



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN  
DEL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINOIDE (IGFBP) EN DOS  
MODELOS MURINOS DE FIBROSIS HEPÁTICA:  
HEPATOTOXICIDAD POR TIOACETAMIDA Y COLESTASIS POR  
LIGADURA DE CONDUCTO BILIAR**

**T E S I S**

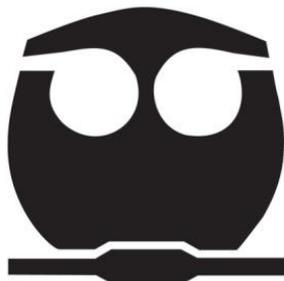
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**MIRIAM GISELA BAUTISTA UBALDO**

**CD. MX. 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:** Dr. Óscar Armando Pérez Méndez

**VOCAL:** Dr. Guillermo Celestino Cardoso Saldaña

**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 (HIPAM)  
Departamento de Medicina Experimental  
Facultad de Medicina-UNAM  
Hospital General de México

**ASESORA DEL TEMA:**

DRA. CAROLINA GUZMÁN ARRIAGA

---

**SUSTENTANTE:**

MIRIAM GISELA BAUTISTA UBALDO

---



*"No estudio para saber más,  
sino para ignorar menos"*

Sor Juana Inés de la Cruz



## Agradecimientos

A mi asesora de tesis, la Dra. Carolina Guzmán Arriaga por guiarme y enseñarme diversas cosas dentro del mundo de la investigación.

A la Dra. Gabriela Gutiérrez Reyes por permitirme la oportunidad de pertenecer al HIPAM.

Al personal del HIPAM: Leticia Sánchez Gómez, José Ángel García López, Nicanor Santos Maya y Carlos Alberto Martínez Juárez.

Al personal del bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina: Sr. Ricardo Vargas Orozco, Biólogo Guillermo Alberto Ramos Blancas y al MVZ. Daniel Sánchez Almaraz por su apoyo en los modelos murinos.

AL MVZ. Jorge Omar García-Rebollar y a la MVZ. Georgina Díaz Herrera de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por su apoyo en el modelo murino de ligadura.

Al Técnico en histopatología Pedro Balderas Flores por su apoyo en realización de las histologías de los modelos murinos.

Al Técnico en Sistemas Digitales Marco Elías Gudiño Zayas por su apoyo en la toma de microfotografías.

Al Dr. Armando Pérez Torres de la Facultad de Medicina de la UNAM por permitirme el uso del microscopio para la toma de microfotografías.

A los Doctores Óscar Armando Pérez Méndez y Guillermo Celestino Cardoso Saldaña por haber recibido su apoyo al revisar esta tesis.

A la UNAM por el apoyo otorgado de beca de titulación 2017-2018 del Programa de vinculación con los egresados universitarios (PVEU).

Este trabajo fue reconocido con premio en el Taller de Jóvenes Investigadores 2018, avalado por la *Asociación Mexicana de Hepatología* y la *American Association for the Study of Liver Diseases*.

Este proyecto fue financiado por Conacyt (CB-221137).



## Índice

1. RESUMEN .....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	9
3. ANTECEDENTES.....	10
3.1. El hígado.....	10
3.2. Fibrosis hepática .....	11
3.3. Diagnóstico y clasificación del proceso de fibrosis hepática .....	13
3.4. Modelos animales.....	15
3.4.1. Hepatotóxico: Tioacetamida (TAA).....	15
3.4.2. Colestásico: Ligadura de Conducto Biliar (BDL) .....	16
3.5. Generalidades IGFbps.....	17
3.5.1. IGFbps en la fibrosis.....	19
3.5.1.1. IGFBP-1.....	19
3.5.1.2. IGFBP-2.....	20
3.5.1.3. IGFBP-3.....	21
3.5.1.4. IGFBP-5.....	21
3.5.1.5. IGFBP-6.....	22
3.5.1.6. IGFBP-7.....	22
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
5. HIPÓTESIS.....	23
6. OBJETIVOS.....	23
6.1. Objetivo general .....	23
6.2. Objetivos particulares.....	23
7. METODOLOGÍA .....	24
7.1. Modelos murinos.....	24
7.1.1. Modelo hepatotóxico para inducción de fibrosis hepática con TAA .....	24
7.1.2. Modelo colestásico para inducción de fibrosis hepática con BDL.....	24
7.2. Recolección de muestras .....	25
7.3. Histología .....	25
7.4. Cuantificación de proteínas IGFbps en suero por medio de MILIPLEX® MAP Kit.....	25
7.5. Análisis estadístico.....	26



8.	RESULTADOS.....	27
8.1.	Modelo murino con daño hepatotóxico.....	27
8.1.1.	Inducción de fibrosis hepática por TAA.....	27
8.1.2.	Tinciones histológicas y evaluación del grado de fibrosis (TAA).....	28
8.1.3.	Cuantificación de las IGFbps en el suero (TAA).....	33
8.2.	Modelo murino con daño colestásico.....	36
8.2.1.	Inducción de fibrosis hepática por BDL.....	36
8.2.2.	Tinciones histológicas y evaluación del grado de fibrosis (BDL).....	37
8.2.3.	Cuantificación de IGFbps en el suero (BDL).....	40
9.	DISCUSIÓN.....	43
10.	CONCLUSIONES.....	47
11.	REFERENCIAS.....	48
12.	ANEXOS.....	50
12.1.	Anexo 1. Tinciones.....	50



## 1. RESUMEN

La fibrosis hepática se define como la acumulación excesiva de Matriz Extracelular (ECM), consecuencia de algún daño presente que puede o no ser reversible. Cuando la lesión es pequeña o auto limitada, los procesos que ocurren en el órgano son transitorios y la arquitectura del hígado regresa a la normalidad por su capacidad de regenerarse. Por el contrario, si la lesión hepática es crónica y mantenida, está presente la inflamación, la acumulación de ECM continúa y como consecuencia final se progresa a cirrosis, un padecimiento considerado irreversible y que actualmente es la cuarta causa de mortalidad en el país.

Las herramientas disponibles actualmente no son suficientemente eficaces para diagnosticar la fibrosis hepática en estadios tempranos e intermedios. La razón de esto es porque es una enfermedad asintomática con una detección complicada, siendo ya evidente en una etapa muy avanzada donde el daño se considera irreversible. Hoy en día, la biopsia hepática es el estándar de oro para determinar la fibrosis, esta conlleva desventajas, como: su carácter invasivo, alta variabilidad que se tiene entre muestras, infecciones bacterianas, entre otras. Se han desarrollado biomarcadores no invasivos para el diagnóstico y estadificación de la fibrosis pero su precisión y exactitud sigue siendo baja.

Se ha realizado la búsqueda e identificación de moléculas como biomarcadores para la detección temprana de la fibrosis antes de progresar a la cirrosis, ejemplo son las Proteínas de Unión del Factor de Crecimiento Insulinóide (IGFBP), estas transportan al factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) en circulación.

Sin embargo, hay evidencia que las IGFBP participan en procesos de reparación del daño y cicatrización actuando como potenciales reguladoras de la síntesis de ECM, siendo esto de mayor interés en esta tesis por la relación que existe con la fibrosis.

En este trabajo se busca conocer el comportamiento de las proteínas IGFBP -1, -2, -3, -5, -6 y -7 a nivel sérico durante el daño hepático en dos modelos murinos con diferente etiología: Administración de Tioacetamida (TAA; daño hepatotóxico) y Ligadura de Conducto Biliar (BDL; daño colestásico).

De forma breve; Modelo de TAA: Se trabajó con 36 ratones de la cepa C57BL/6, los cuales fueron divididos en 6 grupos, donde 3 de ellos recibieron la administración de



TAA para inducir diferentes grados de fibrosis con respecto al tiempo (4 semanas:Ishak 2, 6 semanas: Ishak 3 y 8 semanas:Ishak 4), cada uno de ellos contó con su respectivo grupo control.

Modelo BDL: Se trabajó con 9 ratones de la cepa CD-1,fueron divididos en 2 grupos, donde uno tuvo intervención quirúrgica pero sin BDL (SHAM) y el segundo grupo fue sometido a intervención quirúrgica con BDL, ambos grupos fueron mantenidos 7 días post-cirugía (BDL7).

Al final de los tratamientos de cada modelo se obtuvo el hígado para realizar un análisis histológico y posteriormente para clasificar la fibrosis se utilizó la escala Ishak, en suero se realizó la cuantificación de las IGFBP.

En el modelo de TAA, la concentración sérica de IGFBP-2 disminuyó significativamente en los 3 tiempos de tratamiento con respecto al control y el grupo Ishak 3 tambiénmostródisminución significativa con respecto al grupo Ishak2; en el caso de IGFBP-7 se observó un aumento significativo en circulación en losgrupos Ishak 3 e Ishak 4 con respecto al control.

