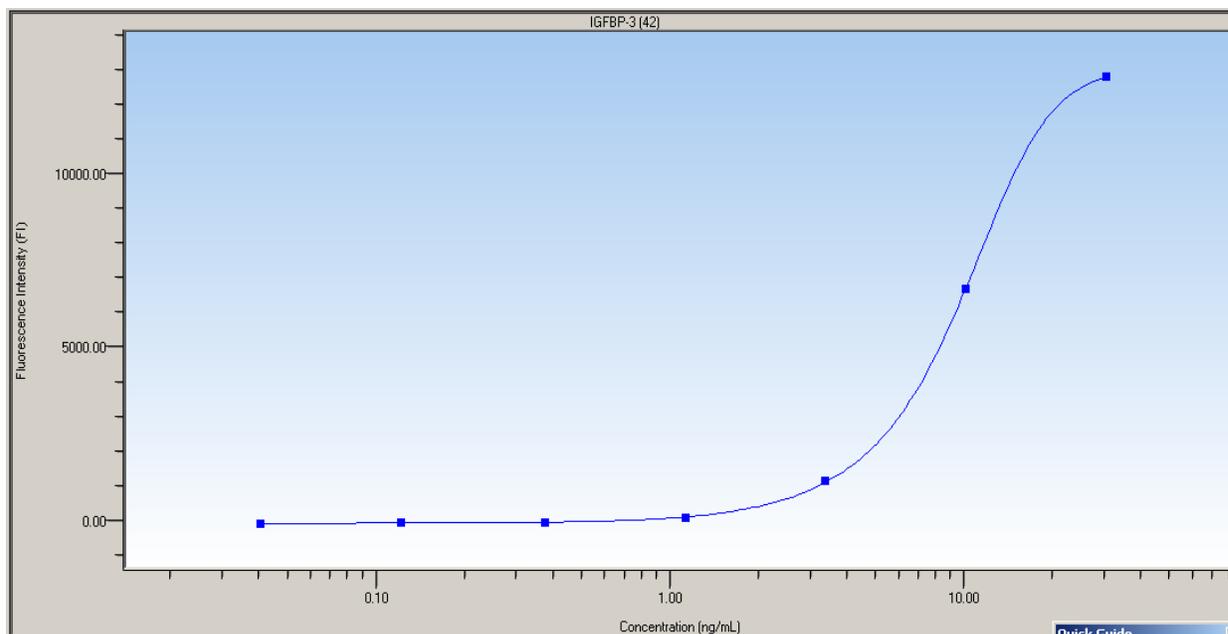


Figura 9. Curva estándar del arreglo en suspensión para IGFBP-3. La gráfica muestra la fluorescencia de los estándares utilizados para realizar la curva estándar a partir de la cual se obtuvieron las concentraciones de IGFBP-3 en las muestras de proteína del tejido hepático.

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

Tabla 4. Valores esperados y valores obtenidos de los controles para la cuantificación de IGFBP-3

7.12 Análisis Estadístico

Se realizó una ANOVA de una vía para comparar diferencias entre los grupos F0, F1, F2, F3 y F4. Además se realizó una t de student entre el grupo F0 y el grupo F3-R y entre este último y el grupo F3. Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 6. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

8. RESULTADOS

8.1 Inducción de la fibrosis

Como primer objetivo del trabajo se planteó la inducción de distintos grados de fibrosis en ratas mediante la administración de un agente hepatotóxico, en este caso se utilizó CCl_4 . Al terminar el esquema de administración (20 semanas) se sacrificaron las ratas y se pudo observar un daño del hígado a nivel macroscópico, que fue mayor de acuerdo al número de administraciones realizadas (**Figura 10**). La imagen A muestra las características de un hígado sano: color rojo, brillante y liso. En la imagen B se muestra un hígado correspondiente a una etapa de fibrosis F3 en el que se aprecia una coloración opaca así como un cambio en la textura del tejido. Finalmente, en la imagen C se observa un hígado en etapa F4 (cirrosis) con un daño más severo, bordes redondeados, textura más rugosa y la presencia de adherencias (señaladas con flechas verdes) entre la superficie hepática y la pared abdominal.

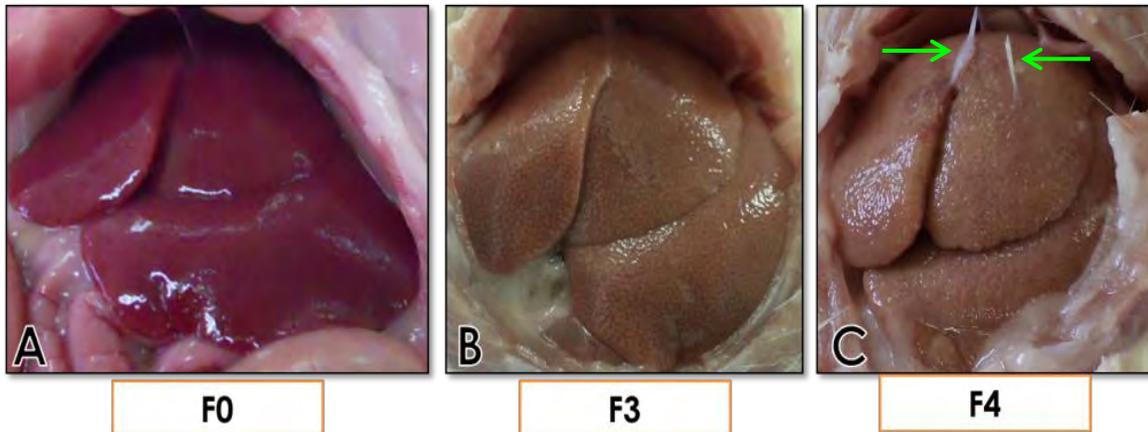


Figura 10. Características macroscópicas del tejido hepático. Tejido hepático al momento de la toma de muestra. **A:** Hígado control sin ninguna administración de CCl_4 . **B:** Hígado con 20 administraciones de CCl_4 correspondiente a una fibrosis F3. **C:** Hígado con 40 administraciones de CCl_4 correspondientes a una etapa F4 (cirrosis) en el que se observa la presencia de adherencias (flechas verdes).

8.2 Clasificación Histológica

Para la confirmación microscópica del grado de fibrosis generado en cada etapa de administración de CCl_4 , se utilizaron las tinciones de Hematoxilina y Eosina (H-E), tricrómica de Masson y la tinción de Rojo de Sirio.

En la tinción H-E se permite visualizar la estructura del tejido y a las células de una manera individualizada, la hematoxilina tiñe las estructuras ácidas de una célula de color azul como el caso del núcleo, mientras que la eosina tiñe los componentes básicos, como el citoplasma, en tonos de color rosa (**Figura 11**).

