



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**Expresión de IGFBP-7 y senescencia celular en la
progresión de NAFLD en un modelo experimental
murino**

TESIS

Que para obtener el título de
Química Farmacéutica Biológica

Presenta

Campos Espinosa Adriana

México, CDMX

Año 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: M. en C. Omar Noel Medina Campos

SECRETARIO: Dra. Carolina Guzmán Arriaga

1er. SUPLENTE: M. en C. José Vergara de la Fuente

2do. SUPLENTE: M. en C. Noemí Cárdenas Rodríguez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE HÍGADO PÁNCREAS Y MOTILIDAD

UNIDAD DE MEDICINA EXPERIMENTAL

FACULTAD DE MEDICINA-UNAM

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Carolina Guzmán Arriaga

SUSTENTANTE:

Campos Espinosa Adriana

Agradecimientos.

Agradezco a mi tutora, la Dra. Carolina Guzmán Arriaga, por su apoyo, confianza y paciencia, a lo largo de mi estancia en el HIPAM.

Gracias a la Dra. Gabriela Gutiérrez y al personal del HIPAM, Leticia Sánchez Gómez, Nicanor Maya Santos, José Ángel García López y Carlos Alberto Martínez Juárez, por su apoyo y colaboración dentro del laboratorio.

Al personal del bioterio, Biól. Guillermo Alberto Ramos Blancas, MVZ Daniel Sánchez Almaráz y Sr. Ricardo Vargas Orozco, por su asistencia en la realización del modelo experimental.

Al Sr. Pedro Balderas Flores por el apoyo en la realización de las tinciones con hematoxilina y eosina, así como tricrómica de Masson.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (221137-27348-497) y el financiamiento del proyecto (CB-221137).

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la beca de titulación otorgada. Beca para Proyectos de investigación del programa de vinculación con Egresados (PVE) 2017-2018.

“La mayoría de la gente dice que el intelecto es lo que hace a un gran científico.

Están equivocados: es el carácter”.

Albert Einstein.

Índice general

	Páginas
1. Resumen	10-11
2. Marco teórico	
2.1 Fisiología del hígado.....	12-13
2.2 Enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA)	
2.2.1 Epidemiología.....	14-15
2.2.2 Fisiopatología.....	15-16
2.2.3 Espectro de la enfermedad.....	16-18
2.2.4 Modelo por dieta para el estudio de la EHGNA.....	19-20
2.2.5 Fibrosis.....	20-24
2.3 Sistema de factores de crecimiento insulinoide.....	25-26
2.4 Proteína IGFBP-7.....	26-28
2.5 Senescencia celular.....	28-30
3. Planteamiento del problema	31
4. Justificación	31-32
5. Hipótesis	32
6. Objetivos	
6.1 Objetivo general.....	32
6.2 Objetivos particulares.....	32
7. Material y métodos	
7.1 Animales y condiciones de alojamiento.....	33
7.2 Inducción de la EHGNA y recolección de muestras.....	33
7.3 Evaluación histológica.....	34
7.4 Cuantificación de proteínas.....	34-36
7.5 Actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal)..	36
7.6 Análisis morfométrico.....	37
7.7 Análisis estadístico.....	37
8. Resultados	38-51
9. Discusión	52-54
10. Conclusiones	54
11. Referencias	55-58
12. Anexo	
I. Tinciones histológicas	58-60

Índice de Abreviaturas

bFGF:	Factor de crecimiento de fibroblasto básico
CAR:	Receptor constitutivo de androstano
CTGF:	Factor de crecimiento de tejido conectivo
DAMPs:	Patrones moleculares asociados a daño
DNL:	Lipogénesis <i>de novo</i>
EGF:	Factor de crecimiento epidermal
ER:	Retículo endoplasmático
ET-1:	Endotelina 1
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GRO:	Oncogen regulado por crecimiento
HCC:	Hepatocarcinoma celular
HCC4:	CC-quimiocina-4
H-E:	Hematoxilina y Eosina
HGF:	Factor de crecimiento de hepatocitos
HSCs:	Células estelares hepáticas
ICAM:	Molécula de adhesión intercelular 1
IGF:	Factor de crecimiento insulinoide
IGFBP:	Proteína de unión a factores de crecimiento insulinoide
IL:	Interleucina
KGF:	Factor de crecimiento de queratinocitos
LCFA:	Ácidos grasos de cadena larga
LXR:	Receptor hepático X
MCC:	Dieta suplementada con metionina y colina
MCD:	Dieta deficiente de metionina y colina
MCP:	Proteína quimioatrayente de monocitos
M-CSF:	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEC:	Matriz extra celular
MIF:	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
MIP:	Proteína inflamatoria de macrófagos
MMPs:	Metaloproteinasas de matriz
EHGNA:	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
NAS:	Puntuación de la actividad de la EHGNA
NASH:	Esteatohepatitis no alcohólica
PAF:	Factor activador de plaquetas
PAI:	Inhibidor del activador del plasminógeno
PBS:	Amortiguador fosfato salino

PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE:	Prostaglandinas
PIGH:	Fosfatidilinositol N-acetilglucosaminiltransferasa subunidad H
PPAR:	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
PXR:	Receptor pregnano X
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RS:	Rojo de sirio
SADF:	Focos de daño a DNA asociados a senescencia
SAHF:	Focos de heterocromatina asociados a senescencia
SAPS:	Fenotipo secretor asociado a senescencia
SA-β-gal:	Beta-galactosidasa asociada a senescencia
SCF:	Factor de células troncales
SDF:	Factor derivado de células mesenquimales
SIPS:	Senescencia prematura inducida por estrés
SM:	Síndrome metabólico
sTNFRI:	Receptor I del factor de necrosis tumoral soluble
TGF-β:	Factor de crecimiento transformante-beta
TIMP:	Inhibidor tisular de la metaloproteinasas
TJ's:	Uniones estrechas
TLRs:	Receptores tipo Toll
TM:	Tricrómica de Masson
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral –alfa
tPA:	Activador del plasminógeno tisular
TRAIL-R:	Receptor de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
VLDL:	Lipoproteína de muy baja densidad

Índice de figuras

- Figura 1.** Estructura hepática.
- Figura 2.** División de áreas del parénquima hepático.
- Figura 3.** Mecanismo patogénico de la NASH.
- Figura 4.** Proceso fibrótico.
- Figura 5.** Sistema de factores de crecimiento insulinoide.
- Figura 6.** Progresión de la EHGNA.
- Figura 7.** Cambios en el peso corporal en los grupos de la dieta MCC o MCD.
- Figura 8.** Consumo de alimento en los grupos alimentados con la dieta MCC o MCD.
- Figura 9.** Evaluación histológica de la progresión de EHGNA con tinción de HyE.
- Figura 10.** Prevalencia de EHGNA.
- Figura 11.** Evaluación del porcentaje lipídico.
- Figura 12.** Contenido de lípidos respecto a su estadio de progresión.
- Figura 13.** Concentraciones de IGFBP-7 en suero y tejido relacionados con el estadio de la EHGNA.
- Figura 14.** Correlación de las concentraciones de IGFBP-7 en suero y tejido relacionadas con el contenido hepático de lípidos.
- Figura 15.** Demostración de senescencia en los estadios de la EHGNA.
- Figura 16.** Asociación de la progresión la EHGNA con la senescencia celular.
- Figura 17.** Progresión de la fibrosis observado en tinción tricrómica de Masson.
- Figura 18.** Progresión de la fibrosis observado en tinción con rojo de sirio.
- Figura 19.** Prevalencia de fibrosis.
- Figura 20.** Concentraciones de IGFBP-7 en suero y tejido relacionada con el estadio de fibrosis.

Figura 21. Determinación de senescencia asociada al grado de fibrosis en la progresión de la EHGNA.

Figura 22. Asociación de la senescencia y el avance de fibrosis por la EHGNA.

Índice de tablas

Tabla 1. Factores parácrinos involucrados en la iniciación de la activación de HSCs.

Tabla 2. Factores parácrinos y autócrinos involucrados en la perpetuación de la activación de HSCs.

Tabla 3. Estimado de la progresión de la EHGNA.

Tabla 4. Factores comúnmente secretados por el SASP en células senescentes.

1. Resumen

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) o por sus siglas en inglés (NAFLD) es una patología que en los últimos años ha aumentado su prevalencia a nivel mundial y conlleva un amplio espectro en su progresión, desde la esteatosis hepática (acumulación de lípidos $\geq 5\%$), pasando por esteatohepatitis (inflamación y excesiva acumulación lipídica que lleva a la deformación del hepatocito, denominada balonamiento hepático), fibrosis (respuesta cicatrizal) y cirrosis. Sin embargo, si el daño perpetúa puede resultar en hepatocarcinoma celular.

Se ha encontrado evidencia que sugiere la relación entre las proteínas de unión a factores de crecimiento insulinoide (IGFBPs) y el desarrollo de la EHGNA. La súper familia IGFBP comprende grupos de proteínas, de alta afinidad (IGFBP 1-6) y de baja afinidad (IGFBP-rP 1-10) a los factores de crecimiento insulinoide (IGFs). Las IGFBPs presentan funciones dependientes de IGFs como el crecimiento y la reparación celular; así como funciones independientes de estos, involucradas en el desarrollo de algunas patologías. Dentro del grupo de IGFBP-rPs, la más estudiada es la IGFBP-rP 1 o IGFBP-7 con influencia en procesos de senescencia y activación de células estelares hepáticas.

El objetivo del proyecto de tesis es evaluar la relación de la senescencia celular y el comportamiento de IGFBP-7 en un modelo murino de inducción de la EHGNA por dieta deficiente en metionina y colina (MCD). Se emplearon ratones macho de la cepa C57BL/6 con un peso aproximado entre 18 y 22 gramos y un rango de edad de 12 a 16 semanas. A los cuales se les administró la dieta suplementada con colina y metionina (MCC) o la dieta MCD; la administración fue durante 2, 8 ó 12 semanas.

Posteriormente se realizó una evaluación histológica empleando tinciones de hematoxilina y eosina (H-E), tinción con rojo oleoso (RO), tricrómica de Masson (TM) y con rojo de sirio (RS) para evaluar la progresión de la enfermedad. Se midieron las concentraciones de IGFBP-7 en suero y tejido y se detectó la actividad de beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal).

Los resultados obtenidos muestran la progresión de la EHGNA como consecuencia de la deficiencia de metionina y colina. Los ratones del grupo MCD disminuyeron de peso lo que podría estar asociado a una compensación de las moléculas de colina y metionina para tratar de restablecer la homeostasis, y en la semana 12 del régimen dietario no se observa progresión evidente. Los grupos fueron clasificados en su estadio de progresión de la EHGNA (pasando por esteatosis simple (SS), esteatohepatitis no alcohólica límite (BN) y esteatohepatitis no alcohólica definitiva (DN), así como de fibrosis. La concentración sérica de IGFBP-7 aumentó en todos los estadios de la EHGNA comparados con el control, pero no en tejido, posiblemente se asocie a la cantidad de lípidos presentes en los estadios avanzados de la enfermedad. Con respecto a la fibrosis las concentraciones de IGFBP-7 tanto en suero como en tejido aumentaron en los estadios de fibrosis temprana F1C (fibrosis portal) y F2 (fibrosis portal y perisinusoidal) comparados con el grupo F0 (sin fibrosis). En la evaluación de la senescencia celular, se observa que ésta aumenta progresivamente hasta BN y en DN se mantiene la cantidad de células senescentes; por otro lado en la fibrosis, las células senescentes aumentan en los estados F1C y F2 comparados con F0.

Este proyecto de tesis sugiere la relación entre la expresión de IGFBP-7 y la progresión de la EHGNA asociada a la senescencia celular de hepatocitos y a la fibrosis, ya que en los estadios de fibrosis temprana la proteína IGFBP-7 se encuentra mayormente expresada.

2. Marco teórico

2.1. Fisiología del hígado

El hígado es considerada la glándula más pesada del cuerpo, con un peso de 1.4 kg en un adulto promedio. En el humano es el segundo órgano más grande después de la piel, se encuentra dividido en 2 lóbulos: siendo más grande el derecho y pequeño el izquierdo [1].

El parénquima hepático es la región del tejido que provee la funcionalidad al órgano; está compuesto por células epiteliales o hepatocitos, células endoteliales y células no endoteliales que incluyen a macrófagos residentes de tejidos (células de Kupffer), las cuales se encargan de fagocitar moléculas o células residuales. Por otro lado, se encuentran las células estelares (HSCs), encargadas de la síntesis de matriz extracelular (ECM) durante los procesos cicatrizales; a su vez están distribuidas en diferentes zonas del hígado; así mismo, el revestimiento endotelial se distingue por la presencia de fenestraciones y poros que se encuentran separados de los hepatocitos mediante el espacio de Disse, donde residen las HSCs [2].

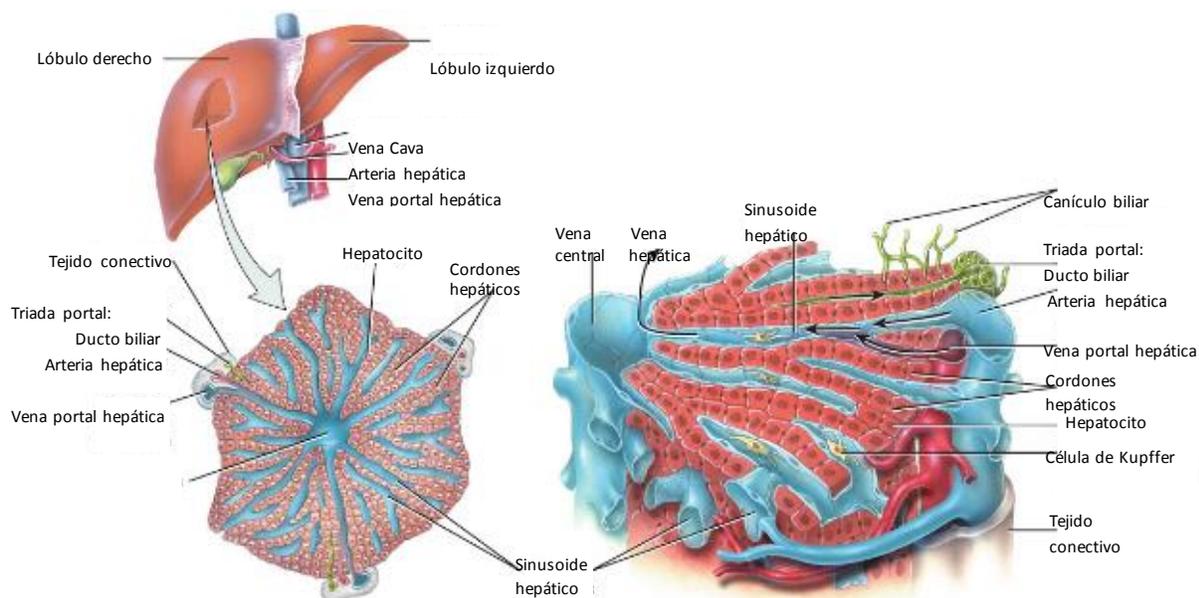
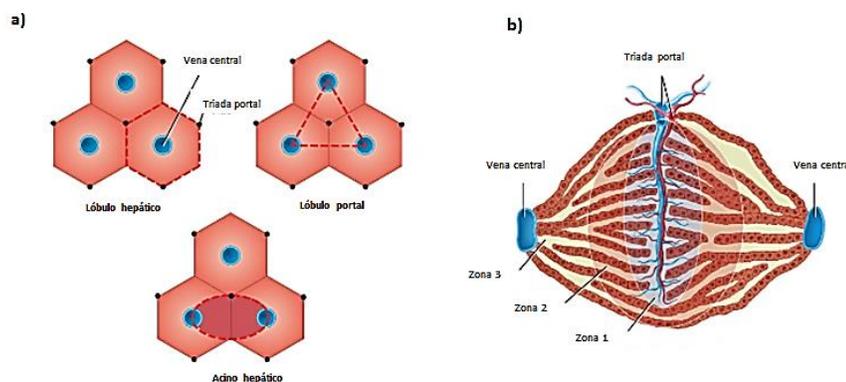


Figura 1: Estructura hepática. El sinusoides hepático es la zona vascular dentro del hígado conformada por las venas centrales y arterias hepáticas [1].