En contraste, en el modelo de BDL, las concentraciones séricasen BDL7 tanto de IGFBP-1 e IGFBP-2 aumentaron significativamentecon respecto al grupo SHAM.

En conclusión, la fibrosis hepática fue evidente en ambos modelos de daño y las concentraciones séricas de algunas IGFBPs resultaron significativas asociándolas a su posible participación como reguladoras en la síntesis de EMC durante el daño hepático independientemente de la etiología que lo cause.



## 2. INTRODUCCIÓN

El hígado desempeña diferentes funciones dentro del organismo como son: almacenamiento de glucógeno, metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, depuración de la sangre, síntesis de una gran variedad de proteínas plasmáticas, regulación de la coagulación sanguínea, producción de bilis y metabolismo de sustancias extrañas que ingresan al organismo como el alcohol y los fármacos.

Hay varios factores de crecimiento y citocinas implicados en la regulación del tejido hepático, como pueden ser IGF (Factor de Crecimiento Insulinoide), TGF (Factor de Crecimiento Transformante), IL-6 (Interleucina 6), IGFBPs (Proteínas de Unión al Factor de Crecimiento tipo Insulinoide).

Los factores de crecimiento insulinoide IGF-I e IGF-II participan en algunos procesos celulares como: crecimiento, supervivencia y diferenciación. Sus proteínas transportadoras (IGFBPs) regulan su biodisponibilidad, además se tiene evidencia que tienen funciones tanto dependientes como independientes a IGF.

Cuando el tejido hepático sufre una lesión aguda o auto limitada, los cambios que ocurren son transitorios y la arquitectura del hígado se restaura. Pero si el daño es constante, aparecerá la fibrosis que es la acumulación de matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés, "extracellular matrix") y además de la presencia de inflamación, este proceso progresa a cirrosis, condición con alta mortalidad.

Parte importante de este proyecto es la evidencia reportada donde las IGFBPs tienen estrecha relación con la progresión de la fibrosis hepática, tomando en cuenta que su síntesis es realizada principalmente en el hígado. Por esto, podrían ser en un futuro un biomarcador o blanco terapéutico dentro de este padecimiento que surge por diferentes etiologías y que actualmente es una problemática de salud en aumento dentro de la población mexicana y a nivel mundial.



### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. El hígado

El hígado es el segundo órgano más grande del cuerpo (el primero es la piel) y la glándula de mayor tamaño. Pesa alrededor de 1.5 kg representado el 2% de la masa corporal total. Está situado en la cavidad abdominal, por debajo del diafragma. Es el órgano donde los nutrientes absorbidos en el tubo digestivo se procesan y se almacenan para ser utilizados por otros órganos, siendo una interfaz entre el sistema digestivo y la sangre[1].

La irrigación en el hígado es característica ya que recibe tanto sangre oxigenada como sangre venosa. La sangre oxigenada proviene de la arteria hepática (aportando el 25 % de la sangre), mientras que la sangre venosa llega de la vena porta que proviene del intestino delgado (aportando 75%)[2].

El lobulillo hepático representa la unidad estructural y funcional del hígado, que presenta forma poligonal cuyo centro está ocupado por la vena central y hacia los bordes de tres a seis triadas portales. Cada triada portal está formada por el ducto biliar, una rama de la arteria hepática y otra de la vena porta (*Figura 1*)[3].

El tejido hepático está conformado en un 85% por hepatocitos que son las células parenquimatosas. El 15% del hígado comprende a las células no parenquimatosas, que incluyen a las células de Kupffer (KCs, por sus siglas en inglés, “*KupfferCells*”), las células sinusoidales endoteliales (SECs, por sus siglas en inglés, “*Sinusoidal EndothelialCells*”) y las células estelares hepáticas quiescentes (HSCs, por sus siglas en inglés, “*HepaticStellateCells*”) en proporciones de 30, 60 y 10%, respectivamente[3].

Los hepatocitos forman placas alineadas y entre ellas se encuentra una red compleja de espacios vasculares llamados sinusoides, recubiertos por un endotelio discontinuo y fenestrado conformado por las SECs y las KCs que son los macrófagos residentes del hígado, además de otras células del sistema inmune. Los sinusoides están separados de los hepatocitos por el espacio perisinusoidal o espacio de *Disse*, donde radican las HSCs que están alrededor del sinusoides (*Figura 1*)[3].

El hígado realiza varias funciones, entre las que se encuentran el almacenamiento de glucógeno, vitaminas, metabolismo de carbohidratos, depuración de la sangre, producción de bilis, metabolismo de cualquier sustancia tóxica que ingrese al organismo como fármacos y alcohol, metabolismo de lípidos y proteínas, síntesis de una gran



variedad de proteínas plasmáticas. El hígado es considerado como un órgano vital y realiza dos tipos de secreciones, una de tipo exocrina (que forma la bilis y se secreta posteriormente al duodeno) y otra de tipo endocrina (que secreta sus productos directamente al torrente sanguíneo)[2].

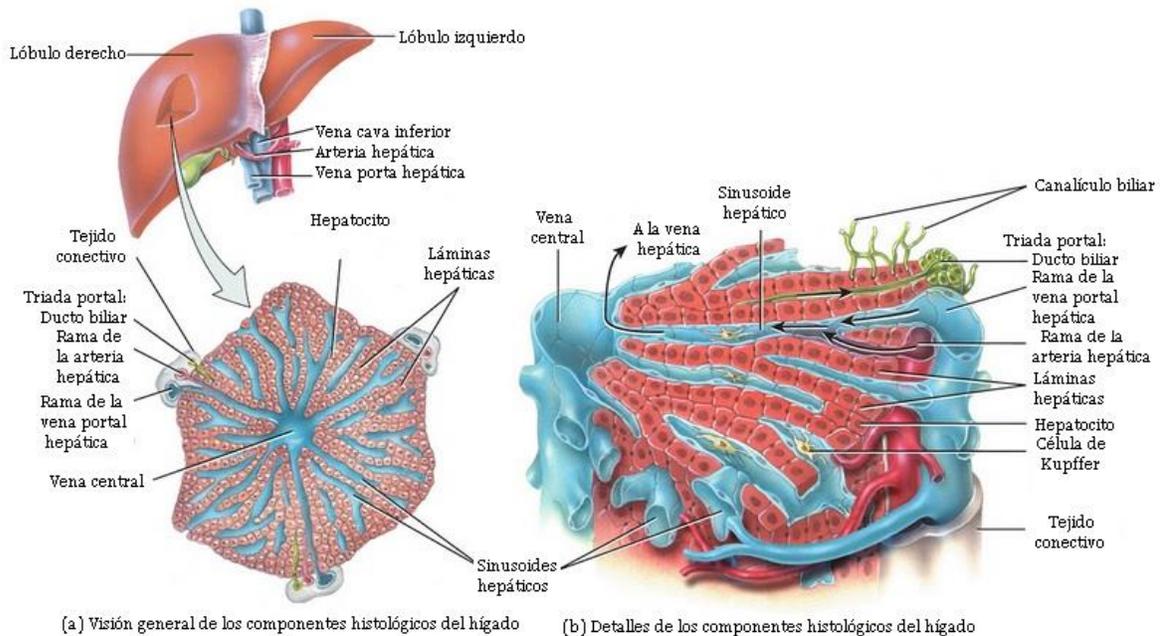


Figura.1. Representación microscópica del lobulillo hepático y parte del mismo con todos los elementos que lo conforman. Tomada y modificada de[4].

### 3.2. Fibrosis hepática

Cuando el hígado es expuesto a ciertos estímulos dañinos, las células involucradas sufren cambios relevantes en su morfología y su estado de activación, consecuentemente poder dividirse. Por ejemplo, ante el daño, los hepatocitos pierden sus micro vellosidades, mientras que las SECs pierden sus fenestraciones (Figura 2)[3].

Si el insulto al tejido es agudo o auto limitado, los cambios son transitorios y la arquitectura del hígado se restaura a su estructura normal. Sin embargo, si el daño es crónico o constante, la inflamación crónica y la fibrosis hepática que es la acumulación de matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés, “*Extracellular Matrix*”) persistirán llevando a la sustitución progresiva del parénquima hepático por tejido cicatrizado[5].

La producción de ECM obedece principalmente a la activación de las HSC, que responden de forma parácrina a señales provenientes de otros tipos celulares. En su estado quiescente las HSC muestran una forma típicamente estrellada, son el principal



reservorio de ácidoretinoico (vitamina A) visible en forma de gotas en su citoplasma, expresan desmina, la proteína acida fibrilar glial (GFAP) y producen básicamente colágena de tipo IV. En respuesta a estímulos dañinos, se dispara su activación, se trans-diferencian adquiriendo un fenotipo similar a un miofibroblasto, pierden su reservorio de vitamina A, muestran actividad profibrogénica y contráctil (por lo tanto pueden migrar al sitio donde se origina la lesión), produciendo colágenas de tipo I, tipo III y fibronectina, principalmente (Figura 2)[3].