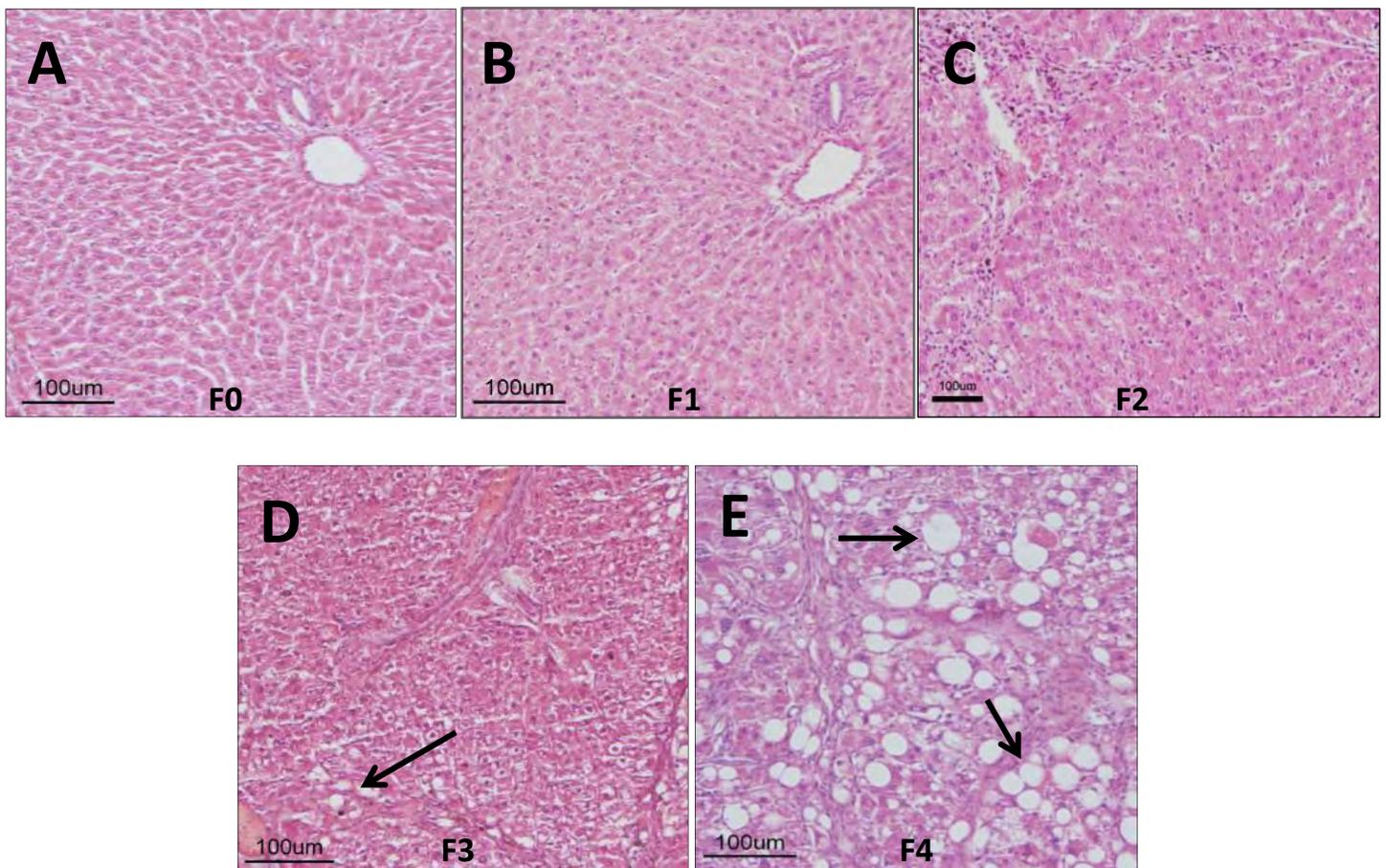


Figura 11. Tinción de H-E para la evaluación de la morfología del tejido hepático. Muestras representativas de los distintos grupos. **A:** Grupo control (F0). **B:** 8 dosis de CCl_4 (F1). **C:** 12 dosis CCl_4 (F2). **D:** 20 dosis CCl_4 (F3). **E:** 40 dosis de CCl_4 (F4). Conforme avanza el daño se puede ver una desorganización en la estructura hepática y acumulación de esteatosis que se observa como estructuras ovaladas de color blanco (flechas negras).

La segunda tinción realizada fue la tinción tricrómica de Masson. Esta técnica emplea tres colorantes que permiten diferenciar el núcleo celular que es teñido de lila, el citoplasma de color rosa y las fibras de colágena tipo 1 que se tiñen de color azul (**Figura 12**). Finalmente se realizó una tinción de Rojo de Sirio que a pesar de no ser específica para fibras de colágena proporciona una tinción selectiva para éstas y que junto con el uso de un microscopio de polarización hace más evidente la presencia de éstas fibras (**Figura 13**).

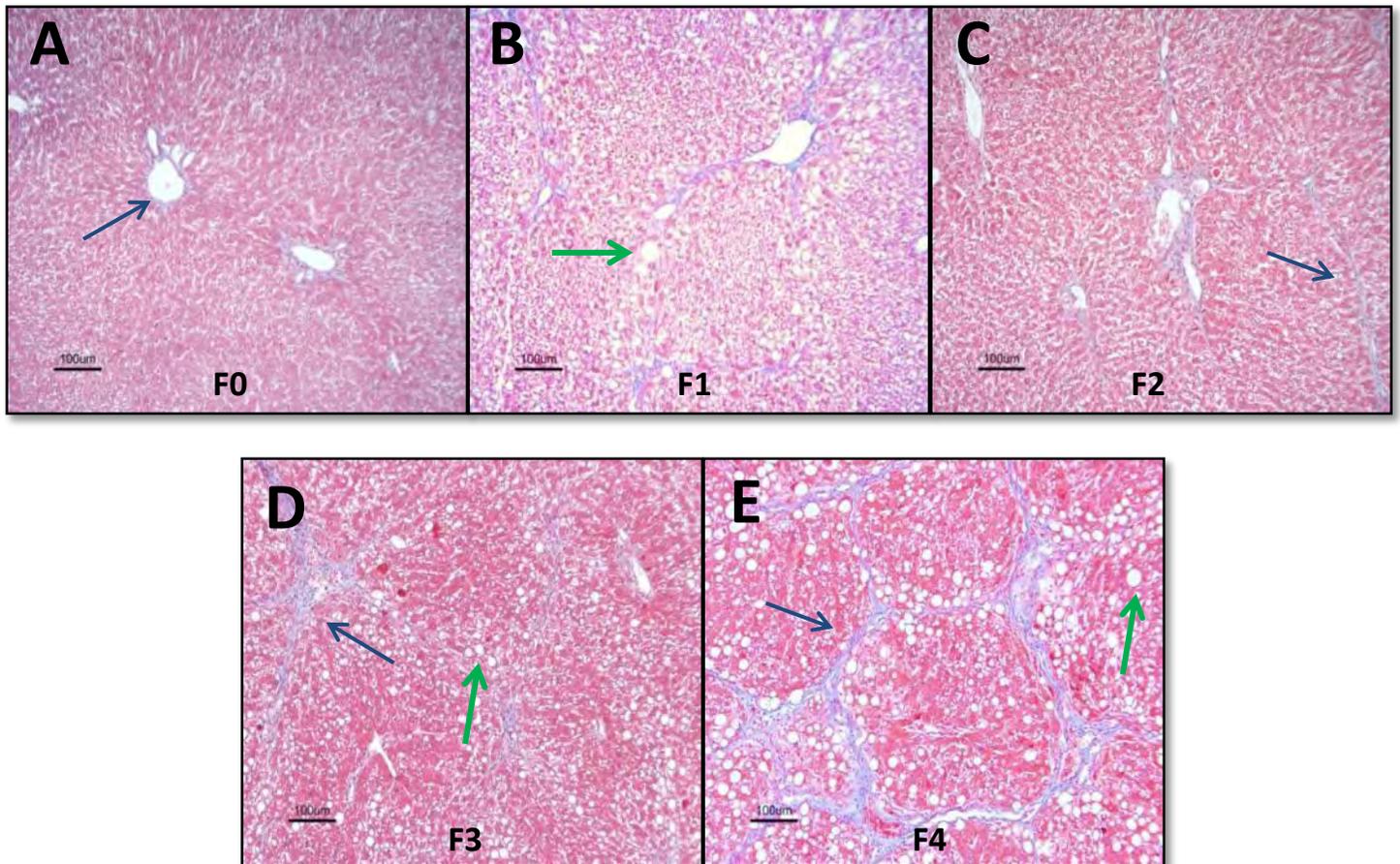


Figura 12. Tinción de Masson para la evaluación de la fibrosis hepática. Conforme avanza el daño se puede observar la formación de fibras más largas de colágena en F2 (**C**) y que se hacen más gruesas en F3 (**D**) hasta la formación de nódulos (característicos de la cirrosis) en F4 (**E**) (flechas azules). Adicional al aumento de colágena, se puede observar la pérdida de la organización natural de las células hepáticas y el aumento en la acumulación de esteatosis (flechas verdes).