Los hepatocitos son el principal componente celular del hígado y estos desempeñan múltiples funciones metabólicas, secretoras y endócrinas; representan el 80% del volumen del hígado y se encuentran arreglados en complejos tridimensionales denominados cordones hepáticos [1].

Dentro del parénquima hepático se forman estructuras conocidas como triadas portales, estructuradas por el ducto biliar, la arteria hepática y la vena porta (Fig. 1). Se han propuesto 3 posibles unidades funcionales/anatómicas dentro del parénquima. El lobulillo hepático, es una estructura hexagonal delimitada por triadas portales en los vértices y posee una vena central; el lobulillo portal, se caracteriza ser un área triangular, se encuentra compuesto por 3 lobulillos hepáticos adyacentes, cuyos vértices son las venas centrales (Fig. 2.a); finalmente, el acino hepático, el cual comprende 2 venas centrales y dos triadas portales (Fig. 2.a). El acino hepático se divide en 3 zonas dependiendo del grado de perfusión vascular y actividad metabólica. La **zona 1** posee la mayor



oxigenación, las células de esta zona son las primeras en absorber los nutrientes

[1]. La **zona 2**, es la porción central del acino. Finalmente la **zona 3** es la más cercana a la vena central y tiene menor cantidad de nutrientes y oxígeno [3].

Figura 2: Estructura anatómica del parénquima hepático. a) Unidades funcionales. El lobulillo hepático con silueta hexagonal, conformado por la vena central y en cada vértice una triada portal. El lobulillo portal, de forma triangular conformado por 3 lobulillos hepáticos y en cada vértice se encuentra una vena central y al centro una triada portal; y el acino hepático presenta una forma de elipse, la cual abarca 2 lobulillos hepáticos. **b) Zonas del acino hepático.** Se divide en 3 Zonas de forma decreciente a la cantidad de oxígeno presente: zona 1, zona 2 y zona 3 [1].

2.2 Enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA)

2.2.1 Epidemiología

El hígado es un órgano muy importante en la homeostasis energética del cuerpo, ya que contribuye en la síntesis y metabolismo de una gran variedad de moléculas, entre ellas los lípidos. Actualmente la hepatopatía más prevalente a nivel mundial es la enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) por sus siglas en inglés (NAFLD), se encuentra altamente asociada al estilo de vida, el sedentarismo y las enfermedades metabólicas (diabetes tipo 2, obesidad, dislipidemias, etc.).

La EHGNA es uno de los trastornos hepáticos más comunes en el mundo con una prevalencia reportada del 6-35%; en Europa, la prevalencia es del 25-26% con amplias variaciones entre diferentes poblaciones [4], mientras que en Estados Unidos se tiene una prevalencia del 10-30% en la población adulta [5], mientras que en México se ha estimado una prevalencia de alrededor del 17.05% en población asintomática (2010) [6] y el 82.9% de prevalencia en población con síndrome metabólico (2016) [7].

Esta enfermedad hepática afecta tanto a niños como adultos. En la última década se ha observado un aumento en su prevalencia asociado al desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2 en la población [6], se estima que el 76% de los pacientes con la EHGNA padecen diabetes tipo 2, así como el 90% de los pacientes tienen obesidad [5]. Ambas patologías han alcanzado proporciones epidémicas y se estima que cerca de 1.46 mil millones de los adultos padecen obesidad a nivel mundial, debido al consumo de alimentos con alto contenido calórico y rico en grasas en restaurantes de comidas rápidas o al cambio de estilo de vida (sedentarismo) [8].

Cabe destacar que a nivel mundial, uno de cada cinco adultos desarrollan la EHGNA, sin embargo esta enfermedad no está únicamente relacionada a la

obesidad, ya que se asocia a diferentes disfuncionalidades metabólicas, por lo que tiene alta frecuencia en pacientes con diversas comorbilidades metabólicas [5].

2.2.2 Fisiopatología

La EHGNA involucra la acumulación y deposición de lípidos en el tejido hepático [9] en ausencia de infección o consumo de alcohol, ésta conlleva un amplio espectro de desórdenes hepáticos que van desde la esteatosis, pasando por la esteatohepatitis no alcohólica por sus siglas en inglés (NASH), asociada al desencadenamiento de fibrosis, cirrosis o incluso hepatocarcinoma celular (HCC) [10].

El metabolismo hepático de lípidos y glucosa, la regulación de la gluconeogénesis y lipogénesis se encuentran relacionados con la patogénesis de la EHGNA y tienen una participación en las vías de señalización inflamatorias, de proliferación y apoptosis celular [10].

La esteatosis hepática puede desarrollarse por:

- 1.- La disrupción de distintas vías metabólicas, como la falla en la eliminación de los ácidos grasos de cadena larga (LCFA) debido a la β -oxidación mitocondrial hepática deteriorada.
- 2.- La falla en la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las cuales se encargan de exportar triglicéridos fuera del hígado.
- 3.- Al incremento en la liberación y absorción de los LCFA.
- 4.- El incremento en la síntesis hepática *de novo* de los LCFA y triglicéridos favorece el desencadenamiento de la esteatosis en el parénquima hepático [11].

Algunos factores patogénicos causantes de la EHGNA comprenden la influencia de factores genéticos: Enfermedad de Wilson, hepatoesteatosis familiar; por

sustancias tóxicas como fármacos: azacitidina y glucocorticoides o metales como antimonio y cromo [12].

Entre algunas otras causas destacan la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico (SM) [13], así como el estrés oxidante (desbalance entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los sistemas antioxidantes), pues se ha reportado un aumento de las ROS durante la patogénesis de la EHGNA, siendo la mitocondria la principal fuente productora de ROS consecuencia de la lipoperoxidación desencadenando una disfunción mitocondrial y progresión de la enfermedad a NASH [10]. Así mismo se ha encontrado evidencia de la relación entre la microbiota intestinal y la EHGNA, ya que los pacientes con la patología tienen un aumento en la permeabilidad intestinal, llevando como consecuencia al incremento en la traslocación bacteriana resultado de la disrupción de una uniones estrechas (TJ's) en la barrera intestinal [14, 15].

2.2.3 Espectro de la enfermedad

La principal manifestación de EHGNA es la presencia de esteatosis de tipo macrovesicular y microvesicular. La esteatosis macrovesicular se caracteriza por la aparición de grandes vacuolas lipídicas ocupando la mayor parte del citoplasma del hepatocito, desplazando al núcleo hacia la periferia de la célula; mientras que la esteatosis microvesicular presenta pequeñas vacuolas lipídicas de múltiples tamaños, sin alterar la posición del núcleo, ya que éste se encuentra al centro de la célula [11].

Si el daño se perpetúa en el tejido hepático, se favorece la progresión de la enfermedad hacia NASH, con presencia de hepatocitos balonados (el exceso de lípidos al interior del hepatocito provoca la pérdida de su estructura y favorece el balonamiento); acompañado de esteatosis e infiltrado inflamatorio, dando paso a la aparición de fibrosis perisinusoidal en la zona 3 del acino [9].

Las principales fuentes de ácidos grasos en el hígado son la dieta, la lipogénesis *de novo* (DNL) y la lipólisis del tejido adiposo, siendo ésta última la que en condiciones de salud provee mayor cantidad de ácidos grasos; sin embargo en pacientes con la EHGNA se ha observado una mayor aportación de lípidos debida al incremento en la DNL, específicamente en los ácidos grasos de cadena larga saturada, los cuales son citotóxicos para el hepatocito [11].

Por otro lado, la acumulación de lípidos puede inducir la muerte celular de los hepatocitos mediante la activación de la vía extrínseca, por sobre-expresión del receptor de muerte FAS y su ligando; o mediante la activación de la vía intrínseca, por efecto del estrés en el retículo endoplasmático (ER), llevando a la muerte celular a través de la caspasa 2. El daño ocasionado en la célula provoca la acumulación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) en el espacio extracelular. Así mismo el daño celular se ve potenciado por la activación de la cinasa c-Jun N-terminal, la producción de ROS y la disfunción mitocondrial; en adición a esto, los ácidos grasos pueden causar directamente estrés mitocondrial por la alta demanda en la β -oxidación, lo cual conduce a una producción excesiva de ROS y disfunción mitocondrial [16].

La inflamación hepática involucra el reclutamiento de macrófagos y células de Kupffer, que expresan receptores tipo Toll (TLRs) y promueven la formación del inflamasoma, así mismo estas células responden ante el estímulo de los DAMPs liberados por los hepatocitos apoptóticos, así como el estímulo de los lípidos y las endotoxinas provenientes de la vena porta. En conjunto la estimulación de dichos receptores promueve su activación y consecuente producción de citocinas pro-inflamatorias.

La fibrosis hepática en NASH deriva de las células estelares, ya que bajo un ambiente inflamatorio se favorece su activación sostenida cambiando su fenotipo a tipo-miofibroblasto productor de colágena. Estas mismas células poseen en su superficie receptores TLRs los cuales son estimulados por DAMPs, endotoxinas y

por citocinas liberadas por lo que se convierte en un ciclo vicioso que resulta en la producción de fibrosis y factores pro-inflamatorios [16].

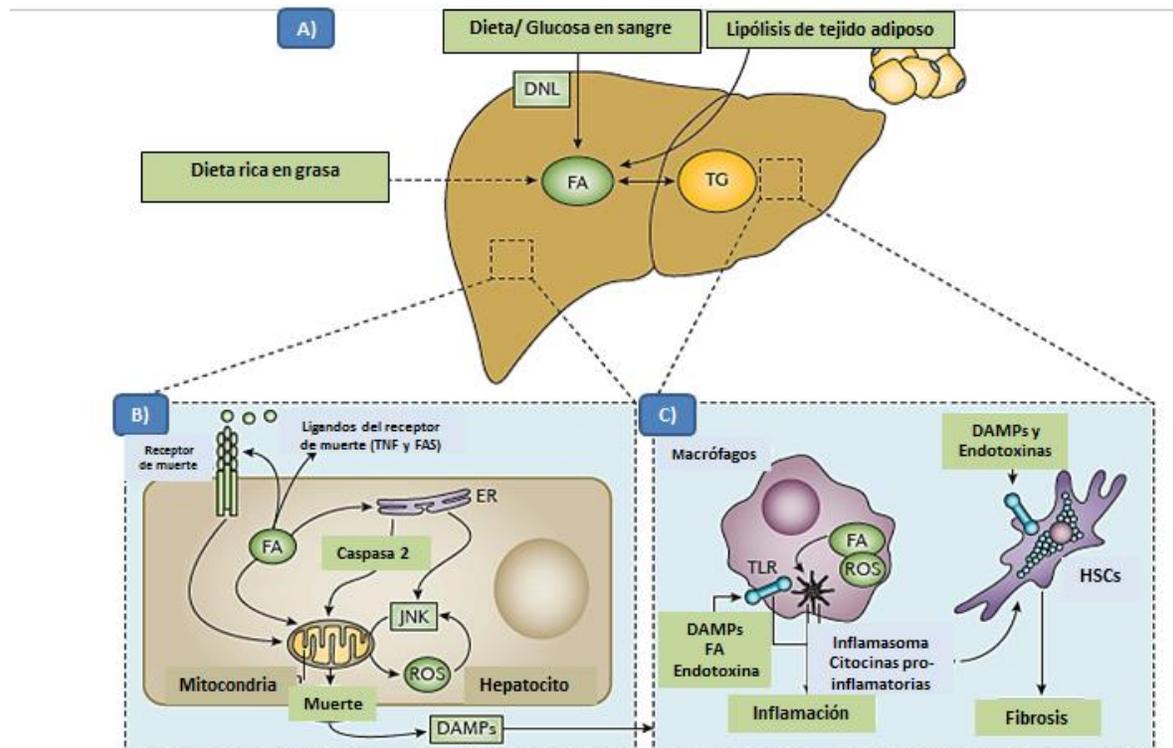


Figura 3. Mecanismo patológico de NASH. 1) Principales fuentes de ácidos grasos: la dieta, la lipogénesis *de novo* y la lipólisis de tejido adiposo. 2) Activación de los receptores de muertes (FAS) debido a la acumulación de ácidos grasos en los hepatocitos promoviendo la liberación de DAMPs. 3) Reconocimiento de las moléculas DAMPs por parte de los receptores TLRs en macrófagos y células estelares, promoviendo el desencadenamiento de la fibrosis [16] **FA:** ácidos grasos, **TG:** Triglicéridos.

Del 20-30% de los pacientes con la EHGNA desarrollan NASH [6], de los cuales el 6% de los casos desarrollan fibrosis [17], mientras que el 20% de ellos tienen el riesgo de desarrollar cirrosis o progresar a hepatocarcinoma celular [10].

2.2.4 Modelo por dieta para el estudio de la EHGNA

Los modelos experimentales desarrollados en roedores pueden proporcionar información valiosa para lograr una mejor comprensión de los mecanismos moleculares responsables de la EHGNA y la NASH, así mismo son importantes para comprender la etiología de esta enfermedad y son necesarios para el desarrollo de terapias eficientes [18].

Los diferentes modelos de inducción de la EHGNA/NASH se pueden clasificar en:

- 1.- Modelos con incremento en la liberación de ácidos grasos en el hígado.
- 2.- Modelos con incremento en la lipogénesis *de novo*.
- 3.- Modelos con oxidación lipídica reducida.
- 4.- Modelos con reducción en la secreción de las lipoproteínas VLDL.
- 5.- Modelos con incremento del colesterol hepático.
- 6.- Modelos con inducción de la inflamación hepática mediante endotoxinas [18].

El modelo experimental de deficiencia en metionina y colina (MCD) es un método nutricional de inducción de la EHGNA, que no genera alteraciones metabólicas [18].

La metionina y la colina son moléculas esenciales para la β -oxidación y la producción de lipoproteínas VLDL, así mismo disminuyen su secreción, desencadenando un aumento en la acumulación de lípidos en el hígado [19]. Algunas características del modelo que comprueban su eficiencia al inducir la EHGNA son: aumento en la producción de citocinas y quimiocinas, muerte celular y un aumento en el estrés oxidante, que en conjunto contribuyen al daño del tejido hepático. Sin embargo el estrés oxidante se puede ver atenuado por el aumento en la capacidad antioxidante del hígado atenuando el grado de esteatohepatitis [11].

Se ha observado un aumento progresivo de las concentraciones en suero de las enzimas alaninaminotransferasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) después de

la semana 2 [19], mientras que la presencia de esteatohepatitis ocurre alrededor del día 10 [11] y se observa fibrosis entre la semana 8-10 en ratones, así como el hinchamiento de hepatocitos de la semana 2 a la 8 [19]. Por otro lado la literatura reporta que a las 10 semanas continuas de dieta, hay presencia de esteatosis macrovesicular distribuida en la mayoría del parénquima hepático excepto en la zona periportal, también hay focos necro-inflamatorios con presencia de neutrófilos y linfocitos.

Kirsch *et al.* [20] encontraron una relación entre la severidad de la NASH y el sexo o la especie del modelo, donde las ratas de la cepa Wistar muestran mayor esteatosis mientras que los ratones macho de la cepa C57BL/6 tienen mayor desarrollo de necrosis e inflamación.

El modelo MCD se encuentra ampliamente descrito en la literatura, entre algunas de las características propias del modelo destacan la disminución significativa del peso, aproximadamente del 20% después de la 3ra. semana de dieta; presenta baja glucosa sérica en ayuno, alta sensibilidad periférica a la insulina, disminución de las concentraciones séricas de leptina e insulina, así como el incremento de adiponectina sérica [11].

2.2.5 Fibrosis

La fibrosis es una respuesta cicatrizal ante el daño celular o tisular presente durante la progresión de distintas hepatopatías como la EHGNA. Esta respuesta se caracteriza por la acumulación de matriz extracelular (ECM) en el parénquima hepático [21]. El proceso fibrogénico involucra la activación y proliferación de las HSCs, la respuesta inflamatoria hepática, la autofagia anormal, la supervivencia y la muerte de hepatocitos [22]. La fibrosis puede ser un proceso reversible si el agente patogénico es retirado, sin embargo, si éste se perpetúa en un proceso crónico a lo largo de 20 a 40 años, puede culminar en cirrosis y HCC [2].