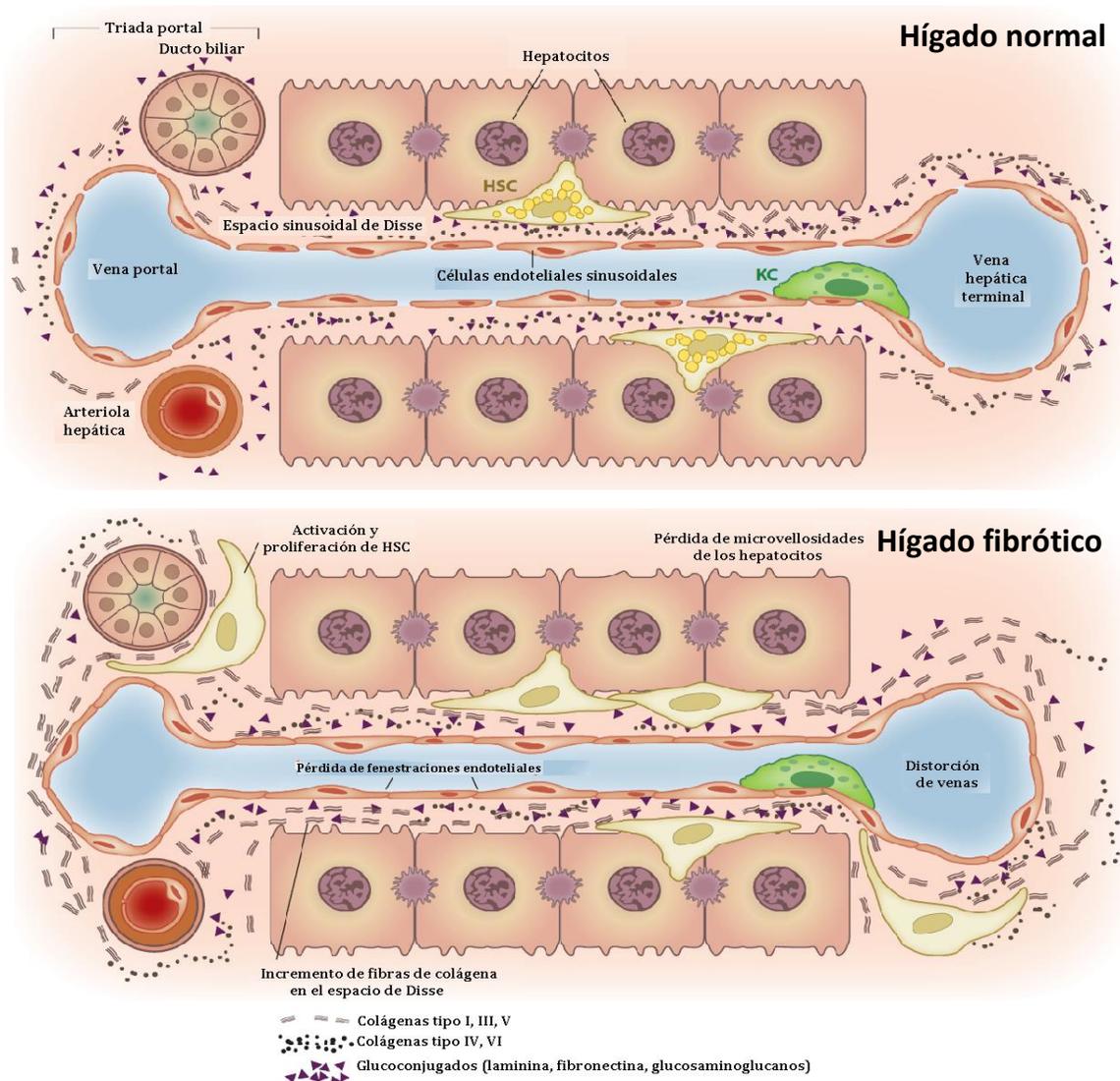


Figura. 2. Comparación entre la microestructura hepática normal y fibrótica, se observan los cambios en los distintos tipos celulares después de su activación por un daño crónico. Tomada y modificada de [5].



Las enfermedades fibróticas en diferentes órganos son responsables de un 45% de la mortalidad mundial. En el caso del hígado, las etiologías más importantes de la fibrosis hepática y la cirrosis son la hepatitis crónica viral B o C, la enfermedad hepática tóxica (ejemplo: consumo de alcohol), enfermedades autoinmunes y biliares como la cirrosis biliar primaria, la enfermedad por hígado graso no alcohólico que está ligada a obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico [6].

La cirrosis, se trata de la etapa final de la fibrosis progresiva, presentando distorsión de la arquitectura vascular que finaliza en falla hepática [5]. Además se considera que la cirrosis predispone al desarrollo de un tipo de cáncer de hígado, conocido como hepatocarcinoma celular (HCC).

A nivel mundial, la cirrosis hepática representa la 14<sup>a</sup> causa de mortalidad, las muertes por esta patología incrementaron en los últimos 30 años, en el caso de México las enfermedades hepáticas se encuentran en la 4<sup>a</sup> posición de las causas de mortalidad y donde las etiologías más comunes son la hepatitis C, la enfermedad hepática por alcohol y la enfermedad por hígado graso no alcohólico.[7].

### **3.3. Diagnóstico y clasificación del proceso de fibrosis hepática**

La fibrosis hepática puede ser determinada en 2 formas; de manera no invasiva, con una aproximación biológica con cuantificación de marcadores en suero y la segunda en una aproximación física, donde se mide la rigidez del hígado; ambas resultando complementarias [8].

La biopsia hepática ha sido el estándar de oro para la evaluación de la fibrosis porque es una herramienta directa. Sin embargo, es invasiva y estresante para los pacientes y sus médicos, además está sujeta a errores de muestreo, aún en las enfermedades donde el hígado es afectado uniformemente, como en caso de la hepatitis viral[9].

El tamaño de la muestra en la biopsia, varía entre 1 y 3 cm de longitud y entre 1.2 y 2 mm de diámetro, representando aproximadamente 1/50,000 de la masa total del hígado. La biopsia percutánea está asociada con complicaciones significativas en el 3% de los pacientes con una tasa de mortalidad de 0.03%, además de considerarse un procedimiento costoso [10].

Diferentes escalas se han desarrollado con el fin de evaluar la histología de la biopsia hepática para diagnosticar el grado de fibrosis, ejemplo de esto es la escala Ishak que



considera 7 diferentes estadios de la fibrosis hepática en la histología hepática utilizando principalmente la tinción tricrómica de Masson (Figura 3)[11].