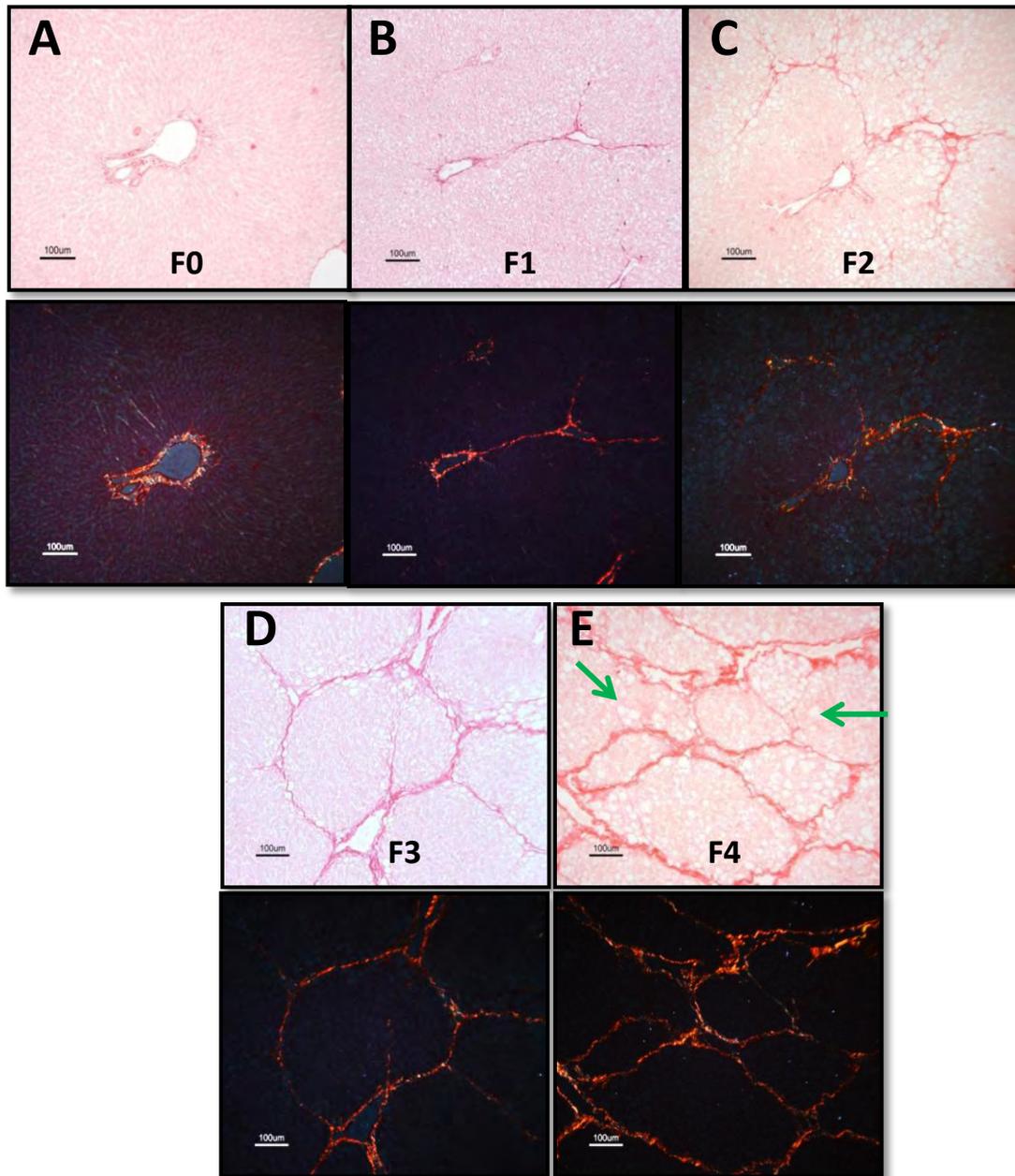


Figura 13. Tinción de Rojo de Sirio. Al hacer incidir luz polarizada sobre la muestra con tinción de rojo de sirio se permite visualizar únicamente las fibras de colágena debido a la capacidad de refringencia de dicha proteína. Se observa que la colágena tipo I es la más abundante al refringir en colores naranja-rojo. En F0 (**A**) se muestra la presencia de colágena únicamente alrededor de los vasos y que es normal en un hígado sano. Con el progreso en la etapa de fibrosis se puede observar aumento en la acumulación de MEC hasta la formación de los nódulos de regeneración en F4 (**E**). La esteatosis también es visible en esta tinción (flechas verdes).

8.3 Expresión de IGF-I en el progreso de la fibrosis.

Para determinar el patrón de expresión de IGF-I en las distintas etapas de la fibrosis, se realizó una PCR y la expresión del gen de IGF-I se normalizó con la expresión del gen 18S (**Figura 14**). Los resultados indican que hay una disminución estadísticamente significativa en la expresión de IGF-I en la etapa que corresponde a la cirrosis (F4) comparada con el grupo control y F1 (F0 = 1.069 ± 0.189 ; F1 = 1.106 ± 0.182 ; F2 = 1.017 ± 0.174 ; F3 = 1.015 ± 0.174 ; F4 = 0.815 ± 0.086 DO). No se observó diferencia entre los otros grupos y el control.

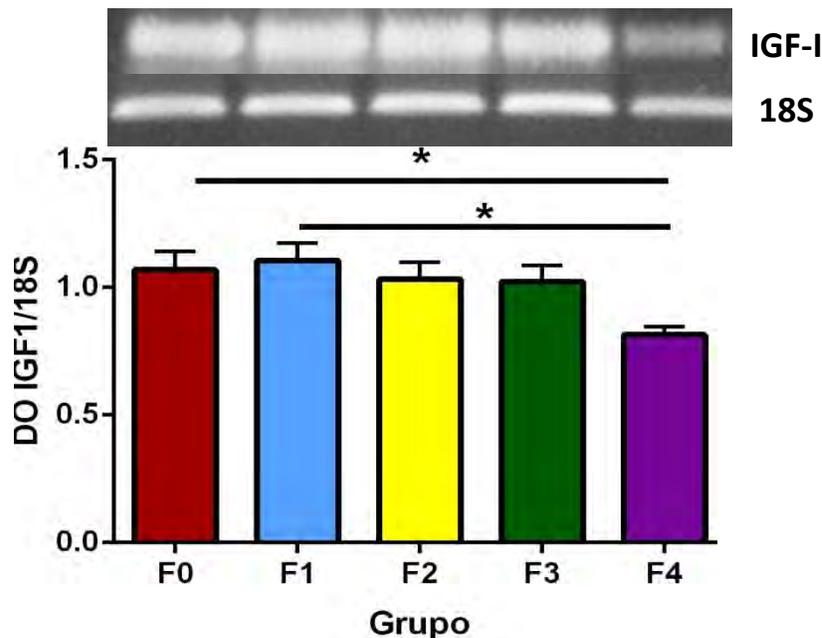


Figura 14. Expresión de IGF-I en las distintas etapas de fibrosis hepática. Se muestra la expresión de IGF-I en distintas etapas de la fibrosis. La expresión de IGF-I se normalizó con la del gen 18S. Los resultados se presentan como la Media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Bonferroni para comparar entre diferentes grupos.

n=6.DO = densidad óptica. * = $p < 0.05$.

8.4 Expresión de IGF-IR en el progreso de la fibrosis.

Se estudió la expresión de IGF-IR en el proceso fibrogénico y la cirrosis (**Figura 15**) ya que se sabe que esta última es el principal factor de riesgo para el desarrollo de HCC en el que se ha visto que la expresión de este receptor se encuentra aumentada. Sin embargo, los datos sobre la expresión de IGF-IR en la

cirrosis y las etapas de fibrosis previas no son claros. Los resultados obtenidos muestran que no hay cambios en ninguna de las etapas del desarrollo de la fibrosis hepática con respecto al grupo control (F0 = 0.738 ± 0.222 ; F1 = 0.676 ± 0.177 ; F2 = 0.665 ± 0.184 ; F3 = 0.652 ± 0.186 ; F4 = 0.722 ± 0.189 DO).

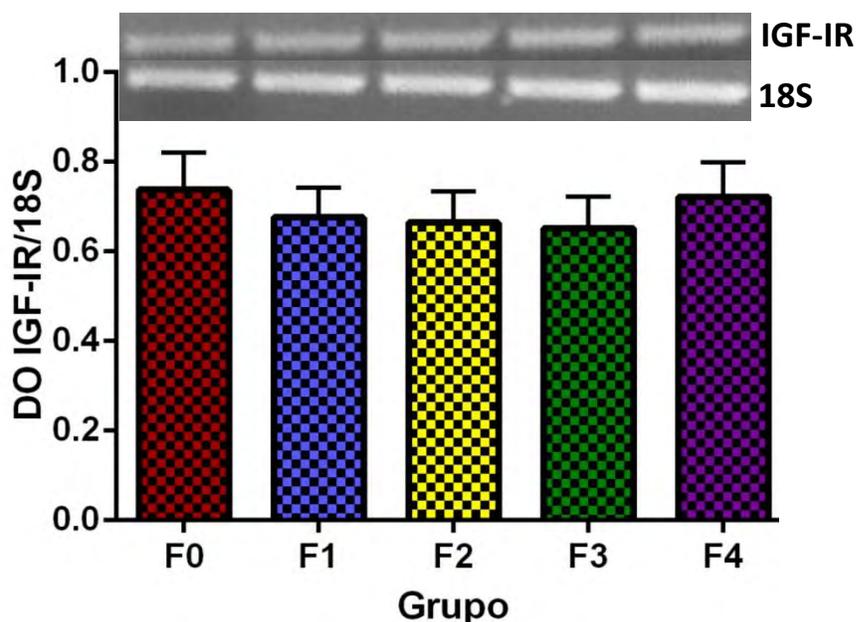


Figura 15. Expresión de IGF-IR en las distintas etapas de fibrosis hepática. Se muestra la expresión de IGF-I en distintas etapas de la fibrosis. La expresión de IGF-IR se normalizó con la del gen 18S. Los resultados se presentan como la Media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Bonferroni para comparar entre diferentes grupos
n=6.DO = densidad óptica.

8.5 Expresión de IGFBP-3 y ALS en el progreso de la fibrosis.

En este trabajo se determinó el nivel de expresión de IGFBP-3 (**Figura 16**), principal proteína transportadora de IGF-I, en las distintas etapas de fibrosis hepática ya que se han reportado concentraciones en suero disminuidas durante la cirrosis. Además se determinó la expresión de ALS (**Figura 17**), proteína que junto con IGF-I e IGFBP-3 forma un complejo ternario que prolonga el tiempo de vida media de IGF-I y regula su biodisponibilidad. No se observaron cambios en la expresión de IGFBP-3 o ALS en ninguna de las etapas del proceso fibrogénico.

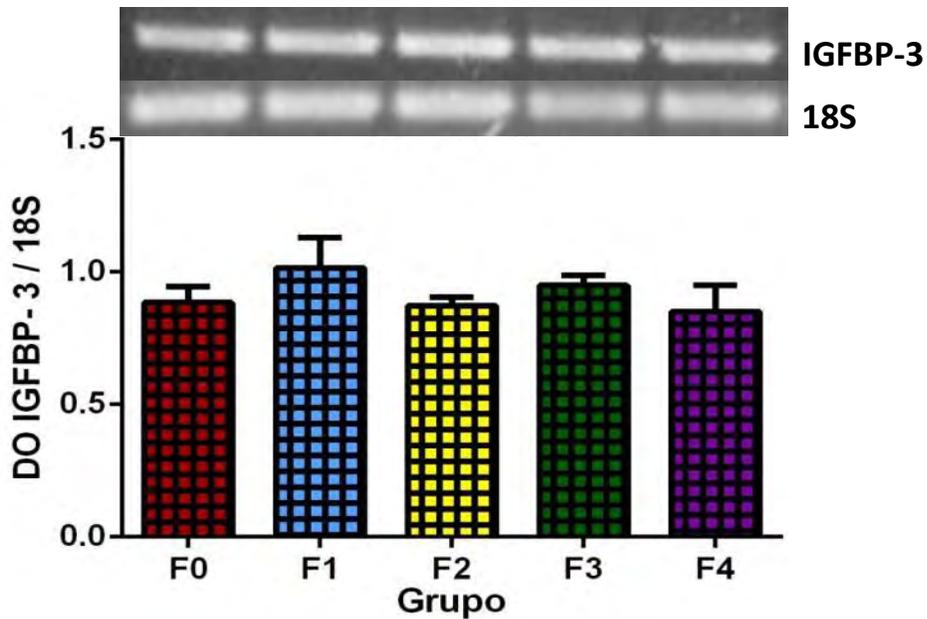


Figura 16. Expresión de IGFBP-3 en las distintas etapas de fibrosis hepática. Se muestra la expresión de IGFBP-3 en distintas etapas de la fibrosis. La expresión de IGFBP-3 se normalizó con la del gen 18S. Los resultados se presentan como la media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Bonferroni para comparar entre diferentes grupos.

n=6.DO = densidad óptica.