En general la ECM forma parte de la cápsula de Glisson, el tracto portal, las venas centrales y el sub-endotelio del espacio de Disse. El hígado se encuentra principalmente estructurado por colágenas, proteoglicanos, laminina y fibronectinas. Bajo condiciones de salud, los tipos de colágena que predominan son el tipo IV y VI, sin embargo tras sufrir daño hepático, la ECM sufre disrupción, provocando que ésta sea remplazada por colágenas tipo I, tipo III y fibronectinas [2].

Así mismo la ECM involucra una serie de moléculas y factores de crecimiento como: el factor de crecimiento transformante (TGF- β), las fibronectinas, el factor de necrosis tumoral (TNF- α), las colágenas, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y la interleucina 2 (IL-2). En conjunto dichas moléculas unidas a la ECM previenen la apoptosis en el tejido hepático dañado, así como la proteólisis de los factores de crecimiento; aunado a esto, la ECM modula la activación y proliferación de HSCs, la angiogénesis y la actividad de factores de crecimiento y metaloproteinasas de matriz (MMPs) [2].

Las HSCs son células residentes en el espacio de Disse y representan 15% del número total de células en el tejido hepático [23]. Las HSCs sirven como depósito de almacenamiento del 80% total de retinoides (vitamina A y metabolitos) en todo el cuerpo, los cuales regulan distintas actividades celulares como la proliferación, diferenciación, morfogénesis y tumorigénesis [24].

En el hígado sano las HSCs se mantienen en estado no proliferativo con fenotipo quiescente conservando sus depósitos de retinol [21], pero al ser sometidas a daño, las HSCs son activadas y se diferencian al fenotipo de miofibroblasto (Fig. 5) [21], las células pierden su depósito de vitamina A [2, 24], incrementando su capacidad proliferativa, aumentando su contractilidad y favoreciendo la liberación de citocinas proinflamatorias y quimioatrayentes; así mismo las HSCs mejoran su capacidad migratoria y promueven la síntesis de ECM [2, 21, 24]. En un estudio se

ha reportado que la colágena tipo I es el principal componente sintetizado al observarse un porcentaje de producción de 88.2%, seguido de la colágena tipo III (10.4%) y tipo IV (1.4%) [24]. Así mismo se ha reportado un aumento en la síntesis de MMPs y sus respectivos inhibidores tisulares (TIMP) por parte de las células HSCs activadas [24].

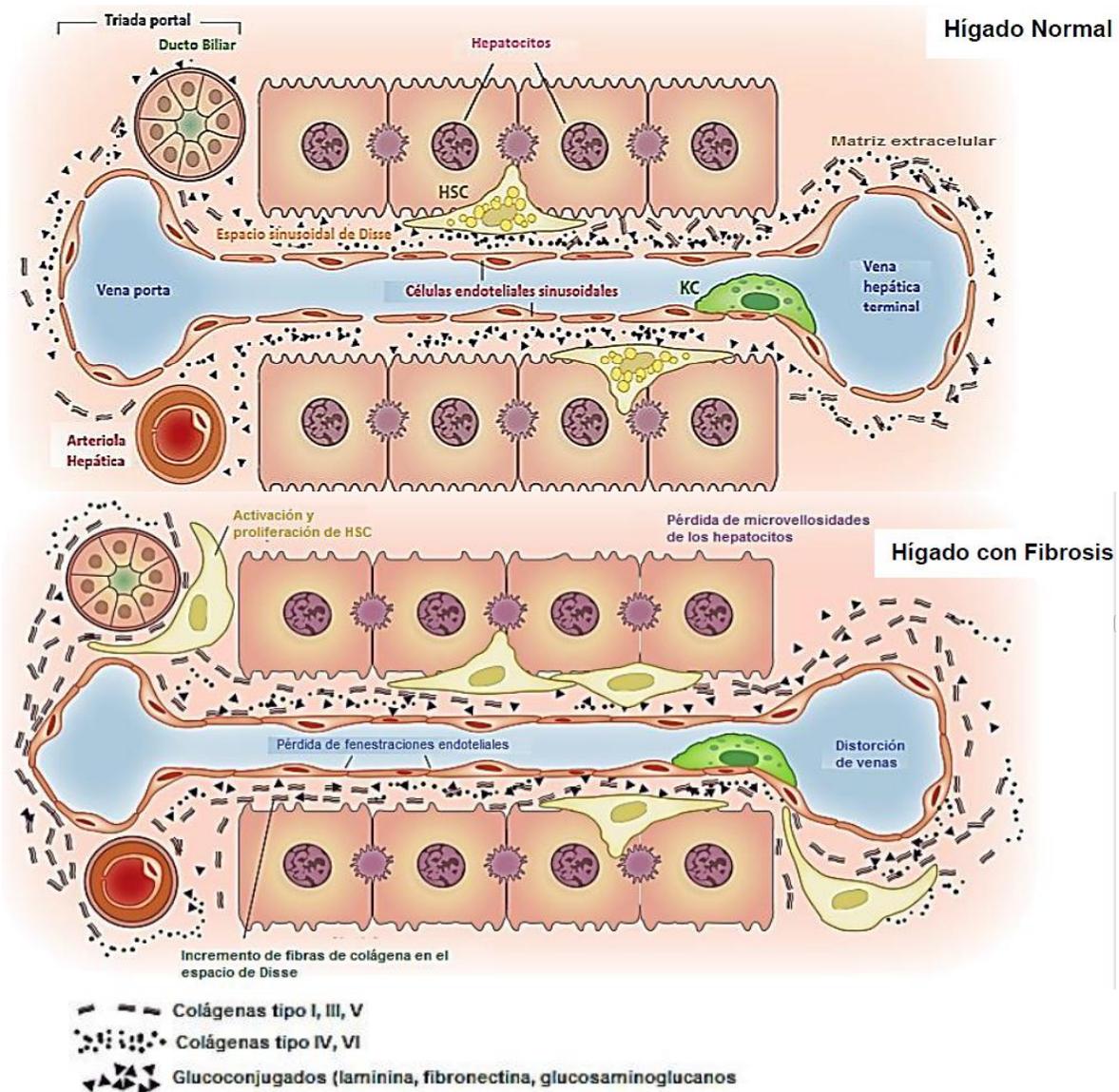


Figura 4. Cambios en la microestructura hepática durante el proceso fibrótico. Se observan los principales cambios durante la fibrosis como son la pérdida de fenestraciones, el aumento en la ECM por la colágena tipo I y tipo III, la activación de las HSCs y la pérdida de los depósitos de retinol [2].

La activación de HSCs se da en 2 fases. La fase de iniciación, es el estado proinflamatorio, donde suceden los cambios en la expresión genética y fenotípica; es resultado de la estimulación parácrina (Tabla 1) proveniente del daño de las células parenquimales [2].

Si la estimulación se mantiene el proceso progresa a la fase de perpetuación, esta fase se encuentra regulada por la estimulación autócrina y parácrina (Tabla 2). La perpetuación involucra 6 diferentes cambios en el comportamiento de las HSCs: proliferación, quimiotaxis, fibrogénesis, contractilidad, degradación de matriz y pérdida de retinoides [2].

Tabla 1. Factores parácrinos involucrados en la iniciación de la activación de HSCs.

Fuente celular	Factor parácrino
Hepatocitos	Peróxidos lipídicos, TGF- β 1, TGF- α , IL-6, IGFBP, M-CSF, GM-CSF
Células de Kupffer	TGF- β 1, TGF- α , IL-6, TNF- α , PDGF, gelatinasa B
Células endoteliales	TGF- β 1, ET-1, PDGF, fibronectina celular, TGF- β 1 activado
Plaquetas	PDGF, TGF- β 1, EGF
Linfocitos	TGF- α , Interleucinas
Monocitos	TNF- α , TGF- β 1, PDGF

TGF: Factor de crecimiento transformante, **M-CSF:** Factor estimulante de colonias de macrófagos, **GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, **ET-1:** Endotelina 1, **EGF:** Factor de crecimiento epidermal [25].

Tabla 2. Factores parácrinos y autócrinos involucrados en la perpetuación de la activación de HSCs.

Cambios funcionales	Factores
Proliferación	PDGF, EGF, TGF- α , bFGF, RANTES, IGF-I, CTGF
Quimiotaxis de células estelares	PDGF, bFGF, IGF-I, M-CSF, MCP-1
Quimiotaxis leucocitaria	M-CSF, MCP-1
Fibrogénesis	TGF- β 1, acetaldehído, retinoides, IL-1 β , IL-6, TNF- α
Contractilidad	ET-1, PAF, Óxido nítrico, trombina
Degradación de matriz	MMP-2+MMP-9 Degradación normal de ECM. \downarrow actividad MMP-1 (Degradación de ECM) \uparrow expresión TIMP-1
Pérdida de retinol	\downarrow ligandos para RAR+ RXR

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo, **bFGF:** Factor de crecimiento de fibroblasto básico, **MCP-1:** Proteína quimioattractora de monocitos-1, **PAF:** Factor activador de plaquetas [25].

Para predecir el grado de fibrosis o la progresión de la EHGNA Kleiner *et al.* [27] propusieron una clasificación basada en el daño histopatológico observado en el tejido hepático, con algunos hallazgos histológicos como la cantidad de esteatosis, el balonamiento de hepatocitos o el infiltrado inflamatorio (Tabla 3-A), así como el grado de fibrosis dependiendo del área del parénquima hepático en donde se haya desarrollado (Tabla 3-B).

Tabla 3. Estimado de la progresión de la EHGNA.

A. EHGNA Score Activity (NAS)		
Apariencia patológicas	Rasgo patológico	Puntuación NAS
Esteatosis	< 5%	0
	5%-33%	1
	33%-66%	2
	>66%	3
Inflamación lobular	Ningún foco	0
	<2 focos por campo 200x	1
	2-4 focos por campo 200x	2
	> 4 focos por campo 200x	3
Balonamiento	Ninguno	0
	Pocas células balonadas	1
	Muchas células balonadas	2
Diagnóstico patológico	Puntuación final	
Sin la EHGNA	0	
Esteatosis simple	1-2	
NASH limítrofe	3-4	
NASH definitivo	5-6	
B. Puntuación de fibrosis		
Puntuación	Descripción	
F0	Sin fibrosis	
F1A	Fibras en zona perisinusoidal leve	
F1B	Fibras en zona perisinusoidal moderada	
F1C	Fibras en zona portal	
F2	Fibras en zona portal y perisinusoidal	
F3	Fibrosis naciente	
F4	Cirrosis	

EHGNA: Enfermedad de hígado graso no alcohólico, **NASH:** Esteatohepatitis no alcohólica. Tomada de [26, 27].

2.3 Sistema de factores de crecimiento insulinoide

El sistema de factores de crecimiento insulinoide IGFs se encuentra conformado por los factores de crecimiento (IGF-I e IGF-II) por las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP) que regulan su actividad, por los receptores de IGFs y las proteasas de IGFBPs [28]. En conjunto, dichas moléculas están involucradas en la regulación de la proliferación y crecimiento de las células somáticas del organismo [29] y su acción es ejercida a través de la estimulación endócrina, parácrina y autócrina [30]. Así mismo se ha reportado la presencia de proteínas de baja afinidad denominadas proteínas relacionadas a IGFBPs (IGFBP-rp 1-10) [31, 32].

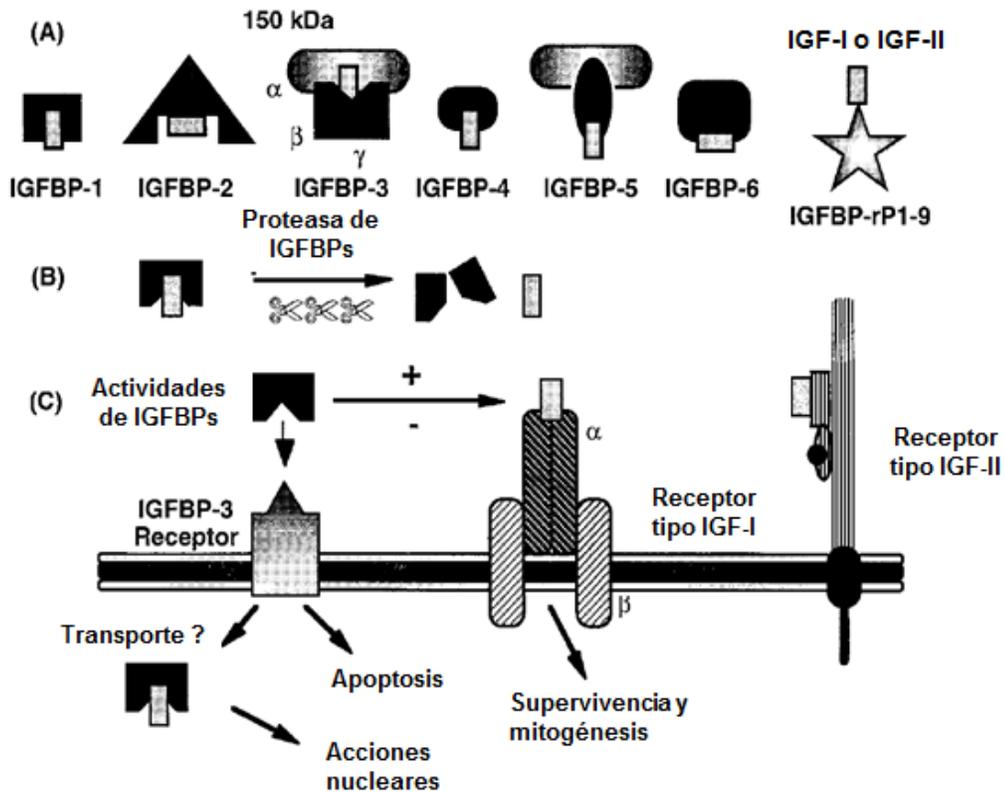


Figura 5. Sistema de crecimiento insulinoide. (A) Proteínas de alta afinidad (IGFBP-1-6) unidas a los factores IGFs, las cuales regulan la actividad y biodisponibilidad en estado libre de dichos factores. Mientras que las proteínas relacionadas a IGFBP (IGFBP-rPs) son baja afinidad a los factores IGFs. **(B)** Las proteasas específicas de IGFBPs regulan las concentraciones de IGFs en estado libre y las concentraciones de IGFBPs acopladas a IGFs. **(C)** Las IGFBPs presentan dos tipos de actividades, las dependientes de IGFs y acciones independientes de los factores IGFs [29].

Las IGFBPs son una familia de proteínas estructuradas por 3 dominios constantes: el dominio N-terminal conservado, el dominio *linker* altamente variable y el dominio C-terminal conservado. Así mismo presentan alta afinidad hacia los factores IGFs, la mayoría de las IGFBPs presentan mayor afinidad a IGF-I, excepto IGFBP-6, la cual tiene mayor afinidad hacia IGF-II [29]. Las IGFBPs no sólo funcionan como acarreadores de los IGFs, también prolongan su vida media, su biodisponibilidad y su actividad en el organismo.

Por otro lado se han mostrado evidencia de la asociación directa de las IGFBPs con una gran variedad de moléculas extracelulares de superficie, la cual representa una importante actividad biológica como lo es la modulación de la proliferación celular ósea y la detención del ciclo celular en cáncer de mama y próstata [28].

Funciones generales de IGFBPs:

- Limitar la biodisponibilidad de los IGFs libres para unirse a sus receptores.
- Previenen la hipoglucemia inducida por IGF.
- Regula el transporte de IGFs en los espacio intra y extravascular.
- Prolonga la vida media de IGFs en circulación.
- Afecta la proliferación y la muerte celular vía receptores IGFBPs.
- Presenta acciones nucleares [29, 33].

2.4 Proteína IGFBP-7

La proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide 7 (IGFBP-7), también conocida como proteína relacionada a las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide-1 (IGFBP-rP1) y MAC 25, corresponde al grupo de proteínas acarreadoras de baja afinidad por IGF-I [34], tiene un peso aproximado de 30 kDa [35]. Es una proteína implicada en la estimulación de diversos procesos

celulares, como proliferación, apoptosis, senescencia [36], diferenciación, adhesión y angiogénesis [34].