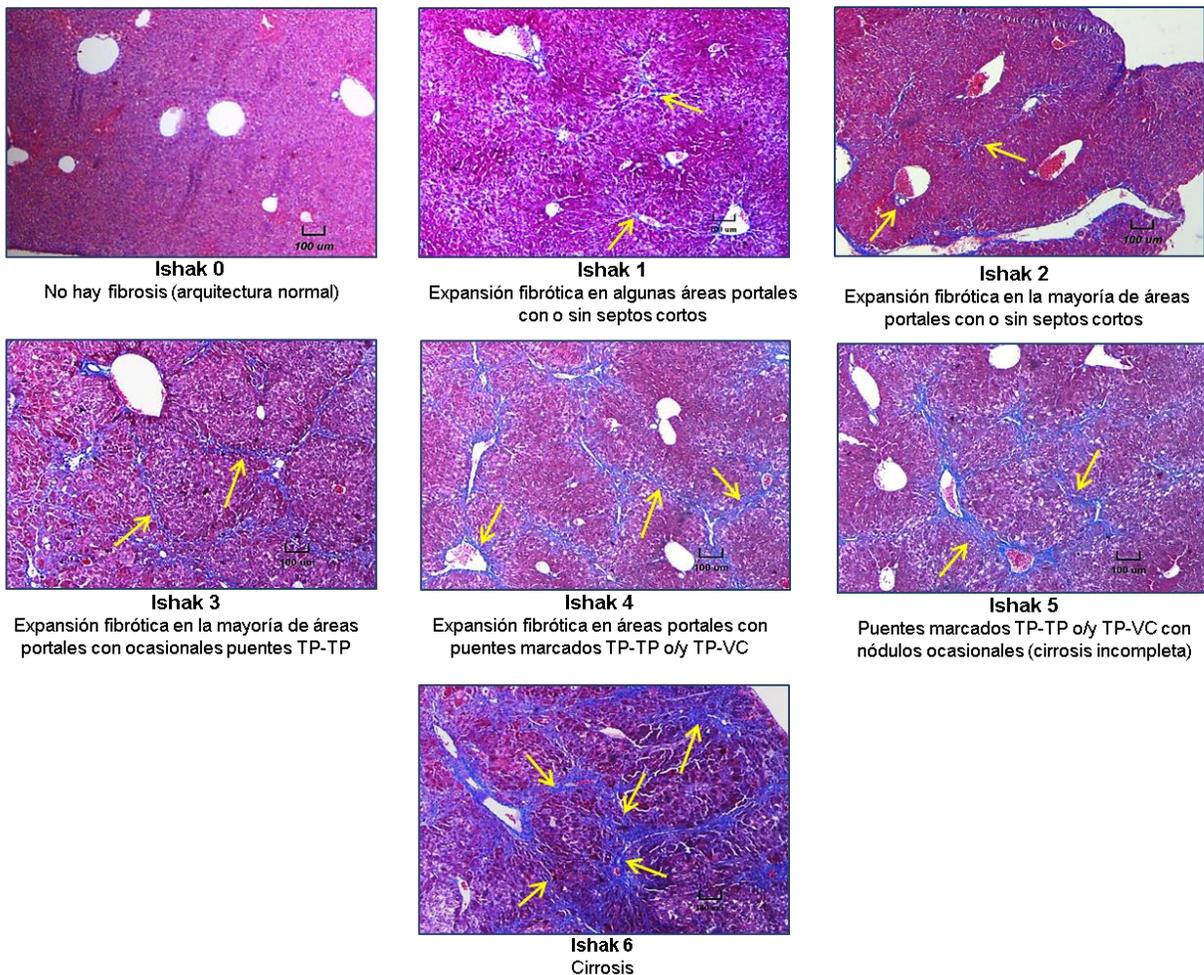


Figura 3. Clasificación de la fibrosis hepática con base a la escala Ishak utilizando la tinción tricrómica de Masson TP: Triada portal, VC: Vena central. Flechas amarillas indican la presencia de fibras de colágeno en el parénquima hepático. Descripción tomada de [11].

El interés de identificar y describir la fibrosis usando marcadores no invasivos ha ido a la alza, estos ofrecen una atractiva alternativa con respecto a la biopsia tanto para los pacientes como para los clínicos. Son prácticamente no complicados, con pocos o ningún error de muestreo y pequeña variabilidad relacionada con el observador, además de que pueden realizarse repetitivamente [12].

Las características ideales para un marcador de fibrosis hepática son: que sea específico del hígado, barato y fácil de realizar, que permita medir: estado de fibrosis (o masa de matriz extracelular), actividad de deposición de matriz y actividad de remoción



de matriz. Además, las concentraciones del marcador de fibrosis hepática no se deben alterar por cambios en la función hepática, renal o reticuloendotelial, debe tener características reproducibles de interpretación y seguir los cambios dinámicos en la fibrogénesis [13].

Tanto la biopsia como la evaluación histológica tienen un papel importante en la clínica, donde destacan principalmente: 1)El diagnóstico, 2)La evaluación del pronóstico (estadio de la enfermedad) y/o 3) asistencia en la toma de decisiones terapéuticas [14].

### **3.4. Modelos animales**

En la investigación de la fibrosis hepática, los experimentos en roedores son el estándar de oro para confirmar o conocer mecanismos asociados a enfermedades y acercarse a alguna situación clínica [15].

Actualmente existe una diversidad de procedimientos estandarizados en modelos animales para causar daño al hígado, como son: colestásicos, tóxicos, inmunogénicos, *knock-outs* metabólicos. Algunos de ellos simulan o progresan a eventos que ocurren en el organismo del ser humano, como hipertensión portal, hepatocarcinoma celular (HCC) y la enfermedad del hígado graso [15].

Tanto en el entorno experimental (animales) como el entorno clínico (humanos), los sistemas para evaluar la fibrosis hepática se basan en análisis de sangre, análisis de la biopsia y técnicas de imagen no invasivas [15].

#### **3.4.1. Hepatotóxico: Tioacetamida (TAA)**

Los agentes hepatotóxicos pueden dañar organelos celulares como mitocondrias, núcleos, vacuolas, retículos y consecuentemente inducir diversos tipos de lesión en el hígado. En distintos modelos experimentales, se hace uso de agentes, como acetaminofén, tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), galactosamina, fructosa y la tioacetamida. Esta última es un compuesto de naturaleza sintética, usado como fungicida, solvente orgánico y también en el proceso de curtición de pieles[16].

Una sola dosis de esta toxina en animales puede producir necrosis centrilobular con una subsecuente respuesta regenerativa[17]. Mientras que la administración crónica lleva a la fibrosis, posteriormente a la cirrosis y finalmente al hepatocarcinoma. Algunas de las



ventajas de la administración de TAA como modelo hepatotóxico consisten en su alta especificidad por el hígado y una gran ventana de tiempo entre efectos necrogénicos y el daño hepático[16].

La toxicidad de la TAA comienza con su bioactivación por el sistema oxidasa, particularmente por CYP2E1 (citocromo P450 2E1), este participa en el metabolismo de carcinógenos en el organismo. La activación metabólica de TAA conduce a la formación de metabolitos reactivos derivados de tioacetamida sulfóxido y tioacetamida disulfóxido que provocan aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) además una unión covalente a proteínas y a ácidos nucleicos provocando estrés oxidativo y finalmente el daño hepático (Figura 4)[16, 18].

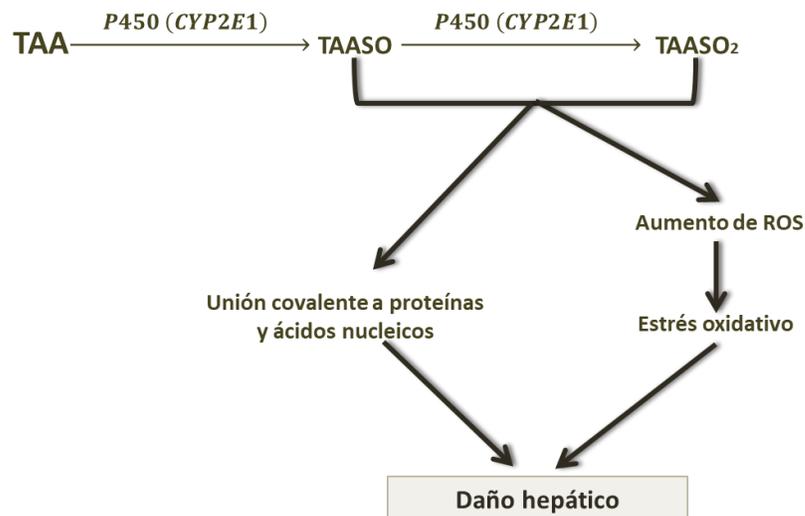


Figura 4. Metabolitos reactivos de TAA y su efecto en el tejido hepático.

### 3.4.2. Colestásico: Ligadura de Conducto Biliar (BDL)

Otro modelo de daño hepático muy estudiado en roedores es la Ligadura de Conducto Biliar (BDL, por sus siglas en inglés, "BileDuctLigation"). Con este procedimiento, la obstrucción y la ligación generan el incremento de la presión biliar, inflamación, necrosis y secreción de citocinas por las células epiteliales biliares, causando colestasis.

La proliferación de las células epiteliales biliares, el incremento de marcadores fibrogénicos, como: el Inhibidor tisular de metaloproteasas tipo 1 (TIMP-1, por sus siglas en inglés, "tissue inhibitor of metalloproteinases") que es una glucoproteína que inhibe la actividad de las metaloproteasas que se encargan de la degradación de ECM, la actina



del músculo liso alfa ( $\alpha$ -SMA, por sus siglas en inglés, “*alphasmoothmuscleactin*”), colágena 1 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés, “*transforminggrowth factor beta*”), además de la acumulación de células B y células T en los tractos portales generan ROS y daño hepático [19].

Además están presentes otros procesos como la proliferación de ductos biliares, diferenciación de fibroblastos portales alrededor de células epiteliales biliares en proliferación y también la expresión masiva y deposición de ECM[20].

La manifestación más visible de las enfermedades hepáticas y del tracto biliar es la ictericia, que consiste en la coloración amarilla de la piel y las mucosas, debido a la acumulación de bilirrubina[19].

La forma de evaluar cualquier tipo de daño hepático, incluyendo el ocasionado por la colestasis se fundamenta en el uso del estándar de oro, la biopsia hepática, y su respectivo análisis histológico utilizando la tinción tricrómica de Masson para observar la deposición de colágena.

El tipo de daño que se causa con la BDL es usado mundialmente en cientos de laboratorios para inducir y entender la patología de la inflamación hepática, colestasis y la fibrosis. Es importante considerar que la ligadura tiene alta variabilidad entre los animales por tratarse de una manipulación quirúrgica[21].