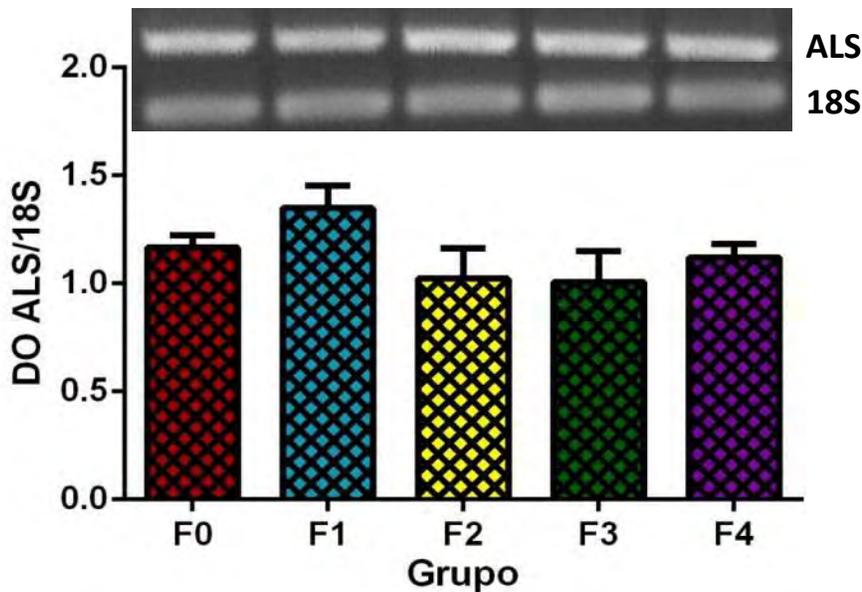


Figura 17. Expresión de ALS en las distintas etapas de fibrosis hepática. Se muestra la expresión de ALS en distintas etapas de la fibrosis. La expresión de ALS se normalizó con la del gen 18S. Los resultados se presentan como la media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Bonferroni para comparar entre diferentes grupos.

n=6.DO = densidad óptica.

8.6 Cantidad de proteína IGF-I en tejido e IGF-I en suero.

Las concentraciones de IGF-I en suero se han visto reducidas en pacientes con cirrosis descompensada. Sin embargo, no hay estudios definitivos sobre estas concentraciones en el proceso fibrogénico que precede a la cirrosis. En este trabajo se determinaron las concentraciones de IGF-I en suero y los resultados indican que no hay diferencias en las concentraciones séricas de IGF-I con respecto al control (**Figura 18**) (F0= 1103.2 ± 217.8341; F1= 1470± 344.1657; F2= 1299.75 ± 329.1407; F3= 1548 ± 366.7697; F4= 1625 ± 148.4363). La cantidad de IGF-I en tejido hepático (**Figura 19**) permanece constante en las distintas etapas de fibrosis (F0= 3.4237 ± 0.3316; F1= 3.4327 ± 1.3450; F2= 2.8949 ± 0.1807; F3= 2.7758 ± 1.1312; F4= 3.2112 ± 1.0470

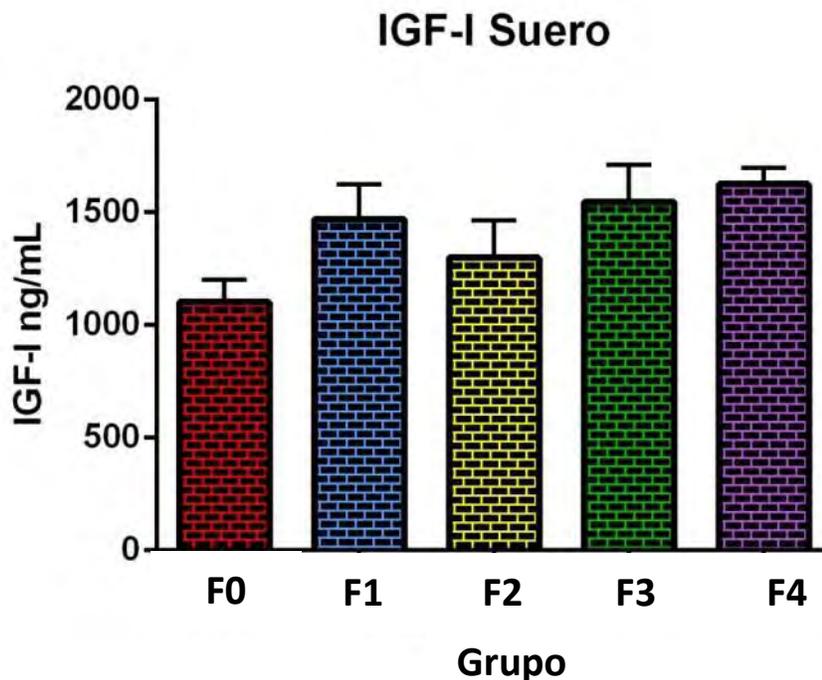


Figura 18. Concentraciones séricas de IGF-I en las distintas etapas de fibrosis hepática. Se muestra la concentración de IGF-I en distintas etapas de la fibrosis. Los resultados se presentan como la Media ± EEM. Se realizó una ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Bonferroni para comparar entre diferentes grupos. n=6

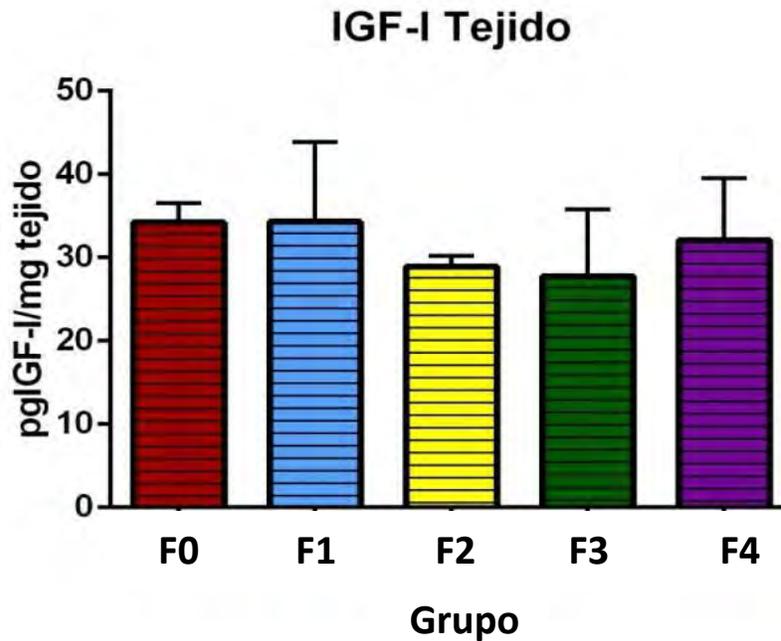


Figura 19. Cantidad de IGF-I en tejido hepático en las distintas etapas de fibrosis hepática.

Se muestra la cantidad de IGF-I por cada mg de tejido hepático en las distintas etapas de la fibrosis. Los resultados se presentan como la Media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Bonferroni para comparar entre diferentes grupos. n=6

8.7 Cantidad de proteína IGFBP-3 en tejido.

Al igual que IGF-I, la cantidad de proteína IGFBP-3 en suero se ha visto reducida en pacientes con cirrosis descompensada. En este caso se determinó la cantidad de IGFBP-3 en tejido. Los resultados indican una disminución de la cantidad de proteína en tejido durante la cirrosis (F4) con respecto a F1 (F0= 43.17 \pm 4.77; F1= 48.04 \pm 15.12; F2= 44.45 \pm 16.04; F3= 39.62 \pm 11.23; F4= 29.82 \pm 9.62) (Figura 20).