El gen de IGFBP-7 se encuentra en el cromosoma 4q12; se sabe que la IGFBP-7 de ratón presenta el 94.4% de similitud y el 87.5% de identidad de nucleótidos con respecto a la IGFBP-7 humana [31].

La proteína IGFBP-7 tiene un 30% de homología en los aminoácidos con las otras 6 IGFBPs [35], así mismo difiere de las proteínas de alta afinidad en que carece de las cisteínas conservadas en el C-terminal, sólo posee una cisteína [31, 37] por lo que su afinidad hacia IGF-I es 100 veces menor con respecto a las demás proteínas [34, 37]; sin embargo tiene alta afinidad hacia la insulina [38]. Entre sus funciones independientes de IGFs se ha reportado a IGFBP-7 como un potencial gen supresor de tumores [37], favoreciendo el pronóstico de una amplia gama de cánceres [36] incluyendo el HCC [37].

El gen de IGFBP-7 está altamente expresado en las células senescentes del epitelio mamario, por lo que está ampliamente relacionada con la senectud [39]. Algunos estudios han mostrado evidencia del papel de IGFBP-7 en la supresión del cáncer de mama mediante la inducción de senescencia y apoptosis en las células tumorales [40]. Por otro lado se ha reportado que la secreción de IGFBP-7 en células mesenquimales estelares induce senescencia prematura [41].

Se ha sugerido un importante papel de la IGFBP-7 sobre la fibrosis hepática [31], Guo *et al.* [31, 38] evaluaron las concentraciones de IGFBP-7 en todo el hígado observando que éste presenta menores concentraciones con respecto los encontrados en las HSC activadas, lo cual indica que éstas podrían ser la fuente de mayor contribución de IGFBP-7 en el hígado.

En otros estudios, Liu *et al.* [42] evaluaron la expresión de IGFBP-7 en diferentes estadios de la activación de HSC por exposición de distintas citocinas y mostraron la sobreexpresión de esta proteína en pacientes con fibrosis y cirrosis, asociada al incremento de ECM.

IGFBP-7 puede inducir la diferenciación en HSCs de la fase quiescente a la fase activada; aunado a esto, la proteína inhibe la apoptosis de HSCs activadas, Boers *et al.* [43] demostraron que al exponer a las HSCs activadas *in vivo* al anticuerpo anti-IGFBP-7 se induce el proceso apoptótico en estas células.

Por lo tanto se ha reportado que una sobreexpresión de IGFBP-7 contribuye a la activación de HSCs y a la fibrosis hepática.

5.3 Senescencia celular

Continuamente el organismo se encuentra expuesto a múltiples agentes causantes de daño y estrés celular; como consecuencia de esto la célula desarrolla una serie de mecanismos reversibles para reparar el daño, o de forma irreversible al llevar a cabo un proceso apoptótico o de senescencia celular. Para discernir entre uno u otro de los procesos irreversibles depende de la cantidad de estrés al cual se encuentre sometida la célula [44].

La senescencia celular es un mecanismo de prevención del cáncer que limita la proliferación de la célula dañada al detener su ciclo celular actuando como respuesta fisiológica para la protección del organismo, promoviendo que las células senescentes sean subsecuentemente removidas [45].

Las células senescentes presentan algunas características que las evidencian, como su alargamiento y el de su núcleo [45], detienen su proliferación debido al paro de su ciclo celular por efecto de los inhibidores de las cinasas dependiente de ciclina (CDKs) y de los puntos de control (p16, p21) [44], particularmente sobre el DNA contenido en la fase G1 ya que se encuentra metabólicamente activo [46].

Otros marcadores moleculares característicos de la senescencia son: los focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF), los focos de daño a DNA asociados a senescencia (SADF), la producción de ROS [45], la alteración en la expresión de algunos genes como p16, p21 y p53 [46, 47] así como la alteración en la actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal). La β -galactosidasa es una enzima lisosomal que en condiciones de salud se encuentra activa a pH 4.0-4.5, pero durante la senescencia SA- β -gal es detectada a pH 6.0 [44].

La senescencia acelerada o senescencia prematura inducida por estrés (SIPS), resulta como consecuencia de las condiciones de estrés a las cuales se encuentra sometida la célula (radiación, estrés osmótico, estrés oxidante, metales pesados, choque térmico, etc.) [44] favoreciendo la secreción de diversas moléculas y factores inflamatorios (Tabla 4), lo cual se denomina fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP), el cual será secretado hacia las células vecinas de forma parácrina promoviendo la acumulación de células senescentes.

Tabla 4. Factores comúnmente secretados por el SASP en células senescentes.

Interleukins (IL) IL6 IL7 IL1a, IL1b IL13 IL15	Growth regulators/factors Amphiregulin Epiregulin Heregulin EGF β FGF HGF KGF (FGF7) VEGF Angiogenin SCF SDF1 PIGH IGFBP-2, -3, -4, -6, -7	Proteases and regulators MMP-1, -3, -10, -12, -13, -14 TIMP-2 PAI-1, -2; tPA; uPA Cathepsin B
Chemokines (CXCL, CCL) IL8 GRO- α , - β , - γ MCP2 MCP4 MIP1a MIP3a HCC4 Eotaxin-3	Non-protein soluble factors PGE2 Nitric oxide	Soluble receptors/ligands ICAM-1, -3 OPG sTNFRI TRAIL-R3, Fas, sTNFRII uPAR SGP130 EGF-R
Other inflammatory factors GM-CSF MIF		Insoluble factors (ECM) Fibronectin Laminin, Collagen

GRO: Oncogén regulado por crecimiento, **MIP:** Proteína inflamatoria de macrófagos, **HCC4:** CC-quimiocina-4, **MIF:** Factor inhibidor de la migración de macrófagos, **KGF:** Factor de crecimiento de queratinocitos, **SCF:** Factor de células troncales, **SDF:** Factor derivado de células mesenquimales, **PIGH:** Fosfatidilinositol N-acetilglucosaminiltransferasa subunidad H, **PGE:** Prostaglandinas, **tPA:** Activador del plasminógeno tisular, **TRAIL-R:** Receptor de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, **sTNFRI:** Receptor I del factor de necrosis tumoral soluble, **PIGH:** Fosfatidilinositol N-acetilglucosaminiltransferasa subunidad H, **PAI-1:** Inhibidor-1 del activador del plasminógeno, **ICAM:** Molécula de adhesión intercelular 1 [45].

Después de que las células sufren un daño agudo y adquieren el fenotipo senescente, son eliminadas por el sistema inmune innato, sin embargo si el daño se perpetúa comienza una generación continua de células senescentes que provocan la alteración del sistema de eliminación (inmunosenescencia), desencadenando un proceso de senescencia crónica que promueve la disfunción del tejido y la promoción del tumor [45].

Dentro de las enfermedades hepáticas crónicas se ha observado experimentalmente *in vivo* e *in vitro* la relación de la senescencia de hepatocitos, colangiocitos, células estelares y células inmunes con la progresión de algunos desórdenes hepáticos crónicos en líneas celulares, modelos animales y humanos [45]. Aloysius *et al.* [48] demostraron una relación entre la senescencia de los hepatocitos y la predicción del grado de la enfermedad en pacientes con y sin diabetes, por lo que se corrobora la participación de la senescencia celular en el avance patológico de diversas hepatopatías.

3. Planteamiento del problema

En México se ha observado un incremento en la prevalencia de obesidad y sobrepeso [10]. Factores como el sedentarismo, la dieta hipercalórica y los cambios en el estilo de vida, han llevado al desarrollo de enfermedades crónicas como hipertensión, dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico [6]. Derivado de esta epidemia de enfermedades metabólicas, la prevalencia de la EHGNA se ha visto aumentada en la última década, siendo la hepatopatía más frecuente.

Algunas moléculas como las IGFBPs han sido ampliamente relacionadas con diversas hepatopatías crónicas. Dentro de nuestro grupo de investigación se estudió el comportamiento de las IGFBPs (1-7) durante la EHGNA en pacientes obesos mórbidos [49], siendo la IGFBP-7 la proteína con mas cambios durante la enfermedad.

Cabe destacar que IGFBP-7 es la proteína con mayor afinidad a insulina con respecto a las demás IGFBPs [38] lo cual sugiere un papel de gran relevancia en las enfermedades relacionadas al metabolismo de glucosa, como la diabetes o la resistencia a insulua, siendo éstas últimas grandes factores de riesgo para el desarrollo de la EHGNA [9]. Por lo cual hemos de considerar estudiar la expresión de IGFBP-7 durante la progresión de la EHGNA.

4. Justificación

Teniendo en consideración el papel de la proteína IGFBP-7 en procesos de senescencia celular de hepatocitos y HSCs [50], así como la transdiferenciación *in vitro* [42] y activación de HSCs en diversas hepatopatías fibrogénicas [43], se sugiere que IGFBP-7 podría tener un papel relevante sobre la EHGNA ya que ésta progresa simultáneamente con el desarrollo de fibrosis.

Por ello se medirá la expresión de IGFBP-7 durante la EHGNA en un modelo murino y se observará su relación con la cantidad de células senescentes y el progreso de la fibrosis, con el fin de encontrar cambios en su expresión que nos permitan establecer el estadio patológico de la enfermedad.

5. Hipótesis

La expresión de IGFBP-7 durante la activación de HSCs y la senescencia celular puede predecir el estadio de progresión de la EHGNA en un modelo murino, asociándola con la perpetuación del daño que favorece la progresión de la fibrosis.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Estudiar la expresión de IGFBP-7 en el desarrollo de la EHGNA en el modelo murino asociando su expresión a la activación de HSCs y a la senescencia celular de hepatocitos.

6.2 Objetivos particulares

- ✓ Evaluar el porcentaje lipídico en los diferentes estadios de la EHGNA.
- ✓ Establecer el estadio de progresión de la enfermedad mediante clasificación NAS (actividad de EHGNA) y la escala Kleiner-Brunt (desarrollo de fibrosis).
- ✓ Medir la expresión y concentración de IGFBP-7.
- ✓ Evaluar la senescencia celular en los distintos estadios de la EHGNA.

7. Material y métodos

7.1 Animales y condiciones de alojamiento

Se emplearon ratones macho de la cepa C57BL/6, con peso aproximado entre 18-22 g y 12-16 semanas de edad; los cuales fueron mantenidos y alojados en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM en el Hospital General de México, bajo condiciones de luz y oscuridad alternada cada 12 horas, con una temperatura de 23°C y humedad relativa del 75%. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité de Ética en Investigación del Hospital General de México y cumplieron con las especificaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana **NOM-062-ZOO-1999**: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [51].

7.2 Inducción de la EHGNA y recolección de muestras.

Se formaron 2 grupos de ratones, dentro de los cuales, el primer grupo recibió la dieta suplementada con metionina y colina (MCC) y el segundo grupo la dieta deficiente en metionina y colina (MCD), dichos grupos fueron subdivididos en grupos de 2, 8 y 12 semanas de régimen dietario bajo condiciones *ad libitum*.

Transcurrido el régimen dietario, se sometieron a sacrificio 3 ratones con dieta MCC y 9 ratones con dieta MCD por cada grupo; mediante el exceso de anestecia (Xilacina (Procin, Pisa, México)/Ketamina (Anesket, Pisa, México)) vía intraperitoneal (dosis: 0.4/4.0 mg/kg), con un ayuno de 4h.

Se recolectaron muestras de sangre, así como de tejido hepático para su posterior procesamiento. La sangre total fue centrifugada para obtener muestras de suero; ambas muestras, suero y tejido fueron conservadas a -70°C.

7.3 Evaluación histológica

Para evidenciar la progresión de la enfermedad se remitió al uso de tinciones histológicas con hematoxilina y eosina (HyE), con rojo de sirio (RS) y con rojo oleoso (RO) (Abcam®, EUA) para observar la cantidad de esteatosis, el balonamiento y la inflamación. Para valorar el grado de fibrosis se empleó la tinción tricrómica de Masson (TM).

Para las tinciones HyE y TM el tejido hepático se mantuvo en formaldehído (3.7% en amortiguador fosfato salino (PBS) tras el sacrificio, luego se deshidrató la muestra gradualmente en alcohol de concentraciones crecientes, posteriormente las muestras fueron incluidas en parafina durante 2-3 horas para asegurar su solidificación; posteriormente se obtuvieron cortes de 5 µm con microtomo (Modelo:RM2245, Leica®, Colombia) depositados en portaobjetos. Con respecto a la tinción con RO, para cuantificar el porcentaje de lípidos, el tejido se mantuvo en congelación para su posterior inclusión en el medio de corte de óptima temperatura (O.C.T.) (Leica®, Colombia) y así obtener cortes de 5 µm de grosor con criostato (Modelo: CM 1850 UV Leica®, Colombia).

Las técnicas de cada tinción se detallan en el anexo I.

7.4 Cuantificación de proteínas

Extracción de proteínas

Se pesaron 100 mg de tejido hepático de cada muestra a analizar y se colocaron en tubos para centrífuga de 2 mL, previamente rotulados. Después se realizó la ruptura de la membrana mediante un método físico no mecánico, al someter las muestras a ciclos de congelación y descongelación, repitiendo este ciclo por 5 veces; congelando a -70°C en nitrógeno líquido y descongelando en hielo. Posteriormente, se agregaron 200 µL de PBS estéril a cada tubo y se maceraron

las muestras con ayuda de un jeringa de insulina estéril. A continuación, se centrifugaron a 13,000 g durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, previamente etiquetado. Las muestras proteicas fueron almacenadas a -70°C [52].

Integridad de proteínas totales extraídas

Para asegurar que el proceso de extracción no afectara la integridad de las proteínas se elaboró electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE); con un gel concentrador al 4% [Tris 1.5 mM pH=8.8, acrilamida 4.1 M/ bis-acrilamida 0.05 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, tetrametiletilendiamina (TEMED), persulfato de amonio (PSA) al 10%] y un gel separador al 10% (Tris 1.5 mM pH=6.8, acrilamida 4.1 M/bis-acrilamida 0.05 M, SDS al 10%, TEMED y PSA al 10%). Las muestras fueron preparadas con amortiguador de carga de Laemmli 2X (Bio-Rad®; EUA) mezclado previamente con 50 µL de β-mercaptoetanol, en una proporción 1:9 (muestra:amortiguador); seguida de una incubación a 95°C por 1 min y posteriormente fueron cargadas en el gel. El gel fue teñido con una solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie G250 0.05%, isopropanol al 25% y ácido acético al 7%) y observado con luz visible [52].

Arreglo en suspensión múltiple

Se cuantificó la proteína presente en el tejido hepático y suero mediante el estuche comercial de arreglo en suspensión (MIGFBPMAG-43K Miliplex®, Alemania), este es un multianálisis cuantitativo de perfiles protéicos, empleado para cuantificar la IGFBP-7 en las muestras proteicas obtenidas de los diferentes grupos del modelo murino.

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

Se preparó la placa agregando 200 μL de amortiguador de ensayo en cada pozo; agitándola por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente decantándola, después se añadieron 25 μL de amortiguador de ensayo a los pozos de los estándares, controles y muestras, 50 μL de amortiguador de ensayo a los pozos del blanco, 25 μL de los estándares o controles a los pozos establecidos, 25 μL de las muestras a los pozos de las muestras y 25 μL de las esferas cargadas con el anticuerpo de captura a cada pozo, a continuación se incubó en agitación toda la noche a 4°C.

Al término de la incubación, se realizaron lavados; primero se colocó la placa en el bloque de separación magnética de placas y se dejó 1 min, después se aspiró el contenido de cada pozo, sin quitar la placa del bloque de separación magnética, se añadieron 200 μL de amortiguador de lavado, se agitó la placa (quitándola previamente del bloque), se volvió a poner la placa en el bloque durante 1 min y por último se aspiró el contenido de cada pozo; este proceso se repitió 4 veces más. Después de los lavados, se agregaron 500 μL del anticuerpo de detección en cada pozo y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Enseguida se adicionaron 50 μL de estreptavidina-ficoeritrina, se incubó durante 30 minutos, a continuación se realizaron 5 lavados, se agregaron 100 μL de Sheath Fluid en cada pozo y se realizó la lectura de la placa en el equipo (Luminex 200®) [52].