### **3.5. Generalidades IGFbPs**

Los factores de crecimiento tipo insulinoide IGF-I e IGF-II son pequeños péptidos, aproximadamente con un peso molecular de 7 kDa, ambos tienen acciones metabólicas y mitogénicas que participan en el crecimiento, supervivencia y diferenciación de tipos celulares y tejidos [22].

Los componentes del sistema IGF incluye: IGFs (IGF-I y IGF-II), receptores de IGF (tipo I y tipo II), las Proteínas de Unión al Factor de Crecimiento Insulinoide (IGFBPs) y las proteasas de IGFBP. (Figura 5). Las IGFBPs eran consideradas únicamente como acarreadoras de IGFs capaces de prolongar su biodisponibilidad. Estudios posteriores mostraron evidencia *in vivo* e *in vitro*, donde las IGFBPs participan en mecanismos dependientes e independientes de IGF[23].



La superfamilia IGFBP comprende 6 proteínas (IGFBP-1 a la IGFBP-6) que se unen con gran afinidad a IGFs, además de un grupo de proteínas relacionadas a IGFBP (IGFBP-rP 1-9), las cuales se unen con menor afinidad a IGF [24]. Aunque las IGFBPs se producen en todos los tejidos, el hígado es el órgano que aporta la mayor cantidad de estas proteínas a la circulación.

### Sistema del Factor de Crecimiento Insulinoide (IGF)

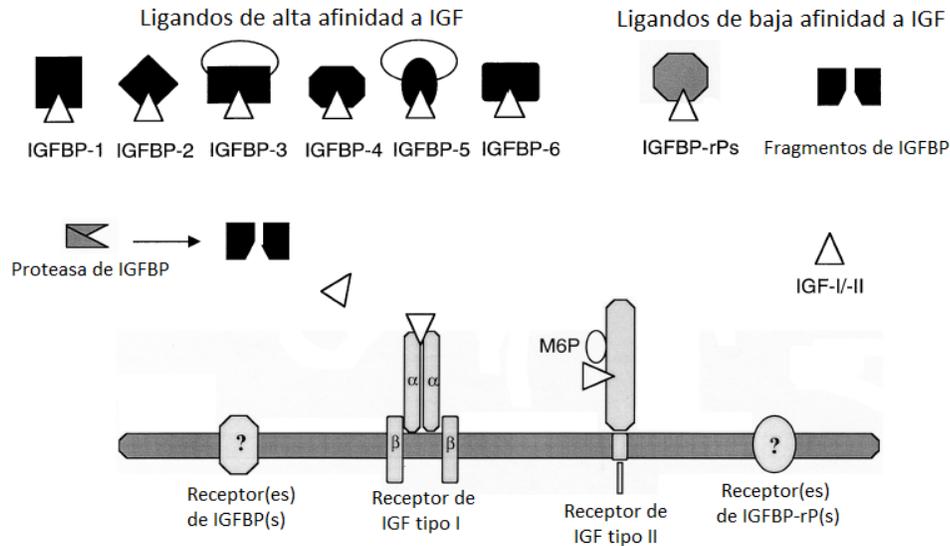


Figura 5. Sistema IGF. Los componentes de este sistema incluyen: Factores de Crecimiento Insulinoide (IGF-I y IGF-II), Proteínas de Unión al Factor de Crecimiento Insulinoide (IGFBP-1 a -6), Proteínas relacionadas a las Proteínas de Unión al Factor de Crecimiento Insulinoide (IGFBP-rPs), proteasas de IGFBP, receptores de IGF tipo-I y tipo -II, Manosa 6-Fosfato (M6P). Se cree que IGFBPs e IGFBP-rPs cuentan con sus propios receptores. Tomada y modificada de [23].

Las IGFBPs tienen un peso aproximado de 24 a 50 kDa (216-289 aminoácidos) y comparten una estructura similar de 3 dominios: N terminal, C terminal, donde ambos están muy conservados y por último, el dominio central que es más variable denominado *linker*. En el dominio N terminal se han identificado los residuos de unión a los IGFs. Adicionalmente pueden presentar motivos funcionales que ayudan a que sus acciones sean diversas.

Algunas de las funciones de las IGFBPs son [23]:

- Limitan la biodisponibilidad de IGFs libres que se unen a receptores de IGFs
- Previenen la hipoglucemia inducida por IGF
- Regulan el transporte de IGFs entre espacios intra- y extra-vascular
- Prolongan la vida media de IGFs en circulación



Las concentraciones séricas de IGFBPs son reguladas mayormente por las concentraciones de IGFs circulantes en condiciones fisiológicas y patológicas[23].

### **3.5.1. IGFBPs en la fibrosis**

Las IGFBPs han mostrado tener acciones independientes a IGFs teniendo un impacto crucial en acciones celulares como el crecimiento, apoptosis y senescencia [25]. IGFBPs varían en su expresión tisular, su respuesta y su regulación por otros factores.

No se ha reportado evidencia clara de la participación de las IGFBPs en la fibrosis hepática, sin embargo, si hay datos de algunas de ellas en la fibrosis de diferentes órganos. Podrían ser capaces de promover este evento por medio de las interacciones con la ECM, como regular su síntesis.

Hay diversos estudios que reportan su participación en el proceso fibrogénico, ejemplo es IGFBP-5, cuyo papel fue reportado en la fibrosis pulmonar idiopática donde los fibroblastos primarios secretan IGFBPs que se unen a la EMC[26]. En el caso específico de IGFBP-5 en piel, induce la activación de fibroblastos residentes y su transformación en miofibroblastos, resultando con un fenotipo fibrótico asociado a cicatrización queloide[27].

IGFBP-3 también se ha reportado incrementada en fibrosis pulmonar, pero de forma dependiente a TGF- $\beta$  (Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$ ), la citocina profibrogénica por excelencia[26].

#### **3.5.1.1. IGFBP-1**

Es una proteína de 25 kDa con una secuencia RGD(secuencia específica de aminoácidos que tiene el tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico), que es clave en la adhesión entre la proteína y la ECM porque los receptores de integrina presentes en la membrana celular reconocen esta secuencia, siendo una de sus acciones independientes a IGF[24].

Es sintetizada en el hígado y en riñones de personas adultas, también es la más abundante en líquido amniótico. Se ha encontrado en condiciones de fosforilación que determinan su afinidad a IGFs. Además las concentraciones de esta proteína en suero



están reguladas predominantemente por insulina y corticosteroides. Después de las comidas, en el suero se encuentra en concentraciones bajas (aprox. 10 ng/dL) pero en condiciones de ayuno se elevan (aprox. 100 ng/dL)[24].

Diversos estudios confirman que la insulina vía inhibición de la transcripción de IGFBP-1 es el determinante primario para su expresión tanto *in vitro* como *in vivo*; además que IGF-I e IGF-II tienen efectos específicos inhibitorios en la expresión de esta proteína. Esto ha sido confirmado con la administración de IGFBP-1 recombinante y en modelos transgénicos. Su expresión se ha encontrado elevada en hígado (no humano) y en riñón durante la regeneración post-lesión[28].

En un estudio realizado en el Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad Intestinal (HIPAM) de la Unidad de Medicina Experimental del Hospital General de México se encontró en el suero de pacientes con fibrosis hepática que los niveles de IGFBP-1 están aumentados hasta 25 veces más con respecto a los controles [29].

#### **3.5.1.2. IGFBP-2**

Se trata de una proteína de 31 kDa, también cuenta con una secuencia RGD que contribuye para su reconocimiento por los receptores (tipo integrina) de adhesión a la EMC [25]. Además, este péptido no se encuentra fosforilado ni glucosilado[24].

Sus concentraciones son dependientes de la edad, con altos niveles observados en la infancia y en la edad avanzada pero a bajos niveles en adultos jóvenes[30]. La mayoría de IGFBP-2 se encuentra en fluido cerebroespinal. En la regulación de su expresión también está implicada la insulina y el estado metabólico[24].

Se ha demostrado que IGFBP-2 se une a componentes de la matriz extracelular en presencia o ausencia de IGFs, contribuyendo a la modulación de la biodisponibilidad de IGF en el espacio pericelular. Es una de las IGFBPs más comúnmente y abundantemente expresada en un gran rango de cánceres humanos, como el HCC [25].



### **3.5.1.3. IGFBP-3**

Fue la primera IGFBP identificada en suero como un complejo de 150-200 kDa (IGF+IGFBP-3+ALS), para posteriormente encontrar a IGFBP-1 e IGFBP-2. Esta proteína tiene 3 sitios de glucosilación y en circulación se encuentre varias formas glucosiladas teniendo un peso entre 40 y 44 kDa, mientras que cuando no está glucosilada pesa 29 kDa. Las concentraciones séricas de IGFBP-3 e IGFs varían con la edad, comenzando bajas en el nacimiento, incrementando en la infancia y en la adolescencia tienen sus picos más altos para posteriormente decrecer[24].