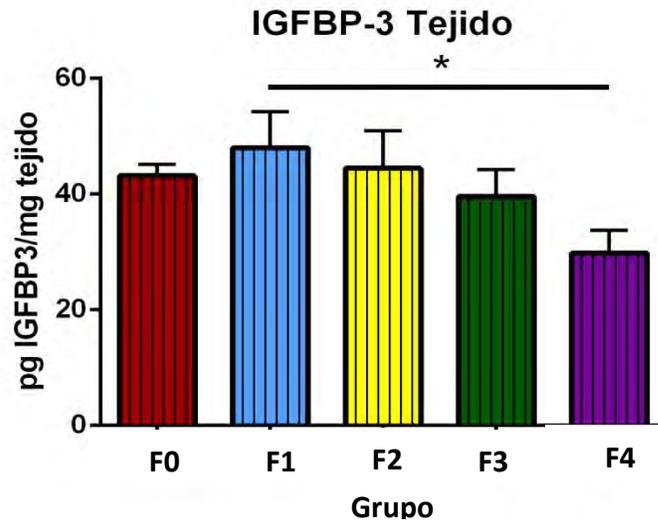


Figura 20. Cantidad de IGFBP-3 en tejido hepático en las distintas etapas de fibrosis hepática. Se muestra la cantidad de IGFBP-3 por cada mg de tejido hepático en las distintas etapas de la fibrosis. Los resultados se presentan como la Media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Bonferroni para comparar entre diferentes grupos. n=6

8.8 Reversión del proceso fibrogénico.

Además de evaluar la fibrosis hepática inducida por el CCl_4 , también se estudió el proceso de reversión de este daño en el hígado. Para ello, a un grupo al que se le administraron 20 dosis del agente hepatotóxico se le permitió una recuperación por un periodo de un mes, tiempo al cual se tomaron las muestras correspondientes. Los resultados obtenidos en este grupo (F3-R) se compararon con aquellos del grupo F3. Macroscópicamente se pudo observar una mejoría en la apariencia del hígado en el grupo F3-R comparada con F3 (**Figura 21**).

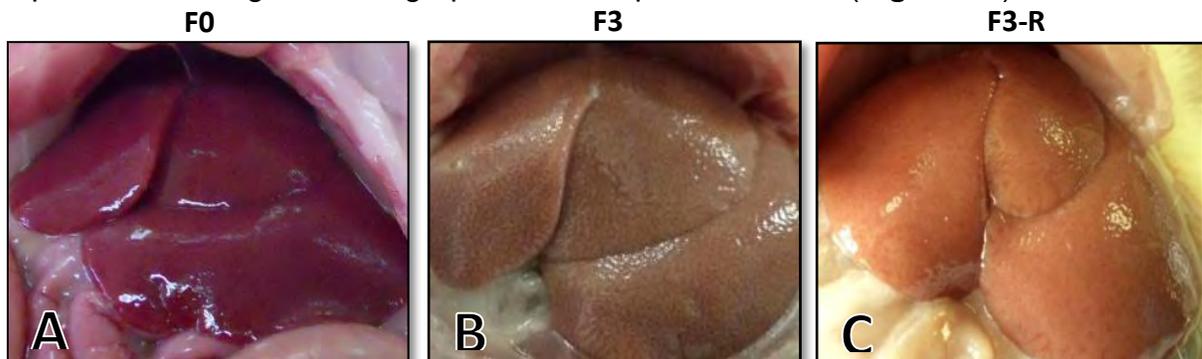


Figura 21. Características macroscópicas del tejido hepático. Tejido hepático al momento de la toma de muestra. A: Hígado control sin ninguna administración de CCl_4 (F0). B: Hígado con 20 administraciones de CCl_4 correspondiente a una fibrosis F3. C: Hígado con 20 administraciones de CCl_4 y un mes de recuperación (F3-R).

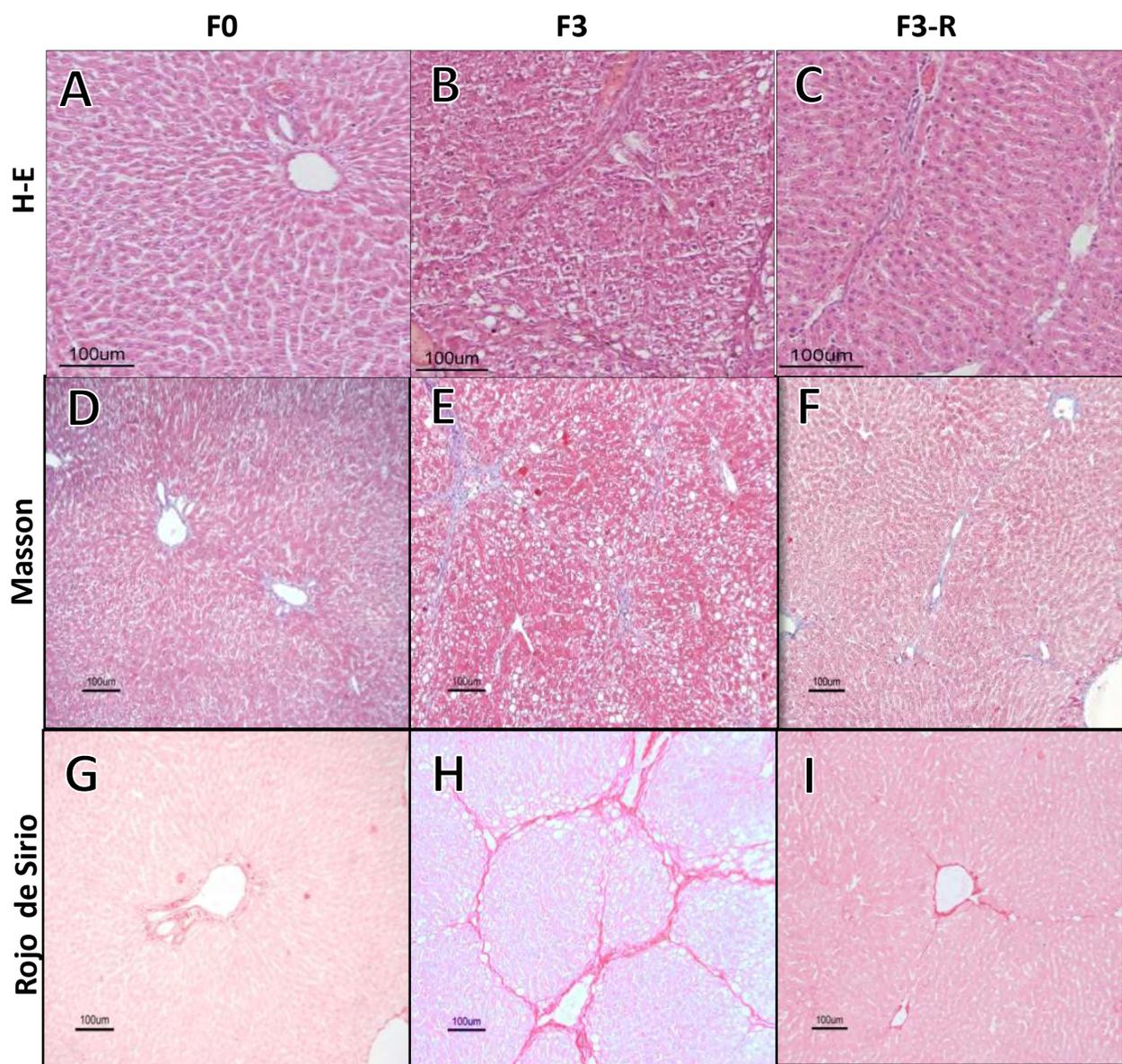


Figura 22. Tinciones histológicas de muestras representativas del proceso de reversión. Se muestra la tinción H-E (A-C), Tricrómica de Masson (D-F) y rojo de Sirio (G-I). **F0:** Hígado control sin ninguna administración de CCl₄. **F3:** Hígado con 20 administraciones de CCl₄. **F3-R:** Hígado con 20 administraciones de CCl₄ y un mes de recuperación.

En las tinciones histológicas se observó una reversión del proceso fibrogénico. Se puede observar una reorganización de la estructura hepática en F3-R (**Figura 22 C, F e I**) con respecto a F3. Además, la tinción de Masson y la de rojo de Sirio muestran una disminución en la acumulación de colágena en el grupo F3-R al ser comparado con el grupo F3 (**Figura 22 F e I**).

También se estudió la expresión de IGF-1 (**Figura 23-A**), así como la cantidad de proteína en tejido y suero (**Figura 23-B y C** respectivamente) además de su receptor IGF-IR (**Figura 23-D**). En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas entre el grupo F3-R y el grupo F3 o F0.