7.5 Actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal)

Se empleó el estuche comercial de detección de senescencia (Abcam®, EUA) el cual se basa en la detección de la SA- β -gal presente en células senescentes a pH 6. El estuche comercial agrega como sustrato la sustancia X-gal, la cual al ser degradada manifiesta un color azul índigo como producto de la reacción enzimática, evidenciando así la presencia de la senescencia celular. Se realizaron cortes por congelación de 6 μm de grosor fijados a un portaobjetos, posteriormente se le adicionaron 500 μL de la solución fijadora durante 7 min, se

lavó con amortiguador PBS, después se le agregaron 500 μ L de la solución mezcla preparada según el inserto y se dejó incubar toda la noche (14-18h) a 37°C dentro de una bolsa hermética para evitar que las concentraciones de CO_2 producidos, alteraran el pH del sistema afectando el desarrollo del color; transcurrido el tiempo se realizaron lavados con solución salina isotónica. Cabe destacar que el análisis se realizó usando tejido fresco [53-56].

7.6 Análisis morfométrico

Para realizar el análisis morfométrico se tomaron 10 imágenes representativas 10X de la histología de cada hígado en un microscopio (NIKON; Modelo Eclipse TE2000, EUA) con cámara incluida (NIKON; Digital Sight D5U2, EUA) y mediante el programa ImageJ se cuantificó la cantidad de lípidos en la tinción con RO o la actividad de SA- β -gal según fuera el caso.

7.7 Análisis estadístico

Los datos del cambio en el peso corporal fueron analizados mediante una prueba de t-student.

Los resultados del porcentaje de actividad de la SA- β -gal y la cuantificación de IGFBP-7 tanto en suero como en tejido, fueron analizados por pruebas paramétricas, ya que los datos pasaron la prueba de normalidad: ANOVA de una vía con prueba post hock de Tukey.

Se realizaron correlaciones de Pearson para el % lipídico y las concentraciones de IGFBP-7 en suero y tejido.

Los datos de porcentaje de lípidos en la tinción con RO no pasaron la prueba de normalidad, por lo que se empleó por la prueba no paramétrica Kruskal- Wallis y prueba post-hoc de Dunn

Las pruebas estadísticas se realizaron en el programa GraphPad versión 6.01 (Prism; California, EUA) se consideró como significativa una $p \leq 0.05$.

8. Resultados

A) Espectro de EHGNA

Transcurrido el tiempo el régimen dietario se realizó el sacrificio y se extrajo el hígado el cual fue dividido en distintas porciones para los ensayos posteriores.

En la figura 6 se observa el tejido hepático recién extraído, la figura 6A muestra un hígado sano, con una textura lisa y tonalidad brillante, opuesto a las figuras 6B, 6C y 6D en las cuales el daño es evidente, ya que muestran una tonalidad pálida y opaca del tejido, así como una textura rugosa debido a la cicatrización de éste.

En cuanto a la relación hígado-peso corporal del ratón en el grupo MCC fue del 4.07 ± 0.63 %, mientras que en los grupos MCD fue de 4.33 ± 0.57 %, por lo que no se observaron diferencias significativas y en consecuencia no hubo hepatomegalia.

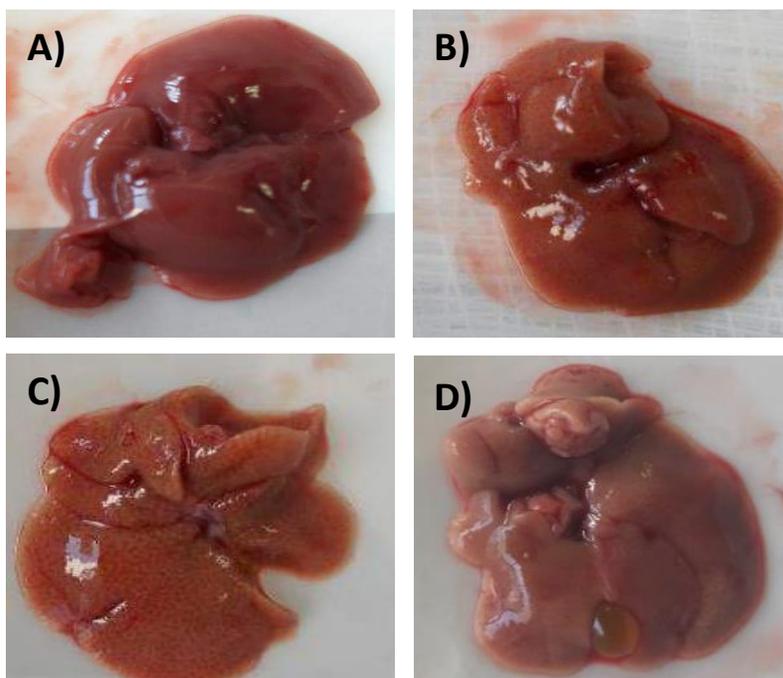


Figura 6. Progresión de EHGNA. A) MCC, B) MCD a las 2 semanas, C) MCD a 8 semanas, D) MCD a 12 semanas. Se muestran los cambios macroscópicos en el tejido hepático como consecuencia de la progresión de la enfermedad, se observó que el daño fue máximo a las 12 semanas.

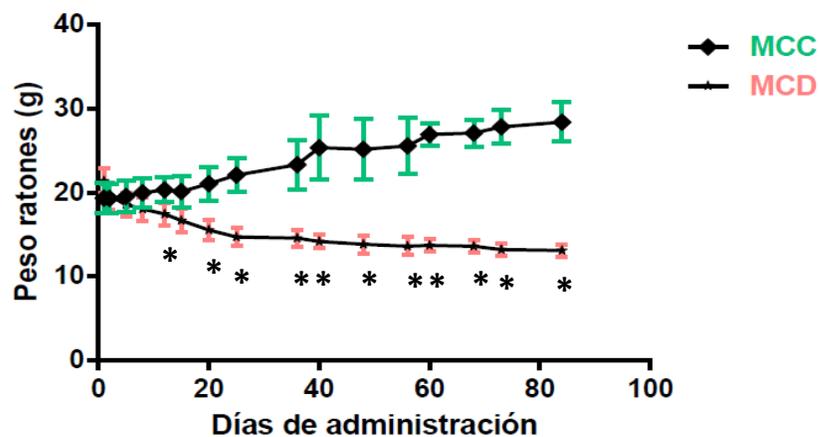


Figura 7. Cambios en el peso corporal en los grupos de la dieta MCC o MCD. Se observó una disminución del peso en los grupos MCD (n=21) con respecto, la cual iba del 20% al 40% con respecto a su peso inicial. Mientras que los grupos MCC (n=9) aumentaban progresivamente su masa. Los datos se muestran media±SD. Se realizó como prueba estadística t de student para cada par de puntos y se consideró *p≤0.05 como significativa.

Se observa en la figura 7 que los ratones del grupo MCC a lo largo del régimen dietario presentan aumento de su peso corporal, por el contrario los ratones del grupo MCD tiene disminución significativa de su masa corporal consecuente del consumo de la dieta desde el día 15.

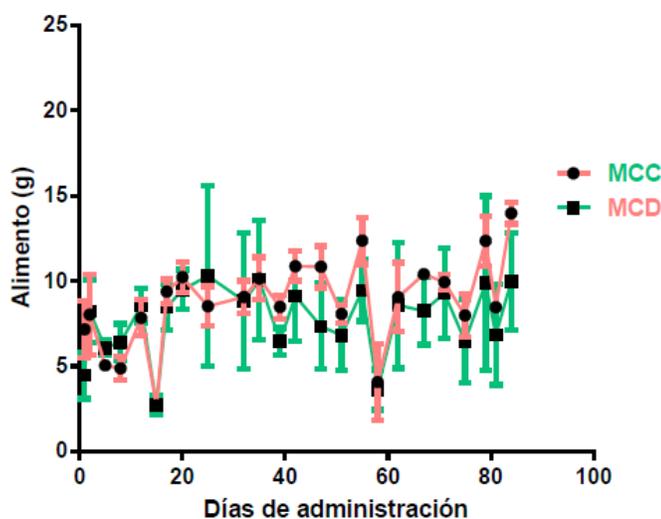


Figura 8. Consumo de alimento en los grupos alimentados con la dieta MCC o MCD. Se observa gran variabilidad entre la cantidad de dieta ingerida entre los grupos MCD (n=21) en las distintas cajas, mientras que en los grupos MCC (n=9) el consumo entre cajas es muy similar. Los datos se muestran media±SD.

En la figura 8 no se observa variación en el consumo de la dieta entre los grupos.

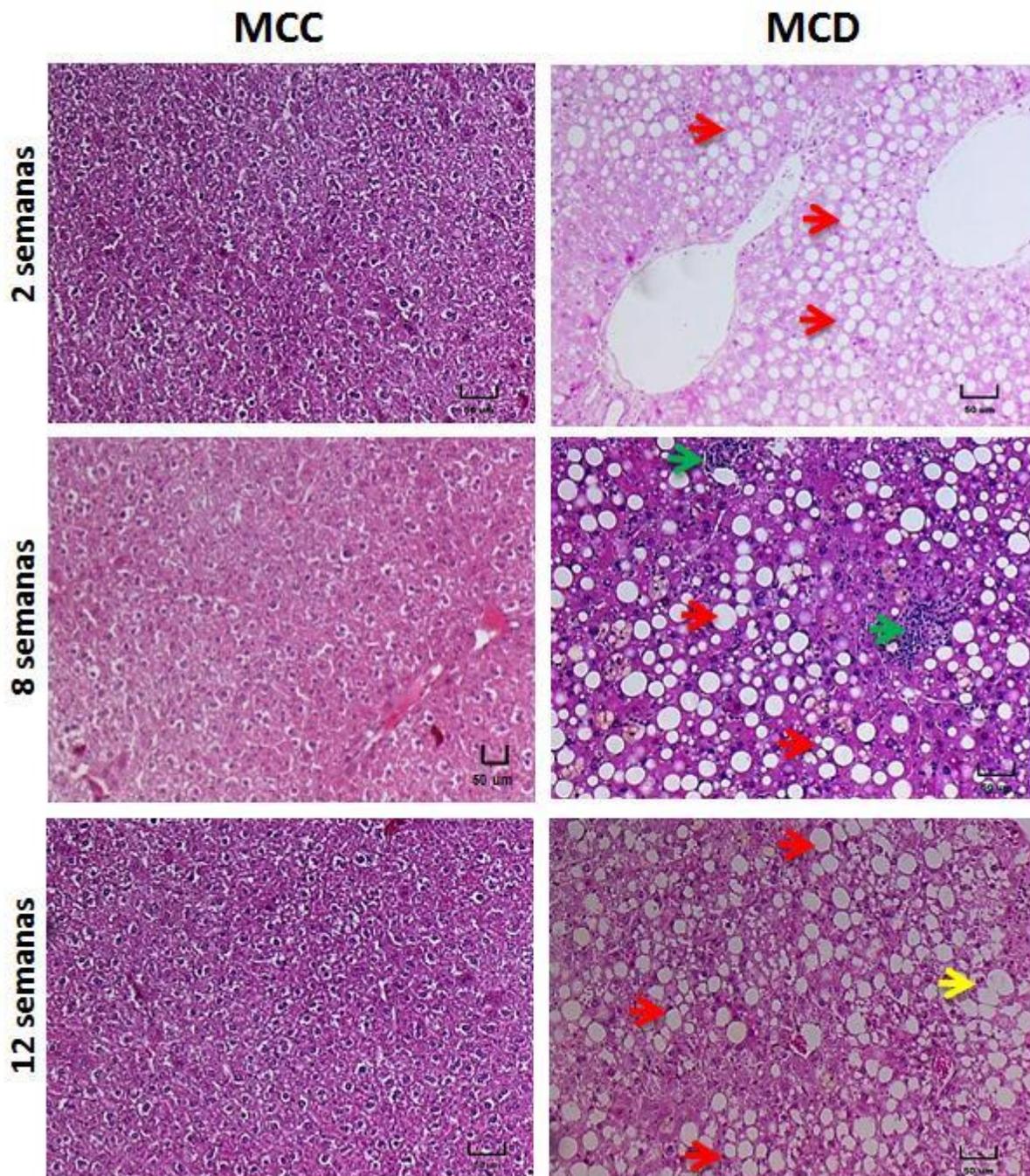


Figura 9. Evaluación histológica de la progresión de la EHGNA con tinción de HyE. Se observa que los grupos MCC (n=27) a los distintos tiempos, presentan una microestructura ordenada, sin alteraciones histológicas. Mientras que los grupos MCD (n=54) tienen la presencia de esteatosis (flechas azules), la cual se ve aumentada conforme al tiempo de tratamiento; la presencia de infiltrado inflamatorio (flechas verdes) y hepatocitos balonados (flechas amarillas) se observa en los grupos MCD8 y MCD12. *Imágenes representativas, aumento 10X, escala 50 μ m.*

En la figura 9, se observan algunos rasgos histológicos marcados con flechas, como lo son: esteatosis (flechas rojas), balonamiento hepático (flechas amarillas) y presencia de infiltrado inflamatorio (flechas verdes) a los 3 tiempos de tratamientos de la dieta MCD.

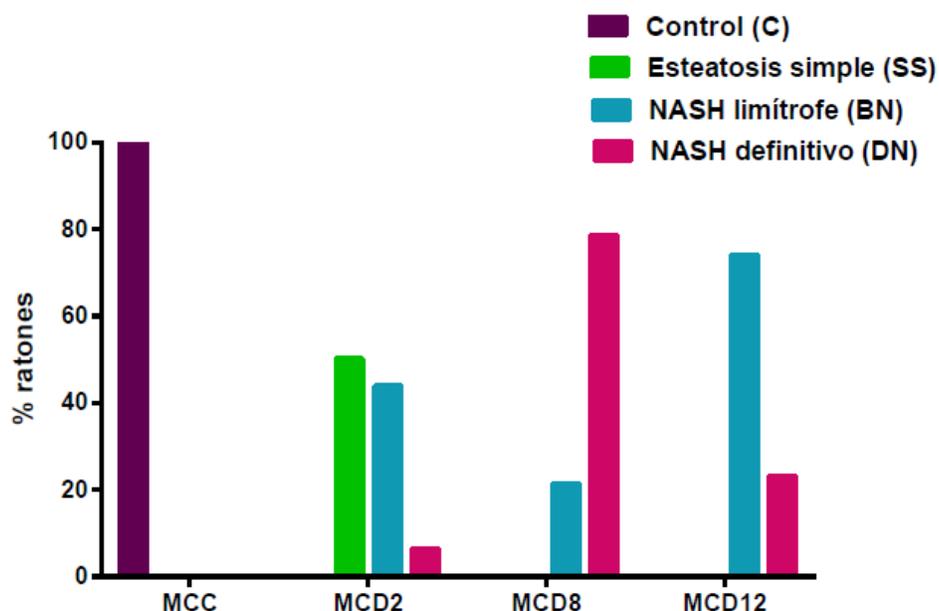


Figura 10. Prevalencia de EHGNA. Se empleó la clasificación en la escala de actividad de EHGNA (NAS). **MCC=** control, **MCD2=** Dieta MCD a 2 semanas, **MCD8=** Dieta MCD a 8 semanas, **MCD12=** Dieta MCD a 12 semanas. MCC (n=27), MCD (n=54).

Los ratones de los grupos MCC y MCD a 2, 8 y 12 semanas de administración fueron clasificados mediante la escala NAS, considerando el daño histológico observado en la tinción H-E. La prevalencia de la EHGNA en sus distintos estadios respecto al tiempo de administración de la dieta MCC/MCD se presentan en la figura 10. En el grupo MCC ninguno de los ratones a los diferentes tiempo presentó EHGNA; mientras que en los grupos MCD el daño comienza a progresar desde la semana 2. En el grupo MCD2 se observan individuos con esteatosis simple (SS), NASH limítrofe (BN) y otros con NASH definitivo (DN); aumentando la prevalencia en la de DN en MCD8, pero mostrando una reversión en MCD12 al disminuir el número de ratones con DN y aumentar los casos con BN. A partir de

este punto los resultados se muestran de acuerdo a la severidad de la enfermedad bajo la clasificación NAS.