Las concentraciones séricas de esta proteína en pacientes con cirrosis se han correlacionado con la gravedad de la enfermedad hepática, donde en pacientes con cirrosis compensada las concentraciones de IGFBP-3 eran bajas y después de un trasplante hepático mejoraban considerablemente, sugiriendo que la proteína IGFBP-3 circulante tiene relevancia como un biomarcador pronóstico en pacientes con cirrosis hepática [31].

### **3.5.1.4. IGFBP-5**

Se trata de una proteína con un peso molecular de 31 kDa, que tiene una mayor afinidad por IGF-II sobre IGF-I, su acción moduladora a este factor es principalmente potenciadora. Se ha reportado que esta proteína se puede unir a componentes de la ECM, como la colágena tipo I y la fibronectina [32].

Como se mencionó anteriormente, este péptido se ha visto involucrado en procesos fibróticos, el ejemplo es la fibrosis pulmonar idiopática, donde las IGFBPs que se unen a la EMC son secretadas por fibroblastos primarios [26].

En el HIPAM, se tiene evidencia de la cuantificación de IGFBP-5 en tejido hepático en un modelo murino con daño hepático causado por la administración de tetracloruro de carbono; se encontró disminución significativa de su concentración en la etapa más avanzada de la fibrosis: cirrosis hepática pero sin cambios en etapas previas[33].



#### **3.5.1.5. IGFBP-6**

IGFBP-6 es una proteína O-glucosilada con un peso molecular de 34 kDa. En humanos se ha encontrado predominantemente en Fluido Cerebroespinal (CSF) y suero. Además se une preferentemente a IGF-II sobre IGF-I. Se expresa en células ováricas, células prostáticas, fibroblastos y otras células, está regulada por IGF-II y otras hormonas[24].

Su participación se ha investigado en muchos cánceres, en la mayoría de los estudios la expresión de IGFBP-6 fue menor en las células malignas que en células normales considerándolo que está actuando como un inhibidor de procesos tumorales[34]. En un estudio, las concentraciones plasmáticas de IGFBP-6 se reportaron significativamente bajas en pacientes con HCC comparándolos con las concentraciones séricas de pacientes con hepatitis viral B o C [35].

#### **3.5.1.6. IGFBP-7**

Se trata de una proteína N-glucosilada con un peso molecular de 26 kDa[23] y se une a los factores de crecimiento tipo insulinoide con baja afinidad. Sin embargo a insulina se une con gran afinidad y tiene un papel independiente de IGF. Es expresada en tejidos de manera normal y también se ve implicada en diversos procesos fisiológicos, como: proliferación celular, adhesión, senescencia, apoptosis y angiogénesis [36].

Se han observado niveles bajos en todo el hígado comparado con altos niveles en HSCs indicando que las células estelares son la mayor o posiblemente las únicas fuentes de IGFBP-7 en el hígado [36].

Existe la evidencia que la expresión de IGFBP-7 es específica para activar las células estelares hepáticas en el hígado, siendo esta activación un evento crítico en el desarrollo de la fibrosis hepática [37].



#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las concentraciones de las proteínas IGFBP se han visto alteradas en diversas patologías del hígado como la cirrosis y el HCC, pero no se tiene evidencia a nivel sérico sobre lo que ocurre en etapas previas a estos estadios.

Se han reportado a las IGFBPs como potenciales reguladoras de las síntesis de EMC, ejemplo es IGFBP-5, que participa en la fibrosis de diferentes tejidos. Por lo anterior, en este trabajo se propone el estudio de las concentraciones séricas de IGFBPs en dos modelos murinos con inducción de daño hepático.

#### **5. HIPÓTESIS**

Las IGFBPs regulan la síntesis de EMC, por lo tanto dentro del proceso fibrogénico hepático participaran aumentando su concentración en circulación independiente de la etiología del daño hepático, ya sea por hepatotoxicidad (TAA) o colestasis biliar (BDL).

#### **6. OBJETIVOS**

##### **6.1. Objetivo general**

Estudiar la concentración sérica de las Proteínas de unión al Factor de Crecimiento Insulinoide (IGFBP) 1, 2, 3, 5, 6 y 7 durante el daño hepático inducido en dos modelos murinos: Hepatotoxicidad por Tioacetamida (TAA) y colestasis por Ligadura de Conducto Biliar (BDL).

##### **6.2. Objetivos particulares**

- Inducir fibrosis hepática en dos modelos murinos con Tioacetamida y con Ligadura de Conducto Biliar.
- Establecer el grado de fibrosis en el tejido hepático mediante las tinciones histológicas.
- Cuantificar las concentraciones séricas de las IGFBPs en la fibrosis hepática.
- Identificar la asociación entre las concentraciones circulantes de las proteínas IGFBP y la presencia de fibrosis hepática.



## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Modelos murinos

#### 7.1.1. Modelo hepatotóxico para inducción de fibrosis hepática con TAA

Se utilizaron 36 ratones (*Mus musculus*) hembra de la cepa C57BL/6 con peso de  $22 \pm 3$  g y 12 semanas de edad, fueron mantenidos en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Hospital General de México y se establecieron acorde a la NOM-062-ZOO-1999.

Los ratones fueron tratados con dosis crecientes de tioacetamida (TAA) siguiendo el protocolo de “*Optimized Mouse Models for Liver Fibrosis*” [6] donde la 1ª y 2ª dosis fueron de 50 mg/kg, de la 3ª a 5ª dosis de 100 mg/kg, de la 6ª a la 10ª dosis fue de 200 mg/kg, de la 11ª a 15ª dosis de 300 mg/kg para finalmente continuar con 400 mg/kg hasta el final del tratamiento con TAA.

Las administraciones fueron realizadas 3 veces por semana durante 4, 6 y 8 semanas, cada uno de los ratones recibió 200  $\mu$ l de la solución de TAA con la dosis ya mencionada por vía intraperitoneal (i.p). Los grupos se distribuyeron de la siguiente forma: Grupo TAA4 con 12 dosis (n=7), Grupo TAA6 que recibió 18 dosis (n=7) y TAA8 con 24 dosis de TAA (n=7). Cada uno contó con su grupo control (n=5 para cada uno) (CTAA4, CTAA6, CTAA8) que también recibieron 200  $\mu$ l de vehículo (SS: solución salina 0.9%) i.p. bajo los mismos esquemas de administración que los grupos con TAA.

#### 7.1.2. Modelocolestásico para inducción de fibrosis hepática con BDL

Se utilizaron 9 ratones (*Mus musculus*) macho de la cepa CD-1 con peso de  $25 \pm 3$  g y 10 semanas de edad, fueron mantenidos en el bioterio de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Hospital General de México y se establecieron acorde a la NOM-062-ZOO-1999.

Los ratones fueron sometidos a una intervención quirúrgica con ligadura de conducto biliar (BDL, n=5) [20] y fueron mantenidos 7 días post-cirugía (BDL7). Se contó con



sugrupo control (SHAM, n=4) que tuvo intervención quirúrgica pero sin la ligadura de conducto biliar.

## **7.2. Recolección de muestras**

Al término de cada tratamiento, los ratones tuvieron un ayuno de 4 horas y se sacrificaron mediante un exceso de anestesia (Ketamina (Anesket, Pisa, México)/Xilacina (Procin, Pisa, México)) vía i.p (dosis: 0.4/4.0 mg/kg), la sangre total se recolectó vía punción cardiaca. Se obtuvo el suero mediante centrifugación y fue conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Del tejido hepático se conservaron 3 muestras en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  y una cuarta muestra fue fijada en formaldehído 3.7% v/v en PBS (NaCl 138 mM, KCl 0.3 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM) para posteriormente realizar el análisis histológico.

## **7.3. Histología**

La microestructura del hígado se analizó mediante tinciones histológicas realizadas a la muestra de tejido hepático que fue conservada en formaldehído. De manera breve: las muestras se fijaron durante una semana en la solución de formaldehído, posteriormente se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$ . Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), tricrómica de Masson (TM) y rojo de sirio (RS) de acuerdo a los protocolos previamente establecidos en el laboratorio HIPAM (Anexo 1).