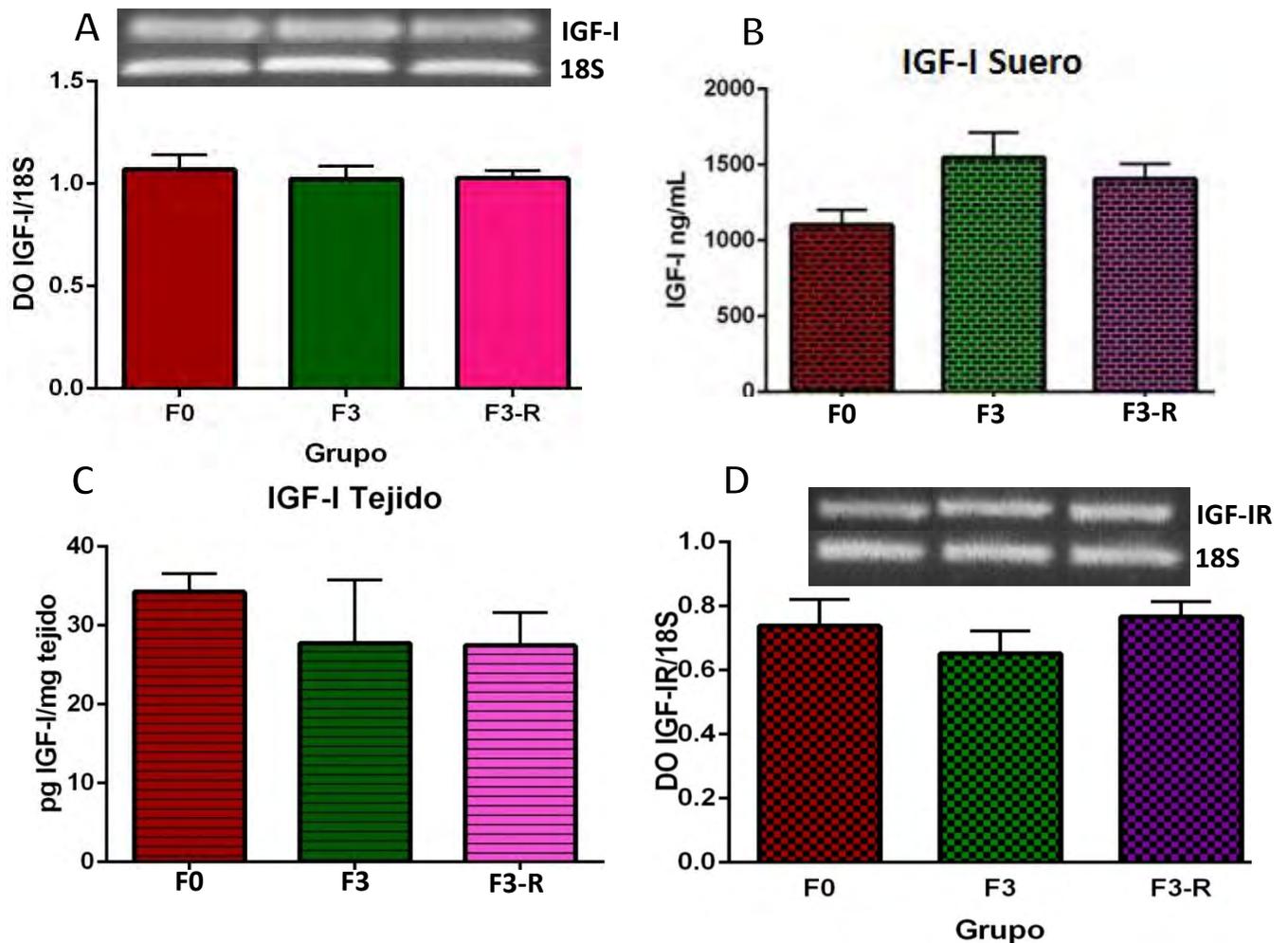


Figura 23. IGF-I e IGF-IR durante la reversión del proceso fibrogénico. A: Expresión de IGF-I. B: Proteína sérica IGF-I. C: Proteína IGF-I en tejido. D: Expresión de IGF-IR. Los resultados se presentan como la Media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Bonferroni para comparar entre diferentes grupos. n=6. DO = densidad óptica.

Tampoco se observaron cambios asociados al proceso de reversión de la fibrosis en la expresión de IGFBP-3 o en la cantidad de proteína en tejido hepático (**Figura 24-A y B** respectivamente) ni en la expresión de ALS (**Figura 24-C**).

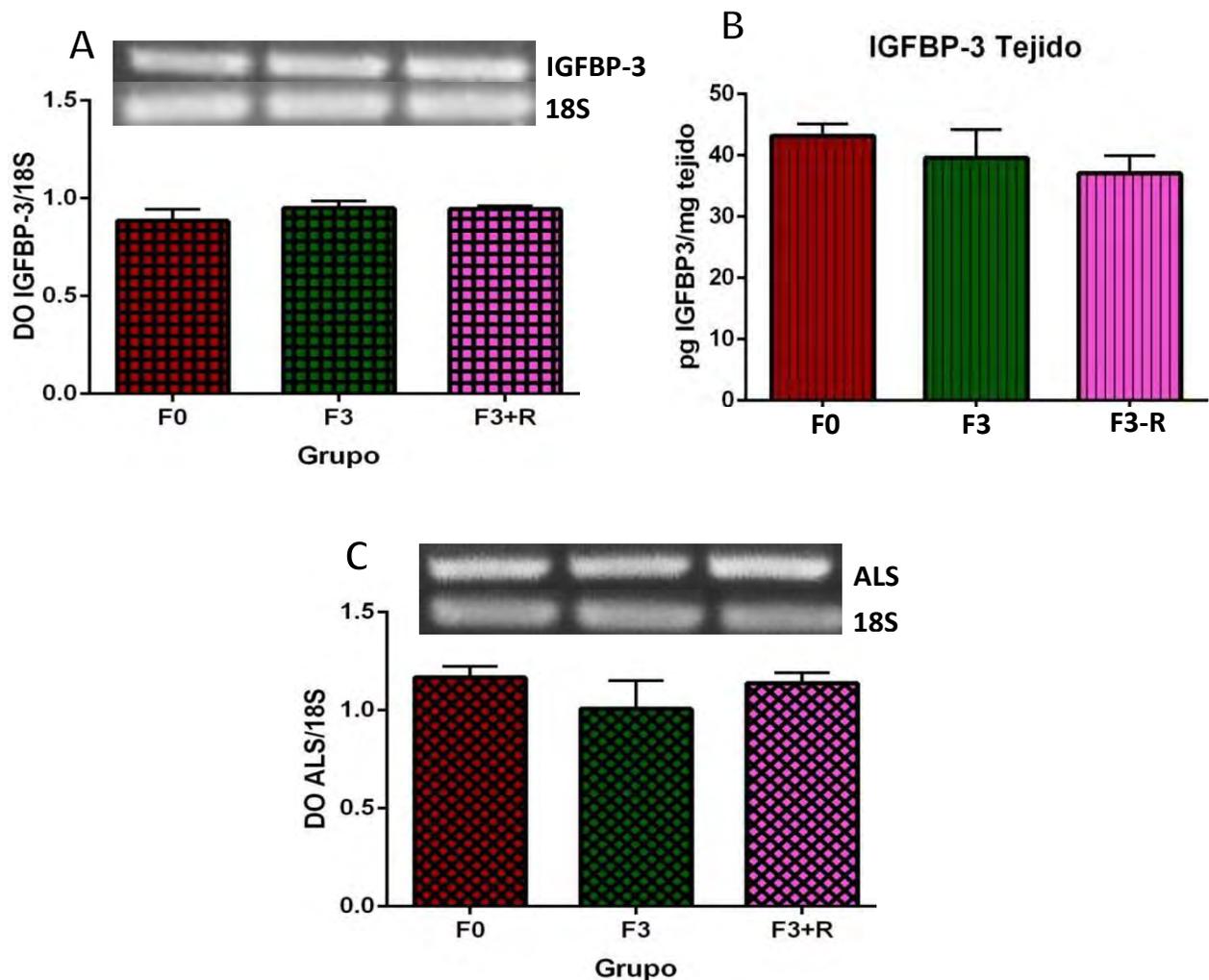


Figura 24. Estudio de las principales proteínas acarreadoras de IGF-I durante la reversión del proceso fibrogénico. A: Expresión de IGFBP-3. **B:** Cantidad de IGFBP-3 en tejido hepático.

C: Expresión de ALS. En ninguno de los casos se observaron diferencias estadísticas entre el grupo F3 y F3-R. Los resultados se presentan como la Media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Bonferroni para comparar entre diferentes grupos.

n=6. DO = densidad óptica.

9. Discusión

El factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I) ha sido es una proteína sintetizada principalmente en el hígado y cuyas concentraciones en suero se han encontrado disminuidas de acuerdo al grado de severidad de la cirrosis hepática, por lo cual el estudio de sus concentraciones en las etapas tempranas de la fibrosis resulta importante. Los resultados de este trabajo indican una disminución en la expresión del gen IGF-I en la etapa más avanzada del proceso fibrogénico, la cirrosis. Sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de IGF-I en las etapas tempranas o en el proceso de reversión de la fibrosis ni en la cantidad de proteína sérica o en tejido hepático. Del mismo modo, la expresión de IGF-IR permanece constante durante el proceso fibrogénico y el de reversión de la fibrosis.

Existen estudios clínicos que han demostrado que las concentraciones en suero de IGF-I se ven disminuidas en pacientes que presentan cirrosis hepática y que no solo hay una disminución al presentarse la enfermedad, sino que esta disminución es progresiva de acuerdo a la severidad de la cirrosis al ser evaluada por distintas escalas como Child-Pugh y MELD (Model of End-stage Liver Disease, una escala que predice la sobrevida de un paciente hepatópata para posicionarlo en la lista de espera para trasplante) [79-80].

Resultados comparables han sido reportados en modelos animales en los que se ha observado disminución de las concentraciones de IGF-I en suero de ratas con cirrosis. No obstante, los resultados en estos modelos no son totalmente claros ya que varían de acuerdo al agente hepatotóxico utilizado y al tipo de cirrosis inducida, ya que en la cirrosis micronodular no se observan cambios en la expresión de IGF-I, contrario a lo que se observa en la cirrosis macronodular. [81-87].