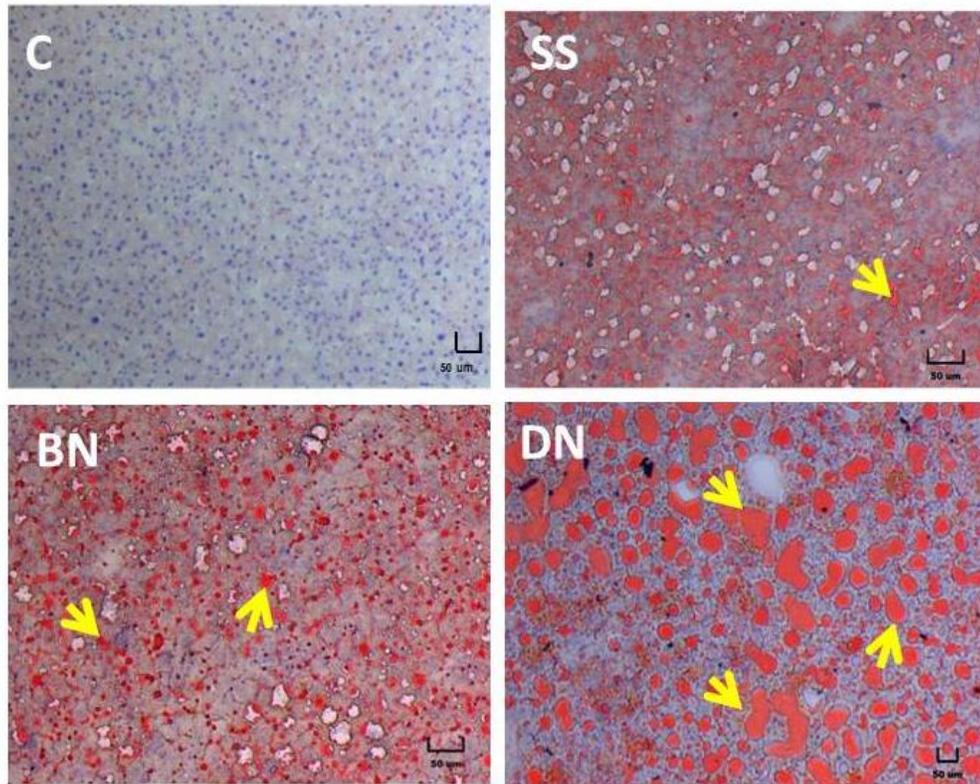


Figura 11. Evaluación del porcentaje lipídico. Permite observar la presencia de vacuolas lipídicas en el parénquima hepático, se muestran señaladas con flechas amarillas **C**: No hay presencia de vacuolas lipídicas, **SS**: Hay presencia de pequeñas gotas de lípidos, **BN**: Hay mayor cantidad de lípidos comparado con MCD2, **DN**: El incremento de vacuolas lipídicas es visualmente mayor a los demás grupos. **C**= Control, **SS**= Esteatosis simple, **BN**= NASH limítrofe, **DN**= NASH definitivo. *Imágenes representativas, aumento 10X, escala 50 µm.*

En la figura 11 se observa un aumento en la acumulación lipídica en los estadios de progresión de la EHGNA, consecuente del régimen dietario.

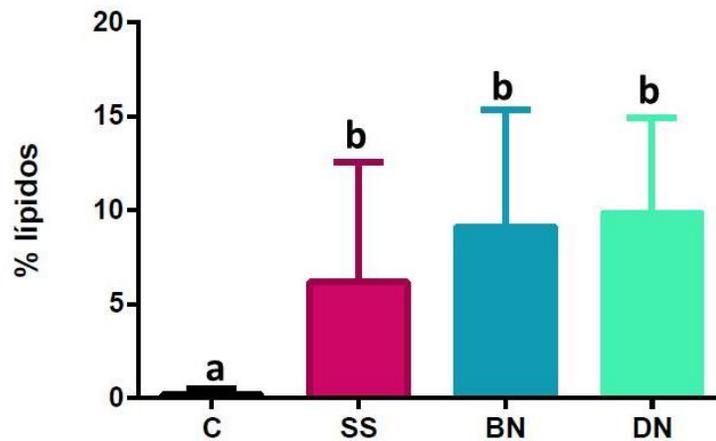
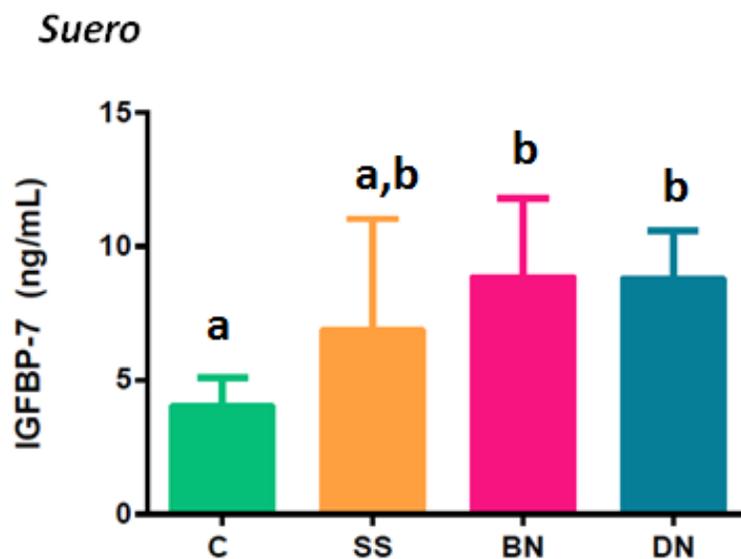


Figura 12. Contenido de lípidos respecto a su estadio de progresión. Se presenta la cantidad de lípidos distribuidos en el parénquima hepático observado por la tinción RO. Se cuantificó mediante el programa ImageJ. Los valores se muestran como la media±SD y realizó Kruskal-Wallis con prueba post-hoc Dunn. $p < 0.05$, significativa para barras que no comparten letras. **C**= Control (n=18), **SS**= Esteatosis simple (n=5), **BN**= NASH limitrofe (n=18), **DN**= NASH definitivo (n=8).

En la figura 12 se observa que la cantidad de lípidos en el parénquima hepático aumenta progresivamente en los distintos estadios de la EHGNA en comparación con el grupo control, sin embargo entre ellos, no hay variaciones significativas. Por otro lado se evaluaron las concentraciones de IGFBP-7 en suero y en tejido, las cuales fueron correlacionadas con el grado de progresión de la enfermedad

A)



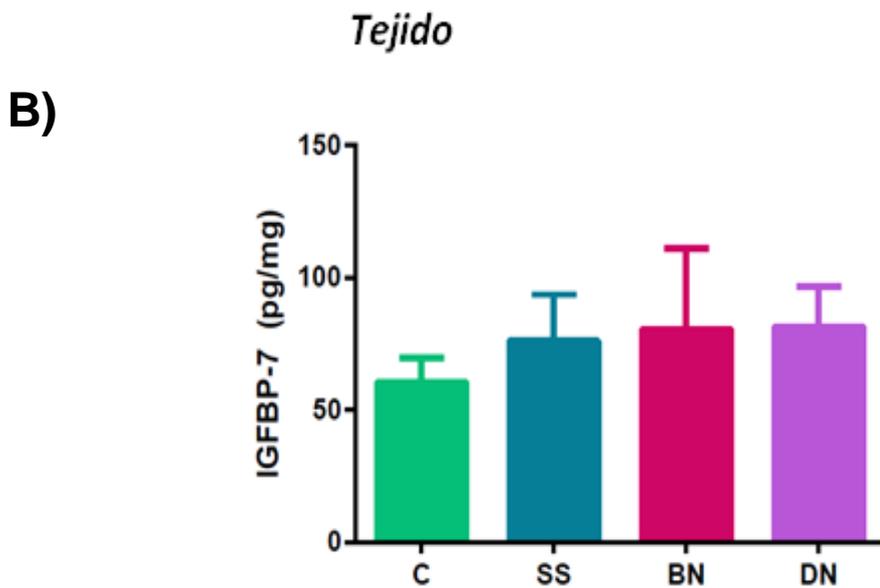


Figura 13. Concentraciones de IGFBP-7 en suero y tejido relacionada con el estado de EHGNA. Los datos se muestran como Media \pm SD. **A) Suero.** El análisis estadístico fue a través de ANOVA de una vía seguida, de una prueba Tukey como post-hoc. **B) Tejido.** El análisis estadístico fue a través de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey como post-hoc. $p < 0.05$ como significativa para barras que no comparten letras. **C=** Control (n=12), **SS=** Esteatosis simple (n=4), **BN=** NASH limitrofe (n=9), **DN=** NASH definitivo (n=6).

Se observa un aumento en las concentraciones de IGFBP-7 en los grupos BN y DN comparados con el control, sin embargo entre ellos no presentan diferencia; por otro lado las concentraciones de IGFBP-7 en SS no muestran diferencia respecto a ningún otro grupo de estudio. Mientras que en tejido no se observan cambios en las concentraciones de IGFBP-7.

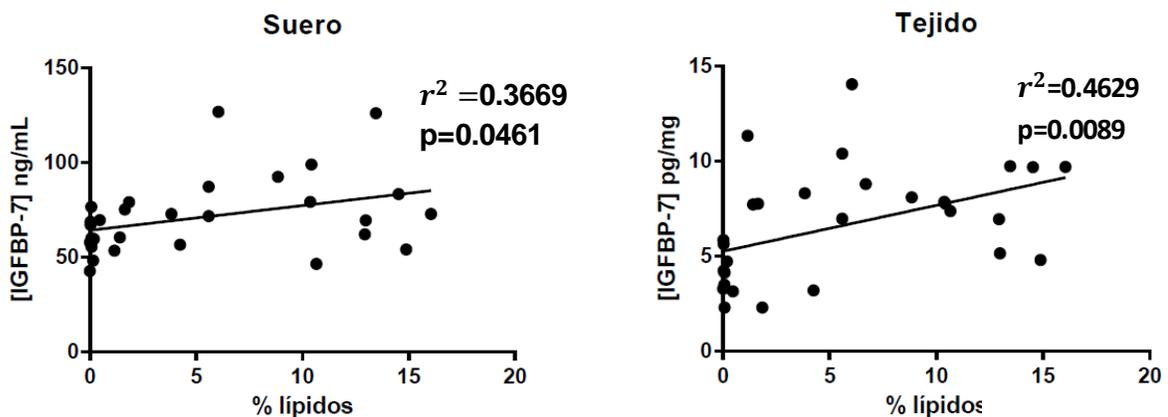


Figura 14. Correlación de las concentraciones de IGFBP-7 en suero y tejido relacionadas con el contenido hepático de lípidos. Se realizó una correlación de Pearson con $p \leq 0.05$ como significativa.

En la figura 14 se observa una correlación entre el % de lípidos en el hígado y las concentraciones de IGFBP-7 en suero o tejido.

Se determinó la senescencia en el tejido, midiendo la actividad de la SA- β -gal.

Esta actividad fue relacionada con el grado de EHGNA.

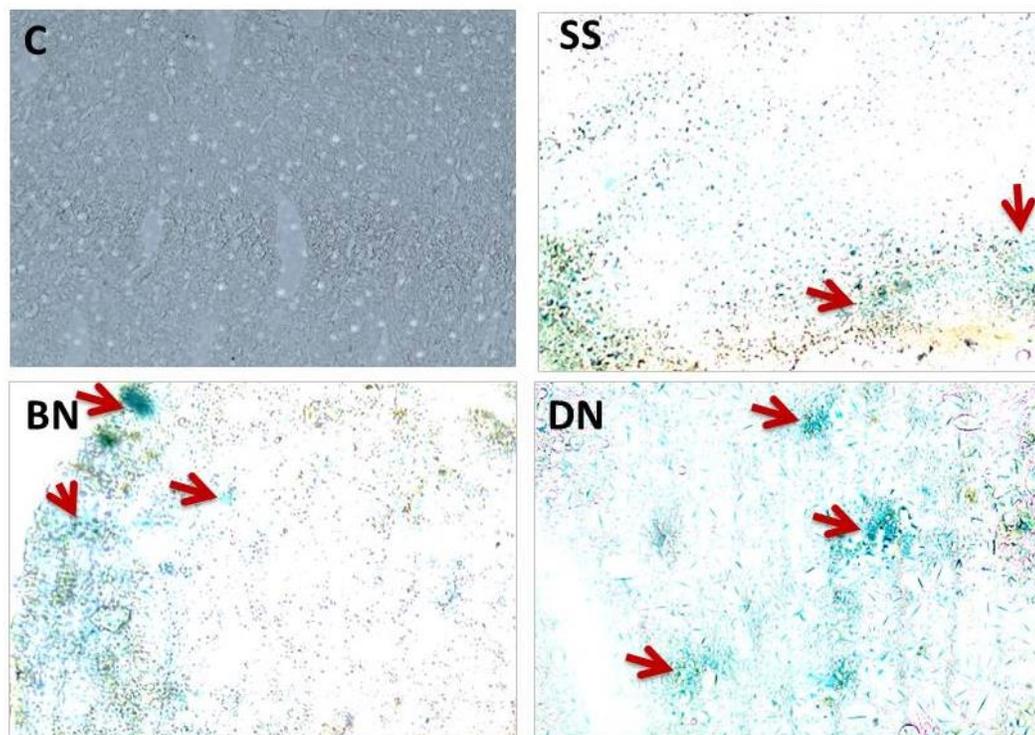


Figura 15. Demostración de senescencia en los estadios de la EHGNA. **C:** No tiene actividad de SA- β -gal, mientras que los demás grupos la presencia de células senescentes (flechas rojas) aumenta progresivamente desde el estadio **SS** hasta **BN** y se mantiene en **DN**. **C=** Control, **SS=** Esteatosis simple, **BN=** NASH limítrofe, **DN=** NASH definitivo. *Imágenes representativas, aumento 10X.*

En la figura 15 se observó que a mayor actividad de SA- β -gal o cantidad de células senescentes, la EHGNA progresaba, ya que al ser comparado con el control éste no mostraba presencia de células senescentes.

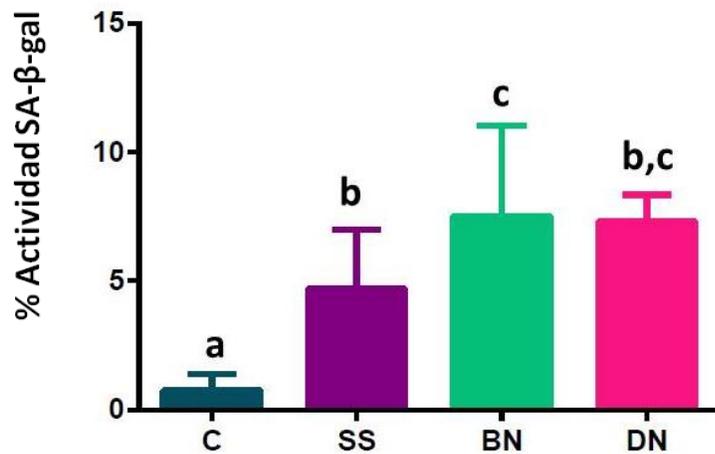


Figura 16: Asociación de la progresión EHGNA con la senescencia celular. Se realizó como prueba estadística Kruskal-Wallis y prueba de Dunn como post-hoc. Los datos se muestran como media±SD.*p<0.05 como significativa para barras que no comparten letras. **C**= Control (n=4), **SS**= Esteatosis simple (n=4), **BN**= NASH limítrofe (n=7), **DN**= NASH definitivo (n=1).

En la figura 16 se observa la relación entre el % en la actividad de SA-β-gal con respecto al estadio de progresión de la EHGNA; los estadios de SS y BN aumentan progresivamente respecto al C, pero durante DN se mantiene la cantidad de células senescentes.

B) Fibrosis

El grado de fibrosis se observó al examinar la acumulación de ECM y otros componentes del proceso fibrogénico a través de las tinciones de tricrómica de Masson (TM) y con rojo de sirio (RS).