## **7.4. Cuantificación de proteínas IGFBPs en suero por medio de MILLIPLEX® MAP Kit.**

Del suero obtenido de cada ratón se realizó una dilución 1:20 con PBS para cuantificar las IGFBPs mediante un arreglo en suspensión múltiple. A manera de resumen: se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de buffer de ensayo (Assay Buffer, #LE-ABGLP de Millipore®) a cada uno de los pozos de una placa de 96 pozos, se agitó por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente el buffer se decantó. Se adicionaron 25  $\mu\text{l}$  de estándares (#MIGFBP-8043 de Millipore®), controles y muestras a su respectivo pozo, además se agregó 25  $\mu\text{l}$  de buffer de ensayo al pozo correspondiente al blanco. Se adicionaron 25  $\mu\text{l}$  de solución matriz (SerumMatrix, #MIGF-SM de Millipore®) a los pozos del blanco, estándares y los controles. Se agregaron 25  $\mu\text{l}$  del mix de esferas magnéticas (#MIGFBP-MAG de Millipore®) a cada pozo y se dejó incubando toda la



noche en agitación y a 4°C. La placa se colocó sobre una placa magnética para que las esferas se mantuvieran en el fondo de la placa y se realizaron 3 lavados con buffer de lavado (Wash Buffer, #L-WB de Millipore®). Después del término de los lavados se adicionaron 50 µl de anticuerpo de detección (#MIGFBP-1043 de Millipore®) a cada pozo, la placa fue incubada 30 minutos a temperatura ambiente. Al término de esto, se añadieron 50 µl de estreptavidina-ficoeritrina (#L-SAPE de Millipore®) por cada uno de los pozos dejando incubar otros 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se realizaron 3 lavados con buffer de lavado, se agregaron 100 µl de Sheath Fluid (#40-5000 de Luminex Corporation®) a cada pozo y se resuspendieron las esferas por 5 minutos. La placa fue leída en el equipo Luminex 200® (BioRad). La concentración de las proteínas IGFBPs se calculó con base en la curva estándar y el rango de su determinación de las IGFBPs (1, 2, 3, 6 y 7) fue de 0.04-30.00 ng/mL.

## 7.5. Análisis estadístico

### Modelo con daño hepatotóxico

Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de la prueba *post-hoc* de Tukey para comparar diferencias entre los grupos. Dado que todos los grupos control (CTAA4, CTAA6 y CTAA8) se comportaron igual, se analizaron como uno solo para realizar las comparaciones con los grupos de 12 dosis de TAA (Ishak2), 18 dosis de TAA (Ishak3) y 24 dosis de TAA (Ishak4) y los resultados se muestran como media ± DE.

### Modelo con daño colestásico

Los datos fueron analizados por una Prueba *t* de student para comparar diferencias entre los 2 grupos y los resultados se presentan como media ± DE.

Para ambos modelos el análisis estadístico se realizó con el programa *GraphPad Prism* 6 (La Jolla, CA, USA) y se consideraron valores significativos de  $p < 0.05$ .



## 8. RESULTADOS

### 8.1. Modelo murino con daño hepatotóxico

#### 8.1.1. Inducción de fibrosis hepática por TAA

Se indujo daño hepático mediante la administración de TAA, en diferentes dosis para cada grupo. De manera macroscópica, el daño se iba haciendo más notable conforme el número de dosis del hepatotóxico aumentaba (Figura 6). Comparando el hígado sano que solo fue administrado con SS que presentó coloración roja y superficie lisa (Figura 6A), en los hígados con tratamiento (Figuras 6B, 6C y 6D) se observó una superficie rugosa y disminución en la coloración del tejido.

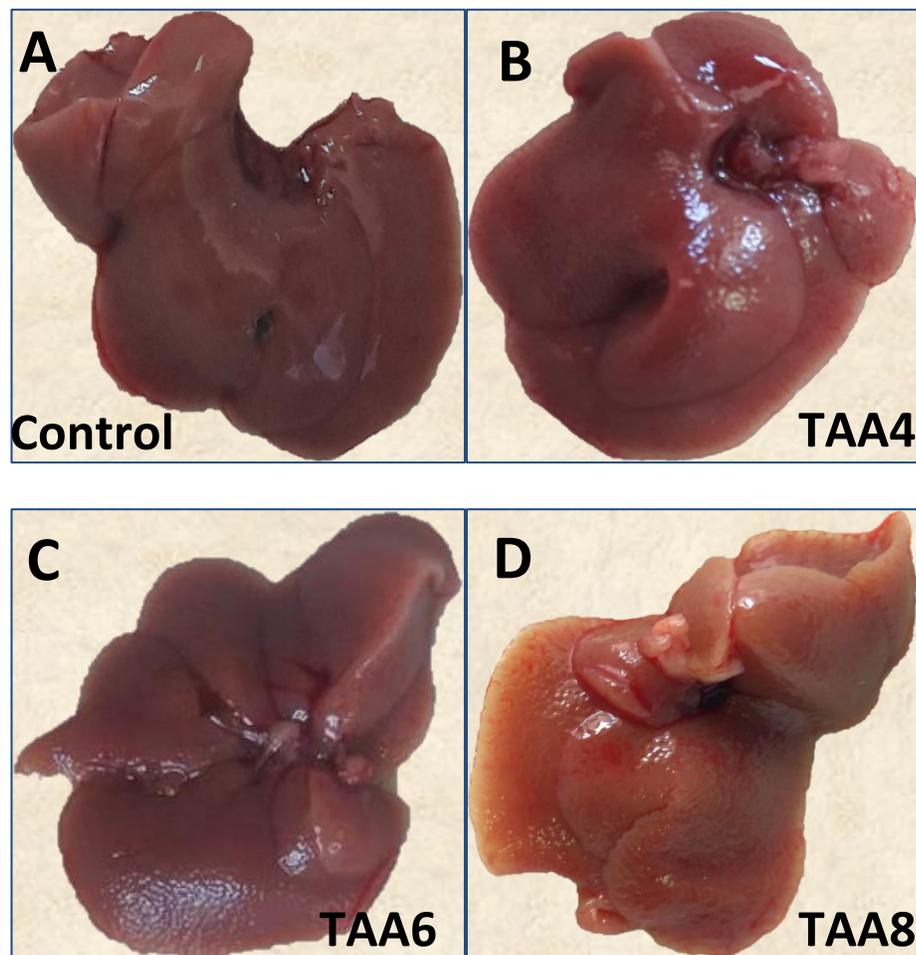


Figura 6. Imágenes del hígado con las diferentes dosis de TAA. A. Hígado control con administración de SS. B. Hígado después de 4 semanas de tratamiento con TAA. C. Hígado posterior a 6 semanas de tratamiento con TAA. D. Hígado después de 8 semanas de tratamiento con TAA. Se observa como conforme avanza el tiempo se hace más evidente una superficie rugosa en el tejido hepático y el color del tejido está disminuyendo.



### **8.1.2. Tinciones histológicas y evaluación del grado de fibrosis (TAA)**

En ambos modelos se utilizaron tinciones hematoxilina y eosina, tricrómica de Masson y rojo de sirio para observar el grado de fibrosis del hígado con apoyo de la escala de Ishak para la clasificación de la misma en cada grupo.

De manera general, la hematoxilina tiñe de azul o violeta los núcleos de las células, mientras que la eosina tiñe de rosa el citoplasma, se observan infiltrados inflamatorios en la micro arquitectura hepática de 2 grupos de tratamiento con TAA señalados con las flechas amarillas (*Figura 7. C2 y D2*).