A pesar de la evidencia que involucra a IGF-I con la severidad de la cirrosis hepática, no hay un estudio claro que establezca la relación de esta proteína con el proceso de fibrosis que antecede a la cirrosis y, dado que el hígado es el órgano más importante en la síntesis de este factor de crecimiento, es posible pensar que

las concentraciones de IGF-I en suero se encuentren alteradas en etapas tempranas del proceso de fibrogénesis.

Los resultados obtenidos demuestran una disminución significativa en la expresión de IGF-I en el grupo de cirrosis (F4) comparado con el grupo F0 y F1 (**Figura 14**), lo que concuerda con las concentraciones disminuidas en suero que se han reportado en la literatura. Sin embargo, la disminución en la expresión de IGF-I no afectó las concentraciones de proteína en suero o en tejido, lo cual contrasta con los reportes que indican la disminución de las concentraciones de IGF-I en suero de pacientes con cirrosis. Una explicación para este resultado puede ser el hecho de que la disminución de IGF-I se presenta como resultado de la disfunción hepatocelular característica en la cirrosis descompensada. En el modelo de desarrollo de fibrosis establecido en el laboratorio a pesar de haber logrado la inducción de cirrosis, ésta no fue descompensada ya que en ninguna de las ratas del grupo F4 se observó presencia de ascitis, una de las principales complicaciones de la cirrosis descompensada que se asocia a los niveles de IGF-I [79]. Probablemente el daño más prolongado hubiera incidido en mayor severidad de la cirrosis, la presencia de ascitis y encefalopatía hepática, esta última ha sido relacionada con niveles más bajos de IGF-I [79], así como una disminución en IGF-I tanto en el tejido como en el suero, sin embargo nuestro objetivo era estudiar este factor de crecimiento durante el proceso fibrogénico incluida la cirrosis evaluado con una escala histológica que no distingue entre los grados de severidad de la misma

Se sabe que el hígado es el principal órgano responsable de la síntesis de IGF-I, al producir cerca del 90% de sus concentraciones en suero [55], al ser el órgano más importante en la biosíntesis de este factor de crecimiento, el hígado podría utilizar mecanismos que impidan o contrarresten alteraciones en las concentraciones séricas en etapas tempranas de la fibrosis y aún al comienzo de la cirrosis, en cuyo caso la disminución en la expresión de IGF-I a nivel de mRNA no afecta sus concentraciones circulantes.

IGF-I ejerce su efecto a través de la unión a IGF-IR [46, 67]. Las vías de señalización desencadenadas por la unión de IGF-I a IGF-IR culminan en la proliferación y la supervivencia celular además de la inhibición de la apoptosis [67, 68]. Por lo anterior, este receptor ha sido involucrado en el desarrollo de diversos tipos de cáncer, particularmente en el desarrollo de HCC [83]. Esto nos llevó a pensar en la posibilidad de la participación de IGF-IR en el desarrollo de fibrosis y cirrosis (principal factor de riesgo para el desarrollo de HCC), padecimiento en el que se presenta una intensa proliferación de hepatocitos en los denominados nódulos de regeneración. Sin embargo, nuestros resultados indican que no hay cambios en la expresión de IGF-IR en ninguna etapa del proceso fibrogénico. De nuevo, creemos que estos resultados se pueden explicar por una cirrosis en etapas tempranas. Si bien en la etapa F4 hay abundante proliferación, ésta recién comienza. Por lo anterior, los procesos genéticos y epigenéticos que contribuyen al desarrollo de HCC podrían estar del mismo modo en etapas iniciales durante la cirrosis que se estudió en este trabajo y por ello los hepatocitos aún no se encontrarían malignizados.

En los últimos años se ha evidenciado la participación de algunas IGFBPs en el proceso fibrogénico. En el caso de la fibrosis pulmonar y de piel la sobreexpresión de IGFBP-5 favorece la producción de componentes de la MEC y la respuesta fibrogénica por parte de los fibroblastos [88-89].

Con base en estos antecedentes, es posible pensar que las IGFBPs puedan participar en el proceso fibrogénico en otros órganos, tal es el caso del hígado. Adicional a esto, dada la estrecha relación entre las proteínas de esta familia, otras IGFBPs podrían tener un papel en el proceso fibrogénico y no sólo IGFBP-5. Como la principal proteína transportadora de IGF-I, se estudió la expresión de IGFBP-3 y la de ALS, esta última por formar un complejo ternario con IGF-I e IGFBP-3 que prolonga el tiempo de vida media de IGF-I. Se sabe que las concentraciones séricas de IGFBP-3, al igual que IGF-I, disminuyen progresivamente conforme aumenta la severidad de la cirrosis hepática [79-80].

Nuestros resultados indican que en ningún caso hay cambios en la expresión de IGFBP-3 o ALS ni en la cantidad de proteína en tejido. Esto concuerda de alguna manera con los resultados obtenidos para el caso de IGF-I. Por un lado, las concentraciones de IGFBP-3 también se han relacionado con la cirrosis descompensada, y en nuestro caso no se logró inducir esta fase de cirrosis, como se mencionó anteriormente. A pesar de que la expresión del mRNA de IGFBP-3 se mantiene en los distintos grupos, la cantidad de proteína en tejido disminuye significativamente en la etapa F4 del modelo (**Figura 20**), lo que podría deberse al aumento en su secreción al suero ya que se sabe que IGFBP-3, además de regular la biodisponibilidad de IGF-I, tiene funciones independientes a IGF-I [62-63].

Adicional al estudio de estas moléculas en el proceso fibrogénico en el hígado, se estudiaron en el proceso de reversión de la fibrosis. Es conocido que la administración de rhIGF-I a pacientes con cirrosis resulta en un efecto benéfico para la funcionalidad del hígado [82] y que en ratas que sobre-expresan IGF-I hay una reversión del proceso fibrogénico [87]. Por lo anterior, IGF-I podría ser un factor importante en la resolución de la fibrosis. Histológicamente se pudo observar una reversión de la fibrosis de una etapa F3 a una etapa F2 o F1 en algunos casos. Sin embargo, y a pesar de lo anterior, no se observaron cambios en la expresión de IGF-I, IGF-IR, IGFBP-3 o ALS o en la cantidad de proteína IGF-I e IGFBP-3. Esto resulta evidente, ya que estas moléculas no fueron alteradas durante el proceso fibrogénico, y en el caso de IGF-I la disminución en la expresión fue únicamente en la cirrosis, no así en la etapa F3 con la que se hace la comparación del grupo F3-R. . Estos resultados podrían indicar que las moléculas estudiadas no tienen una participación directa en el proceso fibrogénico hepático, ni en su reversión, y que probablemente la disminución en IGF-I observada en la cirrosis complicada que han reportado diferentes grupos de investigación [79-80] es más bien debida a la pérdida de funciones que presenta el hígado en la descompensación de la cirrosis.

Reconocemos algunas limitantes en nuestro estudio. En primer lugar, las concentraciones de IGFBP-3 en suero no pudieron ser determinadas por cuestiones técnicas, por lo que es incierto asegurar su secreción del tejido hacia el suero, sin embargo es una posibilidad. Además, el estudio de la activación de IGF-IR en lugar de la expresión del mRNA podría brindar otros resultados, dado que este receptor se expresa en bajas cantidades en los hepatocitos. Finalmente, creemos que un análisis en conjunto de IGF-I y sus IGFBPs (IGFBP 1-7) podría brindar mayor información acerca de cómo se comportan las proteínas de esta familia.

El diagnóstico de la fibrosis hepática mediante biopsia es un método que tiene diversas desventajas al ser un método invasivo, por lo que el estudio de moléculas que puedan ser determinadas en suero resulta válido y de gran importancia. Con los resultados obtenidos, IGF-I no parece ser un buen biomarcador para la fibrosis. A pesar de ello, los resultados reportados en la literatura lo contemplan como un buen biomarcador para el diagnóstico de la severidad de la cirrosis.

10. Conclusiones

El Factor de Crecimiento Insulinoide I (IGF-I), su receptor (IGF-IR) y sus principales proteínas transportadoras (IGFBP-3 y ALS) no pueden diferenciar etapas del proceso fibrogénico, por lo que no serían buenos biomarcadores para esta enfermedad, aunque se sabe que IGF-I e IGFBP-3 podrían tener un valor pronóstico en la severidad de la cirrosis hepática descompensada.

11. REFERENCIAS

1. Guyton, C.G. and Hall, J.E. Tratado de Fisiología Médica. 11ª Edición. Elsevier, 2006.
2. Tortora, Derrickson. Principios de Anatomía y Fisiología. 11ª edición, Ed. Médica Panamericana, México, 2009. 1220 p.
3. Jan Koolman, Klaus-Heinrich Röhm. Bioquímica: Texto y Atlas. 3ª edición, Ed. Médica Panamericana, España, 2005. 488 p.
4. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Mujeres y hombres en México 2013.
5. Friedman SL. Liver fibrosis – from bench to bedside. *Journal of Hepatology*. 2003; 38:38–53.
6. Hernandez-Gea V, Friedman SL: Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual Review of Pathology* 2011; 6:425-56.
7. Bataller R, Brenner DA. Science in medicine Liver fibrosis. *Science & Medicine*. 2005; 115(2).
8. Durand F. and Valla D. Assessment of prognosis of cirrhosis. *Semin Liver Dis*, 2008; 28: 110-22
9. Davis, G.L., and Rosenberg, D.M. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transpl*. 2003; 9:331–338.
10. Benyon, R.C., and Iredale. Is liver fibrosis reversible? *American Journal Of Pathology, Gut*, 2000; 46:443–446.
11. Arthur, M.J. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2000; 279:G245–G249.
12. Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Society*. 2004; 3–15.
13. Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev*. 1992; 71:951–990
14. Marra, F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J. Hepatol*. 1999; 31:1120–1130.