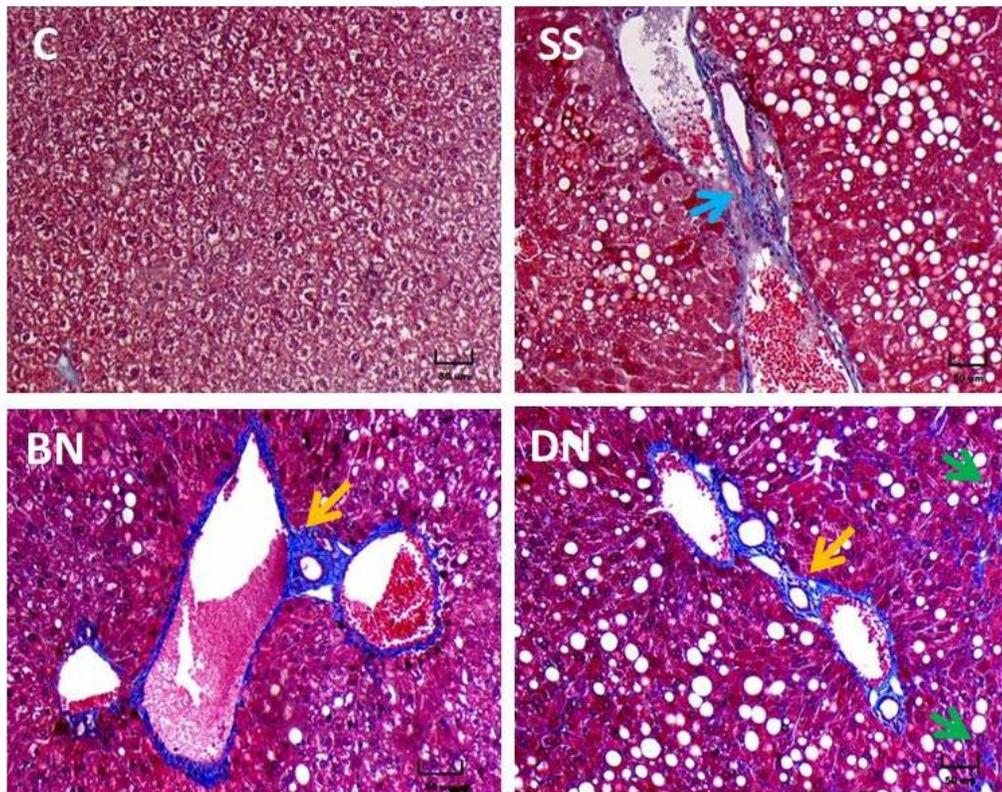


Figura 17. Progresión de la fibrosis observado en tinción TM. C: No hay presencia de fibras de colágena, **SS:** hay presencia de fibrosis naciente en la zona portal (flechas azules), **BN:** hay presencia de fibrosis portal y perisinusoidal, **DN:** la fibrosis en zonas portales y perisinusoidales se mantiene. *Imágenes representativas, aumento 10X, escala 50 μ m. C= Control, SS= Esteatosis simple, BN= NASH límite, DN= NASH definitivo.*

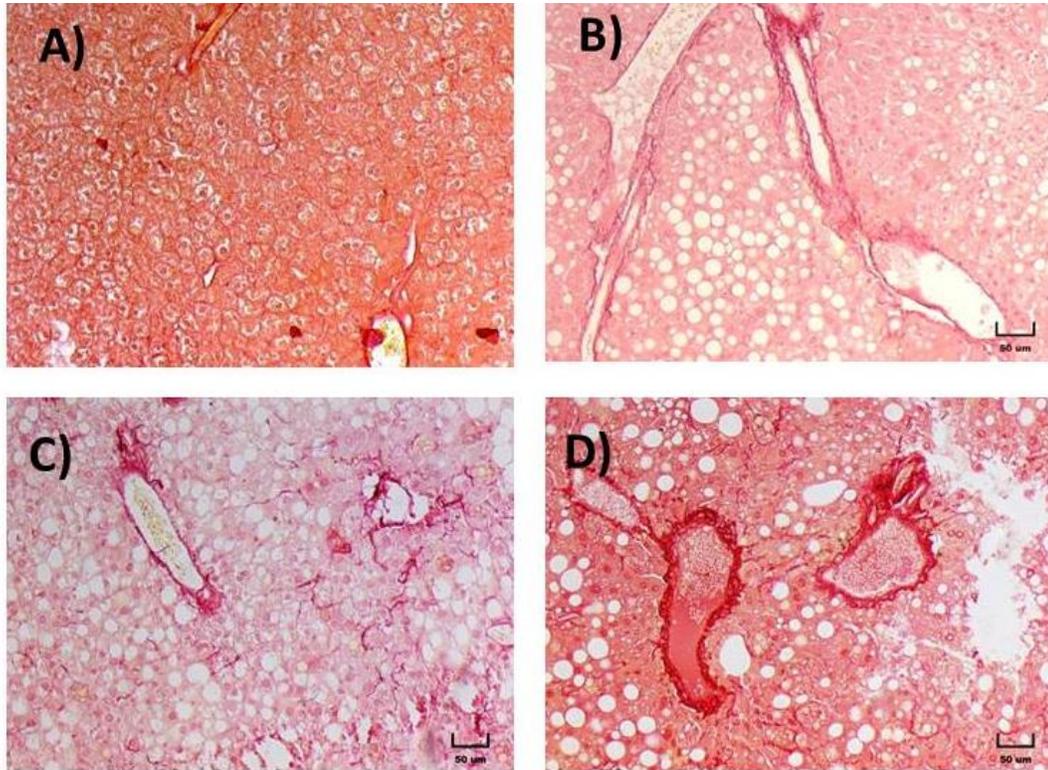


Figura 18. Progresión de la fibrosis observado en tinción con rojo de sirio. A) C: No presentan fibras en el parénquima hepático; mientras que los **B) SS, C) BN** y **D) DN** tienen presencia de ECM en áreas portales y perisinusoidales, la cual aumenta progresivamente desde SS hasta DN. *Imágenes representativas, aumento 10X, escala 50 µm. C= Control, SS= Esteatosis simple, BN= NASH limitrofe, DN= NASH definitivo.*

De igual forma, se clasificaron a los grupos de dieta bajo la escala Kleiner-Brunt para determinar el grado de fibrosis.

En las figuras 17 y 18 con las tinciones TM y RS se observó que el grupo control no presenta fibrosis, mientras que en el grupo SS la fibrosis comienza a aparecer en las zonas portales (F1C), y con respecto a los grupos BN y DN muestran mayor grado de progresión en fibrosis portal y perisinusoidal (F2).

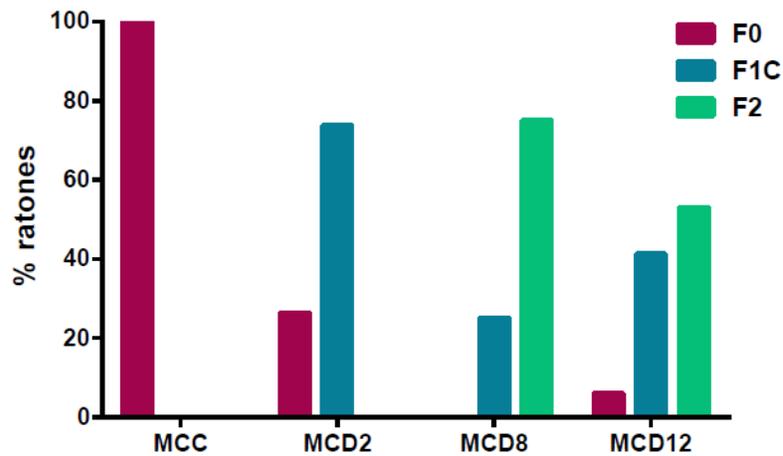
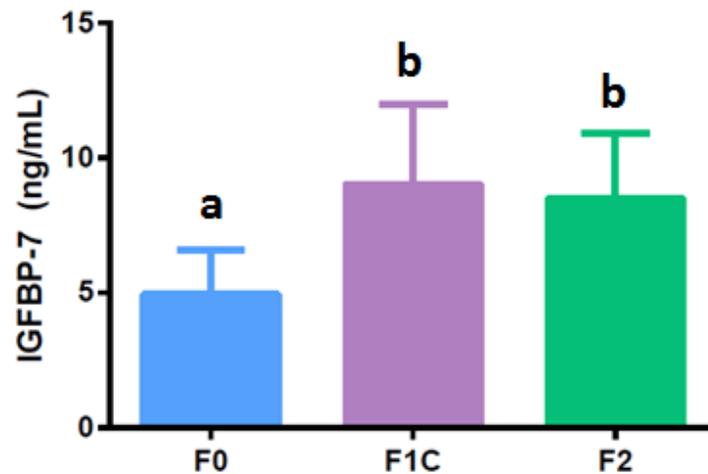


Figura 19. Prevalencia de fibrosis. Para determinar el tipo de fibrosis, se empleó como referencia la clasificación de Kleinner y Brunt siendo: F0= Sin fibrosis, F1C= Fibrosis portal y F2= Fibrosis portal y perisinusoidal. Se observaron al microscopio de campo claro las histologías de la tinción TM para determinar el daño histopatológico. **MCD2=** Dieta MCD a 2 semanas, **MCD8=** Dieta MCD a 8 semanas, **MCD12=** Dieta MCD a 12 semanas. MCC (n=27), MCD (n=54).

En la figura 19 se asignó la prevalencia de fibrosis en los grupos del régimen dietario.

A) Suero



B) *Tejido*

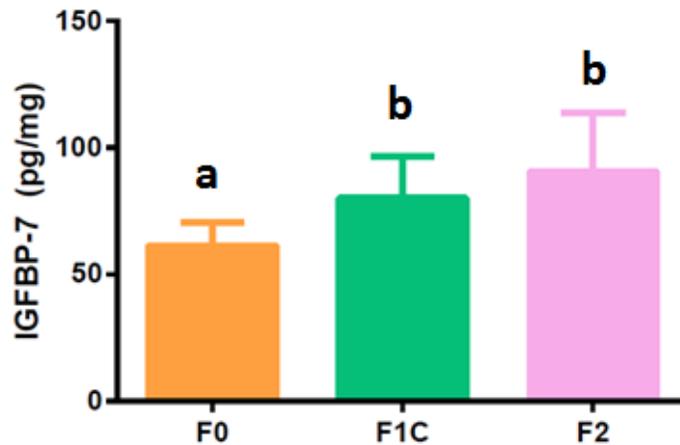


Figura 20. Concentraciones de IGFBP-7 en suero y tejido relacionada con el estadio de fibrosis. Las concentraciones de IGFBP-7 fueron obtenidas a través de la técnica de arreglo en suspensión múltiple. Los datos se muestran como media \pm SD. **A) Suero.** El análisis estadístico fue a través de ANOVA de una vía seguida, de una prueba Tukey como post-hoc. **B) Tejido.** El análisis estadístico fue a través de ANOVA de una vía, seguida de una prueba Tukey como post-hoc. $p < 0.05$ como significativa para barras que no comparten letras. **F0=** sin fibrosis, **F1C=** Fibrosis portal, **F2=** Fibrosis portal y perisinusoidal.

Posteriormente se analizaron las concentraciones de IGFBP-7 con respecto el grado de fibrosis y en la figura 20 se observó que las concentraciones de IGFBP-7 aumentan en mayor proporción en los estadios de fibrosis temprana (F1C y F2) en el tejido (Fig. 20.B), lo cual se veía reflejado de igual forma en el suero (Fig. 20.B).

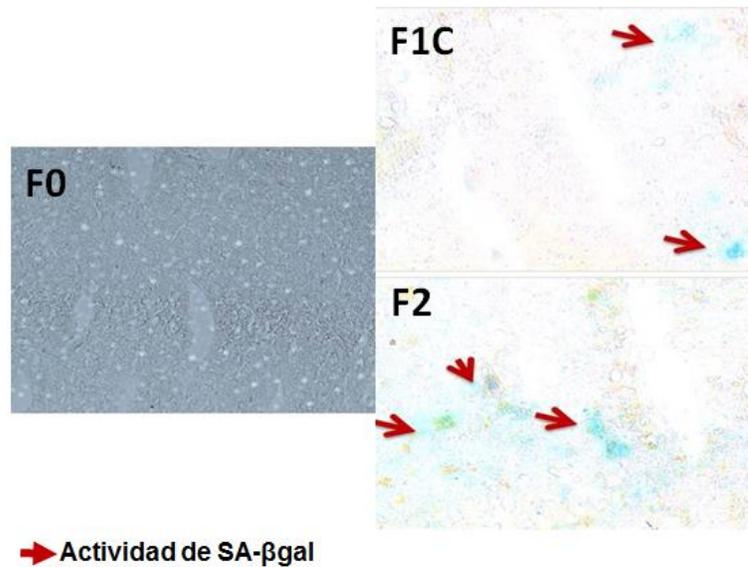


Figura 21. Determinación de senescencia asociada al grado de fibrosis en la progresión de EHGNA. F0: No tiene actividad de SA-βgal, mientras que los demás grupos la presencia de células senescentes (flechas rojas) aumenta en F1C y F2.

F0= sin fibrosis, F1C= Fibrosis portal, F2= Fibrosis portal y perisinusoidal. *Imágenes representativas, aumento 10X.*

De igual forma se relacionó el grado de fibrosis con la senescencia (Fig. 21 y 22) y se observó que los grupos F1C y F2 presentan mayor cantidad de células senescentes con respecto al grupo sin fibrosis (F0), sin embargo entre ellos no presentan diferencias significativas

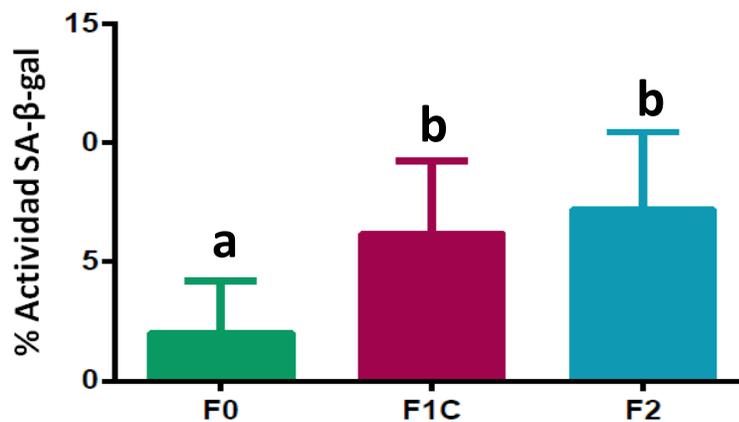


Figura 22: Asociación Fibrosis vs Senescencia. Se realizó como prueba estadística Kruskal-Wallis y como prueba de Dunn como post-hoc. Los datos se muestran como media±SD. *p<0.05 como significativa para barras que no comparten letras. F0= sin fibrosis (n=6), F1C= Fibrosis portal (n=12), F2= Fibrosis portal y perisinusoidal (n=7).

9. Discusión de resultados

La EHGNA es la hepatopatía más prevalente a nivel mundial. Ha sido ampliamente asociada a alteraciones metabólicas como lo son diabetes, obesidad, resistencia a insulina, síndrome metabólico, entre otras.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren la participación de IGFBP-7 con la progresión de EHGNA, a través de la inducción de senescencia celular probablemente de los hepatocitos, los cuales al adquirir dicho fenotipo senescente, secretan una amplia gama de factores y citocinas pro-inflamatorias (SASP) que promueven la activación de HSCs, perpetuando el proceso fibrótico en el modelo experimental empleado.

La EHGNA fue inducida en el modelo murino mediante el consumo de la dieta MCD, provocando esteatosis micro y macrovesicular desde la semana 2, mientras que a la semana 8 la acumulación de lípidos aumenta y se mantiene hasta llegar a la semana 12 de consumo. Así mismo, los ratones con dieta MCD disminuyeron significativamente y de forma progresiva su masa corporal comparada con el grupo MCC a partir del día 5 de dieta (Fig. 3), lo cual coincide con la literatura en la que se reportan pérdidas de peso de hasta el 40% comparado con su estado inicial [13]. Por otro lado no se observó diferencias estadísticas en cuanto al consumo de alimento entre los grupos MCD y MCC (Fig. 4) por lo que la progresión de la enfermedad es independiente del consumo de la dieta.

La acumulación de lípidos consecuencia de la dieta MCD durante la progresión de EHGNA, provoca que el metabolismo de lípidos aumente mediante la beta-oxidación mitocondrial, la oxidación en los peroxisomas y microsomas, teniendo como resultado mayor producción de ROS [57], los que a su vez promueve el acarreamiento de células pro-inflamatorias activando a las HSCs residentes del espacio de Disse [9, 17] y aumentando la respuesta cicatrizal.

Los ratones fueron clasificados a través de la evaluación del daño histológico (Fig. 9), para observar su progresión de EHGNA y el desarrollo de fibrosis.

Se ha reportado que las HSCs en estado activado son la principal fuente de producción de IGFBP-7 a nivel hepático [38, 43]. En el modelo experimental se evidenció el incremento en las concentraciones circulantes de IGFBP-7 asociado a NASH; este estadio de EHGNA es reconocido como profibrogénico debido a la presencia de inflamación. La activación de HSCs se hizo evidente con la presencia de ECM tanto en la zona portal y perisinusoidal (Fig. 17-18). Así mismo se observó que IGFBP-7 aumentó sus concentraciones tanto en tejido como en suero durante las etapas tempranas de fibrosis presentadas (F1C y F2), lo cual es resultado de la activación de HSCs (Fig. 20).

Por otro lado, se sabe que el mecanismo mediante el cual IGFBP-7 ejerce su efecto antitumoral es a través de la inducción de senescencia en diferentes estirpes celulares como lo son células endoteliales, queratinocitos, HSCs, mesenquimales, entre otras [32, 41]; al detener su ciclo celular, las células se encuentran impedidas para proliferar.

De forma experimental se observó la inducción de senescencia asociada a IGFBP-7 (Fig. 15-16 y 21-22) al detectar la actividad de SA- β -gal en el tejido hepático relacionado a la progresión de EHGNA y al estadio de fibrosis. Cabe destacar que la senescencia no es un proceso selectivo, sin embargo considerando las regiones y los cúmulos de células que expresan la SA- β -gal, podemos sugerir que se tratar de hepatocitos senescentes, los cuales al adquirir dicho estado liberan el SASP, el cual promueve la senescencia de células vecinas. Así mismo, la acumulación de hepatocitos senescentes aunado a su SASP favorecen la activación de HSCs mediante el ambiente de citocinas, exacerbando y perpetuando el proceso fibrótico iniciado por la lipotoxicidad.

Por ello, podemos sugerir que IGFBP-7 se encuentra asociada a la progresión de EHGNA, pero su mecanismo se encuentra más direccionado hacia el proceso

fibrótico y en menor proporción hacia la acumulación lipídica, ya que al relacionar los diferentes estadios de EHGNA (Fig. 13) se observó una correlación positiva significativa (Fig. 14), sin embargo, no es claro cuáles son las implicaciones de este hallazgo, pero se podría sugerir que el porcentaje de lípidos impiden la acumulación de IGFBP-7 en tejido favoreciendo su secreción hacia la circulación.

Así mismo la literatura reporta que la senescencia celular de hepatocitos favorece la disfuncionalidad mitocondrial respecto a la oxidación lipídica, por lo que se aumenta la acumulación de lípidos [58] y favorece la lipotoxicidad.

El modelo murino empleado experimentalmente carece de alteraciones metabólicas, proporcionando un panorama direccionado a la población con ausencia de comorbilidades pero con la patología de EHGNA. Como limitantes tenemos que el modelo de la dieta MCD disminuye en gran proporción su masa corporal [13], así mismo su consumo hasta la semana 12 sólo nos permitió observar estadios de fibrosis temprana, ya que se ha reportado que su consumo prolongado comienza a tener una compensación de nutrimentos particularmente de metionina y por ende hay una aparente reversión de la patología en la semana 30 de consumo [26].

10. Conclusiones

La expresión de IGFBP-7 aumentó durante los estadios de fibrosis temprana asociada a la EHGNA tanto en suero como en tejido, dicha sobreexpresión se relaciona con el incremento de hepatocitos senescentes, que a su vez favorecen la activación de HSCs llevando como consecuencia a una mayor producción de ECM.

Los resultados sugieren que la expresión de IGFBP-7 podría establecer el estadio de progresión de fibrosis asociado a la EHGNA, coadyuvando en el diagnóstico de la patología.

11. Referencias

1. GJ, T. and B. Derrickson, *Principios de anatomía y fisiología/Principles of Anatomy and Physiology: Incluye Sitio Web*. 2013: Editorial Médica Panamericana
2. Hernandez-Gea, V. and S.L. Friedman, *Pathogenesis of liver fibrosis*. *Annu Rev Pathol*, 2011. **6**: p. 425-56.
3. Fortoul van der Goes, T.I., *Histología y biología celular* 2nd ed. 2013, México: McGraw Hill Mexico. 359.
4. Bellentani, S., *The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease*. *Liver Int*, 2017. **37 Suppl 1**: p. 81-84.
5. Younossi, Z.M., . Koenig, A. B, *Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease — Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes*. *HEPATOLOGY*, 2016. **64**(1): p. 73-84.
6. Méndez S. N., G.G.Y., *Hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica: conceptos actuales*. *Revista de gastroenterología de México*, 2010. **2**(75): p. 143-148.
7. Lambis L.A., B., *Risk Factors Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Colombian Caribbean Population*. *Rev Col Gastroenterol*, 2016. **31**(2): p. 89-85.
8. LaBrecque D., A.Z., *Enfermedad del hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica*. *Guías de la Organización Mundial de Gastroenterología*, 2012. **1-25**.
9. Benedict, M. and X. Zhang, *Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review*. *World J Hepatol*, 2017. **9**(16): p. 715-732.
10. Reccia, I., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease*. *Metabolism*, 2017. **72**: p. 94-108.
11. Takahashi, Y., Y. Soejima, and T. Fukusato, *Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis*. *World J Gastroenterol*, 2012. **18**(19): p. 2300-8.
12. Carrillo R., M.J., *Hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica*. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM*, 2011. **54**(3): p. 29-45.
13. Naga Chalasani, G.S., *Alcoholic and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, 2016.
14. Poeta, M., L. Pierri, and P. Vajro, *Gut-Liver Axis Derangement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. *Children (Basel)*, 2017. **4**(8).
15. Miele, L., et al., *Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2009. **49**(6): p. 1877-87.
16. Brunt, E.M., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease*. *Nat Rev Dis Primers*, 2015. **1**: p. 1-22.
17. Magee, N., A. Zou, and Y. Zhang, *Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: Interactions between Liver Parenchymal and Nonparenchymal Cells*. *BioMed Research International*, 2016. **2016**: p. 1-11.
18. Imajo, K., et al., *Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(11): p. 21833-57.
19. Van Herck, M.A., L. Vonghia, and S.M. Francque, *Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide*. *Nutrients*, 2017. **9**(10): p. 1-13.
20. KIRSCH, R., et al., *Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: Species, strain and sex difference studies*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2003. **18**(11): p. 1272-1282.

21. Tsuchida, T. and S.L. Friedman, *Mechanisms of hepatic stellate cell activation*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **14**(7): p. 397-411.
22. Zhao, X.K., et al., *Focal Adhesion Kinase Regulates Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 4032.
23. Peng, L., et al., *Substance P promotes hepatic stellate cell proliferation and activation via the TGF-beta1/Smad-3 signaling pathway*. Toxicol Appl Pharmacol, 2017. **329**: p. 293-300.
24. Senoo, H., *Structure and function of hepatic stellate cells*. Med Electron Microsc, 2004. **37**(1): p. 3-15.
25. Reeves, H.L., *Activation of hepatic stellate cells - a key issue in liver fibrosis*. Frontiers in Bioscience, 2002. **7**(1-3): p. 808-826.
26. Itagaki, H., *Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(12): p. 2683-2696.
27. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. **41**(6): p. 1313-1321.
28. Vivian Hwa, Y.O., Rosenfeld R. G., *The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Superfamily Endocrine Re*. Endocrine Reviews, 1999. **20**(6): p. 761-787.
29. Lawrence A., W.M., *Novel Aspects of the Insulin-like Growth Factor Binding Proteins*. Molecular Genetics and Metabolism, 1999. **68**: p. 161-181.
30. Shimizu, M. and W.W. Dickhoff, *Circulating insulin-like growth factor binding proteins in fish: Their identities and physiological regulation*. Gen Comp Endocrinol, 2017. **252**: p. 150-161.
31. Akiel, M., et al., *Emerging role of insulin-like growth factor-binding protein 7 in hepatocellular carcinoma*. J Hepatocell Carcinoma, 2014. **1**: p. 9-19.
32. Nousbeck, J., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein 7 regulates keratinocyte proliferation, differentiation and apoptosis*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(2): p. 378-87.
33. Hoeflich, A., Russo V.C., *Physiology and pathophysiology of IGFBP-1 and IGFBP-2. Consensus and dissent on metabolic control and malignant potential*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2015. **29**: p. 658-700.
34. Guo, X., et al., *Screening for and validation of a hepatic fibrosis-related pathway induced by insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2016. **28**(7): p. 762-772.
35. Pen, A., et al., *Insulin-like growth factor binding protein 7 exhibits tumor suppressive and vessel stabilization properties in U87MG and T98G glioblastoma cell lines*. Cancer Biology & Therapy, 2014. **12**(7): p. 634-646.
36. Tomimaru, Y., et al., *IGFBP7 downregulation is associated with tumor progression and clinical outcome in hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer, 2012. **130**(2): p. 319-327.
37. Chen, D., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein-7 (IGFBP7): a promising gene therapeutic for hepatocellular carcinoma (HCC)*. Mol Ther, 2013. **21**(4): p. 758-766.
38. Guo, X.H., et al., *Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 contributes to hepatic fibrogenesis*. J Dig Dis, 2014. **15**(4): p. 202-10.
39. V., K.M., *A Secreted Tumor-Suppressor, mac25, with Activin-Binding Activity*. Molecular Medicine 2000. **6**(2): p. 126-135.
40. Benatar, T., et al., *IGFBP7 reduces breast tumor growth by induction of senescence and apoptosis pathways*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **133**(2): p. 563-73.

41. Severino, V., et al., *Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 7 released by senescent cells promote premature senescence in mesenchymal stem cells*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. 2-11.
42. Liu, L.-X., et al., *Insulin-like growth factor binding protein-7 induces activation and transdifferentiation of hepatic stellate cells in vitro*. World Journal of Gastroenterology, 2009. **15**(26): p. 3246-3253.
43. Boers, W., et al., *Transcriptional profiling reveals novel markers of liver fibrogenesis: gremlin and insulin-like growth factor-binding proteins*. J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16289-95.
44. Fridlyanskaya, I., L. Alekseenko, and N. Nikolsky, *Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review*. Exp Gerontol, 2015. **72**: p. 124-8.
45. Aravinthan, A.D. and G.J.M. Alexander, *Senescence in chronic liver disease: Is the future in aging?* J Hepatol, 2016. **65**(4): p. 825-834.
46. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.
47. Li, T., et al., *Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1269-83.
48. Aloysious Aravinthan, C.S., *Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease*. J Hepatol, 2013. **58**(3): p. 407-408.
49. Romero Bello, I.I. and C. Guzmán Arriaga, *Evaluación de las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP) en el suero de pacientes con enfermedad por hígado graso no alcohólico debido a obesidad mórbida*. Tesis UNAM, 2018.
50. Aravinthan, A., et al., *The senescent hepatocyte gene signature in chronic liver disease*. Exp Gerontol, 2014. **60**: p. 37-45.
51. *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.*, in *NOM-062-ZOO-1999*, G. Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación., Editor 1999.
52. Romero Bello, I.I. and C. Guzmán Arriaga, *Estudio de la expresión de la proteína acarreadora del factor de crecimiento insulinoide 5 (igfbp5) durante la fibrosis hepática*. Tesis UNAM, 2015.
53. Debacq-Chainiaux, F., et al., *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. Nat Protoc, 2009. **4**(12): p. 1798-806.
54. DIMRI, G.P., LEET, X., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995. **92**: p. 9363-9367.
55. Maier, A.B., R.G. Westendorp, and V.A.N.H. D, *Beta-galactosidase activity as a biomarker of replicative senescence during the course of human fibroblast cultures*. Ann NY Acad Sci, 2007. **1100**: p. 323-32.
56. Gutierrez R. G., G.d.L., M.C., *Cellular Senescence in Livers from Children with End Stage Liver Disease*. PLoS ONE, 2010. **4**: p. 1-5
57. Solis J., *Progresión de la estatohepatitis a cirrosis. Papel del estrés oxidativo y la muerte celular*. Gastroeneterol Hepatol, 2006. **29**(Supl. 1): p. 101-110.

58. Ogrodnik, M., et al., *Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15691.

Anexo

I.Tinciones histológicas

Tinción con hematoxilina y eosina

-Desparafinado: colocar la laminilla en la estufa durante 30 min a 60°C , después se sumerge en xilol durante 10-15min

-Hidratación: Se coloca la laminilla en alcohol absoluto por 5 min, alcohol de 96° durante 5 min y finalmente en alcohol 70° por 5 min. (Serie gradual de alcohol a concentración decreciente.)

-Lavar en agua destilada

-Adicionar **hematoxilina de Harris** por 5 min

*Hematoxilina	5mg
*Alcohol concentrado	50 mL
*Sulfato de aluminio	100mg
*Agua destilada	1000mL
*Óxido Rojo ma	2.5mg

-Lavar en agua destilada durante 2 min

-Agregar **eosina alcohólica** por 1 min

*Eosina	1g
*Agua destilada	20mL
*Alcohol 95%	80mL

-Deshidratar mediante seriación gradual de alcohol a concentración creciente y finalmente en xilol.

-Montaje en base acuosa.

Tinción de Masson

-Desparafinado: colocar la laminilla en la estufa durante 30 min a 60°C , después se sumerge en xilol durante 10-15min

-Hidratación: Se coloca la laminilla en alcohol absoluto por 5 min, alcohol de 96° durante 5 min y finalmente en alcohol 70° por 5 min. (Serie gradual de alcohol a concentración decreciente.)

-Lavar en H_2O destilada

-Adicionar **solución Buwins** por 5 min

*Solución Ácido pícrico	75mL
*Formaldehído 37 ó 40%	25mL
*Ácido acético glacial	5mL

-Adicionar **hematoxilina de Weigerts** por 5 min

*Solución A: Cristal violeta 1g + alcohol 96% 100mL

*Solución B: Sol cloruro férrico 29% 4mL+ Agua destilada 95mL y HCl 98% 1mL

Mezclar por partes iguales A y B.

-Lavar en H_2O destilada durante 10 min

-Adicionar Solución **Bierbrich scarlet** por 5 min.

* Bierbrich scarlet al 1%	90mL
* Fucsina ácida al 1%	10mL
*Ácido acético glacial	1mL

-Agregar Ácido **fosfomolibdico/fosfotungstico** durante 5 min.

*Ácido Fosfomolibdico	5g
*Ácido Fosfotungstico	5g
*Agua destilada	100mL

-Adicionar **Solución de anilina** por 5min

*Azul de anilina	2.5g
*Ácido acético glacial	2 mL
*Agua destilada	100mL

-Adicionar **Solución de ácido acético al 1%** por 5min

-Deshidratar mediante seriación gradual de alcohol a concentración creciente y finalmente en xilol.

-Montaje a base acuosa

Tinción Rojo Oleoso - Estuche comercial Abcam (Catálogo ab150678)

-Isopropanol al 60% hasta cubrir por 3 min

-Quitar exceso

-Adicionar Rojo Oleoso durante 20 min

-Isopropanol al 60% por 3 min

-Lavar con H_2O corriente

-Agregar Hematoxilina por 30s.

-Lavar con agua corriente

Medio de montaje base acuosa

-Gelatina 7g

-Agua 42mL

-Glicerina 50 mL

-Fenol 0.47mL

Modo de preparación: Mezclar el agua con la glicerina bajo agitación en baño María hasta desaparecer los grumos, adicionar la glicerina hasta homogenizar y posteriormente agregar el fenol.