15. Milani, S., et al. Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology*. 1990; 98:175–184.
16. Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007; 56:284–92.
17. Breitkopf K, Godoy P, Ciucian L, et al. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z Gastroenterol* 2006; 44:57–66.
18. Borkham-Kamphorst and Weiskirchen, R. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 321:413–423.
19. Gressner, A.M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., and Dooley, S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front. Biosci.* 2002; 7:d793–d807.
20. Friedman SL. Mechanisms of Hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-69.
21. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1:98–105.
22. Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Ann. Hepatol.* 2009; 8:283–91
23. Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin. Sci.* 2007; 112:265–80
24. Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, et al. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996;110:821–31.
25. Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJP, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996; 24:176–84.
26. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 2008; 134:657–67.
27. Kisseleva T, Brenner D. Stellate Cell Biology. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepat.* 2006; 21: S84-S87.

28. Jeon WI, Park O, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008; 134: 248-258.
29. Hübscher S. Histological grading and staging in chronic hepatitis: clinical applications and problems. *J Hepatol* 1998; 29:1015-1022.
30. Ishak K, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis, *J Hepatol*, 1995; 22(6):696–699.
31. Bedossa P and Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group, *Hepatology*, 1996; 24(2):289–293.
32. Knodell RG, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis, *Hepatology*, 1981; 1(5):431–435.
33. Scheuer PJ, Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment, *J Hepatol*, 1991; 13(3):372–374.
34. Batts KP and Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting, *Am J Surg Pathol*, 1995; 19(12): 1409–1417.
35. Thampanitchawong, P., and Piratvisuth, T. Liver biopsy: complications and risk factors. *World J. Gastroenterol*. 1999; 5:301–304.
36. Bedossa P. Liver biopsy. *Gastroenterol Clin Biol*. 2008; 32:4-7.
37. Regev, A., et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am. J. Gastroenterol*. 2002; 97:2614–2618.
38. Andersen EA, Christensen PB, Weis N. Transient elastography for liver fibrosis diagnosis. *Eur J Intern Med*. 2009; 20:339-42.
39. A.M. Gressner, R. Weiskirchen Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med*, 2006; 10:76–99
40. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003; 38:518–26.

41. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004; 127:1704–13.
42. Adams LA, Bulsara M, Rossi E, et al. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem* 2005; 51:1867–73.
43. Poynard T, Ratziu V, Naveau S, et al. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp Hepatol* 2005; 4:10.
44. Parkes J, Guha IN, Roderick P, Rosenberg W. Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006; 44:462–74.
45. Sebastiani G, Vario A, Guido M, et al. Stepwise combination algorithms of noninvasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2006; 44:686–93.
46. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1472-1489.
47. Marshman E, Streuli CH. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in mammary gland function. *Breast Cancer Res* 2002; 4: 231-239.
48. Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD Jr, van den Brande JL, van Wyk JJ: Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 1972; 235(5333):107.
49. Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J, Rosenfeld RG, Pollock BH: Growth in growth hormone insensitivity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 1994; 5(7):296–303.
50. Herrington J, Smit LS, Schwartz J, Carter-Su C. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene* 2000; 19: 2585-2597
51. Duguay SJ, Milewski WM, Young BD, Nakayama K, Steiner DF. Processing of wild-type and mutant proinsulin-like growth factor-IA by subtilisin-related proprotein convertases. *J Biol Chem* 1997; 272: 6663-6670

52. Ghigo MC, Torsello A, Grilli R, Luoni M, Guidi M, Cella SG, Locatelli V, Muller EE: Effects of GH and IGF-I administration on GHRH and somatostatin mRNA levels: I. A study on ad libitum fed and starved adult male rats. *J Endocrinol Invest* 1997; 20(3):144–150.
53. Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL: Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 1981; 212(4500):1279–1281.
54. Bertherat J, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J: Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur J Endocrinol* 1995; 132(1):12–24.
55. Pivonello et al. The GH-IGF-SST system in hepatocellular carcinoma: biological and molecular pathogenetic mechanisms and therapeutic targets. *Infectious Agents and Cancer* 2014 9:27.
56. Puche JE, Castilla-Cortazar I. Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J Transl Med* 2012; 10:224.
57. D'Ercole AJ, Applewhite GT, Underwood LE: Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev Biol* 1980; 75(2):315–328.
58. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16: 3-34.
59. Baxter RC. Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation, a review. *Horm Res.* 1994; 42:140–144.
60. Baxter RC, Daughaday WH. Impaired formation of the ternary insulin-like growth factor-binding protein complex in patients with hypoglycemia due to nonislet cell tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 73:696–702.
61. Valentinis B, Bhala A, DeAngelis T, Baserga R, Cohen P. The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene. *Mol Endocrinol.* 1995; 9:361–367.
62. Clemmons DR. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 140: 19-24.

63. Riedemann J, Macaulay VM. IGF1R signalling and its inhibition. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13 Suppl 1: S33-S43.
64. Sepp-Lorenzino L. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 47(3):235–253
65. Ullrich A et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 1986; 5(10):2503–2512.
66. Leonard Girnita, et al. Something old, something new and something borrowed: emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) signaling regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014; 71: 2403-2427.
67. Roth RA, Kiess W. Insulin-like growth factor receptors: recent developments and new methodologies. *Growth Regul* 1994; 4 Suppl 1: 31-38.
68. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 505-518.
69. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007; 129: 1261-1274
70. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16: 1103-1123.
71. Russell-Jones DL, Umpleby AM, Hennessy TR, Bowes SB, Shojaee-Moradie F. Use of leucine clamp to demonstrate that IGF-I actively stimulates protein synthesis in normal humans (editorial). *Am J Physiol* 1994; 267: 591-8.
72. Le Roith D. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 1997; 336: 633-40.
73. Laron Z, Klinger B. Effect of insuline-like growth factor treatment on serum androgens and testicular and penile size in males with Laron syndrome (primary growth hormone resistance). *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 176-80.
74. Ohneda K, Ulshen MH, Fuller CR, D'Ercole AJ, Lund PK. Enhanced growth of small bowel in transgenic mice expressing human insulin-like growth factor 1. *Gastroenterology* 1997; 112: 444-54.

75. Gutierrez-Ospina G, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ. In vivo effects of insulin-like growth factor 1 on the development of sensory pathways: analysis of the primary somatic sensory cortex (S1) of transgenic mice. *Endocrinology* 1996; 137: 5484-92.
76. C.L. Mendenhall, S.D. Chernausek, M.B. Ray, et al., The interactions of insulin-like growth factor I(IGF-I) with protein calorie malnutrition in patients with alcoholic liver disease: V.A. Cooperative study on alcoholic hepatitis VI, *Alcohol Alcohol*. 1989; 24: 319–329.
77. T. Inaba, H. Saito, T. Inoue, et al., Growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis alterations contribute to disturbed protein metabolism in cirrhosis patients after hepatectomy, *J. Hepatol*. 1999; 31: 271–276.
78. Colakoglu O, Taskiran B, Colakoglu G, Kizildag S, Ari Ozcan F, Unsal B. Serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) levels in liver cirrhosis. *Turk J Gastroenterol* 2007; 18: 245-9.
79. Ronsoni MF, Lazzarotto C, Fayad L, Silva MC, Nogueira CL, Bazzo ML, et al. IGF-I and IGFBP-3 serum levels in patients hospitalized for complications of liver cirrhosis. *Ann. Hepatol*. 2013; 12 (3): 456–63.
80. Wu YL, Ye J, Zhong J, Xi RP. Clinical significance of serum IGF-I, IGF-II and IGFBP-3 in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2740-3.
81. Novosyadlyy, R., Dargel, R. & Scharf, J. Expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins during thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Growth Hormone & IGF Research* 2005; 15: 313-323
82. Kasprzak A, Adamek A. The insulin-like growth factor (IGF) signaling axis and hepatitis C virus-associated carcinogenesis (review). *Int J Oncol* 2012; 41: 1919-1931.
83. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8:915–928.

84. Tovar V1, Alsinet C, Villanueva A. et al. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. *J Hepatol.* 2010; 52(4):550-9
85. Mariam Conchillo et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: Results of a pilot randomized controlled clinical trial. *J Hepatol.* 2005; 43:630-636
86. M. Vera, et al. Liver transduction with a simian virus 40 vector encoding insulin-like growth factor I reduces hepatic damage and the development of liver cirrhosis. *Gene Therapy.* 2007; 14: 203–210
87. Luciano Sobrevals, 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; 51:912-921.
88. Yasuoka, H., Hsu, E., et al. The fibrotic phenotype induced by IGFBP-5 is regulated by MAPK activation and egr-1-dependent and -independent mechanisms. *The American Journal of Pathology,* 2009; 175(2): 605–615.
89. Yasuoka, H., Jukic, et al. Insulin-like growth factor binding protein 5 induces skin fibrosis: A novel murine model for dermal fibrosis. *Arthritis and Rheumatism,* 2006; 54: 3001–3010.