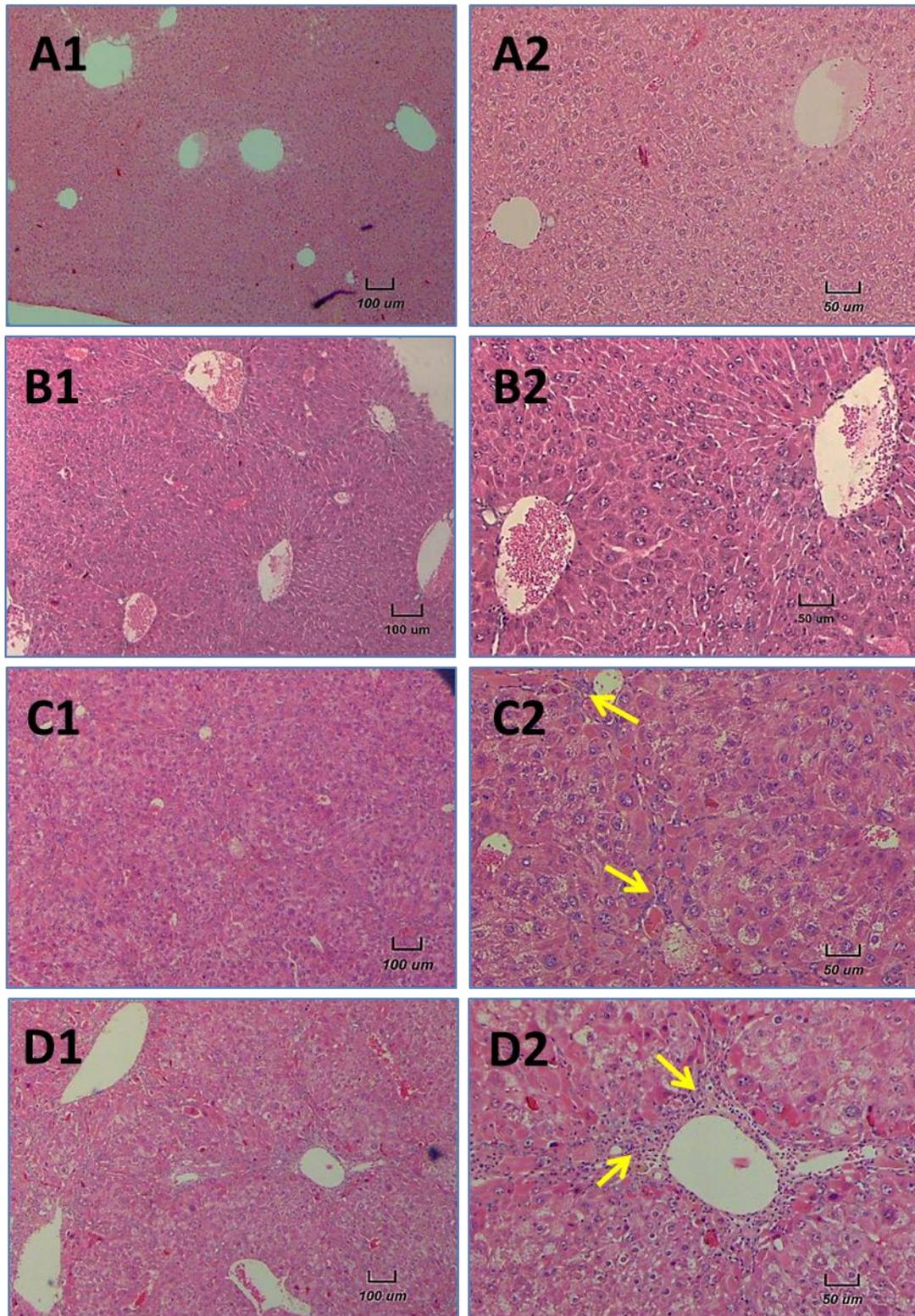


Figura 7. Imágenes de histologías con tinción hematoxilina y eosina (H&E). A1, A2. Hígado control (Ishak 0). B1, B2. Hígado con TAA durante 4 semanas (Ishak 2). C1, C2. Hígado con TAA durante 6 semanas (Ishak 3). D1, D2. Hígado con TAA durante 8 semanas (Ishak 4). Conforme el daño aumenta causado por la TAA, la arquitectura ordenada del tejido hepático se va perdiendo comparando con el control. Imágenes A1, B1, C1 y D1 en aumento 4X e imágenes A2, B2, C2 y D2 en aumento 10X. Flechas amarillas indican infiltrados inflamatorios.



La tinción de rojo de sirio es una tinción selectiva para destacar las fibras o la colágena tiñendo el tejido conectivo de un color rojo intenso, núcleos y citoplasmas de las células de un rojo débil, el uso de luz polarizada en esta tinción además permite diferenciar a las colágenas tipo I y III en naranja y verde respectivamente, es importante resaltar que estos tipos de colágena están asociados a fibrosis y cicatrización en el hígado mientras que la colágena presente en el hígado sano es predominantemente de tipo IV[5]. Conforme la administración de TAA fue aumentando, la presencia de colágena se hacía más evidente (señalización con flechas negras y amarillas), tanto las imágenes con técnica de campo claro como las imágenes de luz polarizada se complementan, teniendo una mayor certeza de la ubicación de las colágenas en el tejido hepático (*Figura 8*).

En el caso de la tinción tricrómica de Masson, se utiliza para destacar las fibras de sostén o la colágena, principalmente tipo I y nos permite ver el citoplasma en rojo-rosa y las colágenas en color azul, conforme el daño aumenta en el tejido hepático la presencia y acumulación de colágenas aumenta hasta la formación puentes (*Figura 9*).

De acuerdo a la escala Ishak; el grupo control (C) se clasificó en 0 por la ausencia de fibrosis, además de presentar una arquitectura normal en el tejido (*Figura 9. A1, A2*); para el grupo TAA4 se clasificó en Ishak 2 porque se observa la expansión de fibra en la mayoría de áreas portales ya sea, con o sin septos cortos (*Figura 9. B1, B2*). Para el grupo TAA6 se clasificó en Ishak 3 puesto que además de la expansión de fibras en áreas portales también hay ocasionales puentes entre vena porta-vena porta (*Figura 9. C1, C2*), para nuestro último grupo TAA8 se clasificó en Ishak 4 porque se observaron marcados puentes, de manera vena porta-vena porta y vena porta-vena central (*Figura 9. D1, D2*).

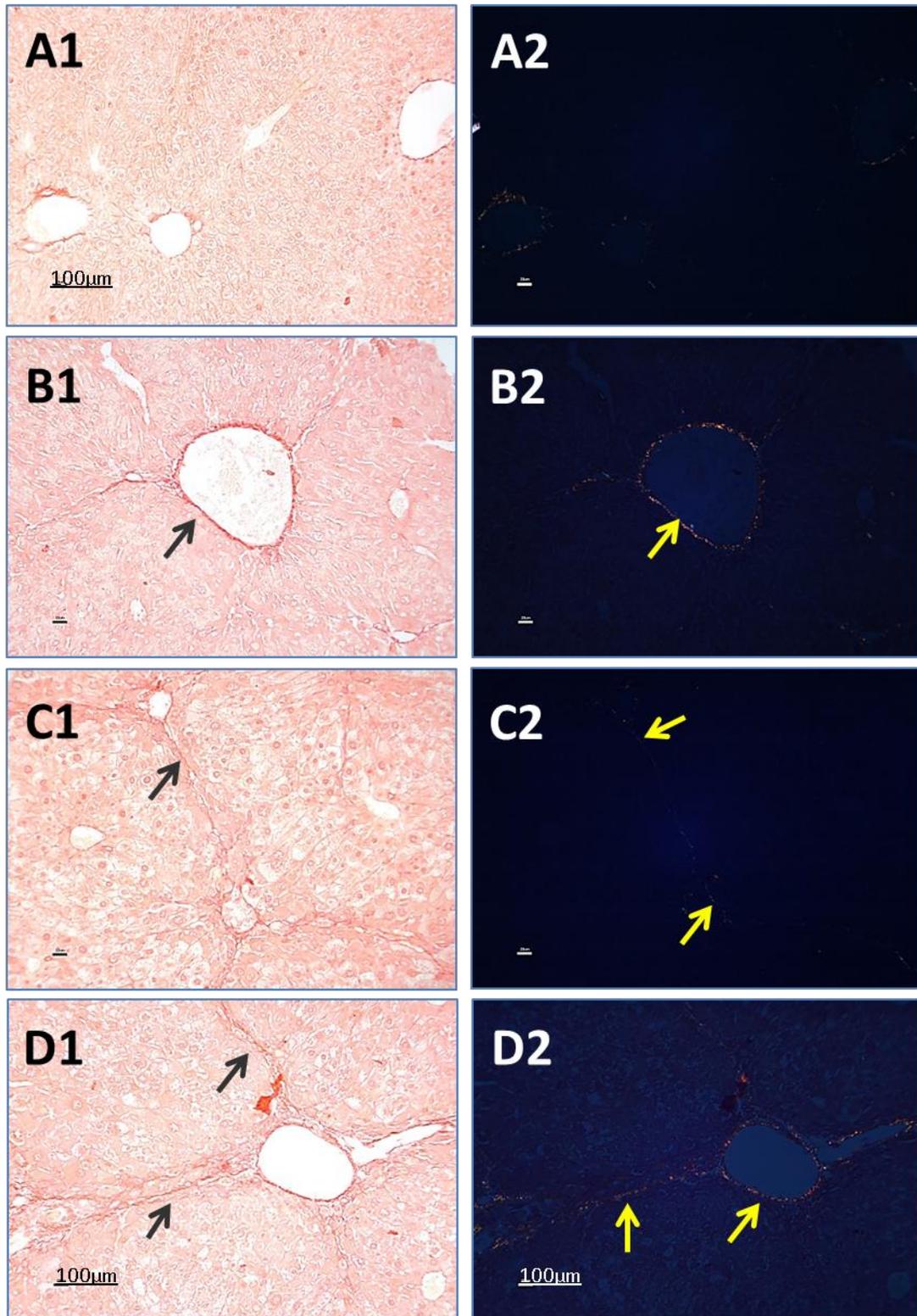


Figura 8. Imágenes de histologías con tinción rojo de sirio (RS). Imágenes a la izquierda con técnica de campo claro, imágenes a la derecha con técnica de iluminación con luz polarizada. A1, A2. Hígado control (Ishak 0). B1, B2. Hígado con TAA durante 4 semanas (Ishak 2). C1, C2. Hígado con TAA durante 6 semanas (Ishak 3). D1, D2. Hígado con TAA durante 8 semanas (Ishak 4). Imágenes en aumento 12.5X. Flechas señalan la presencia de colágena.

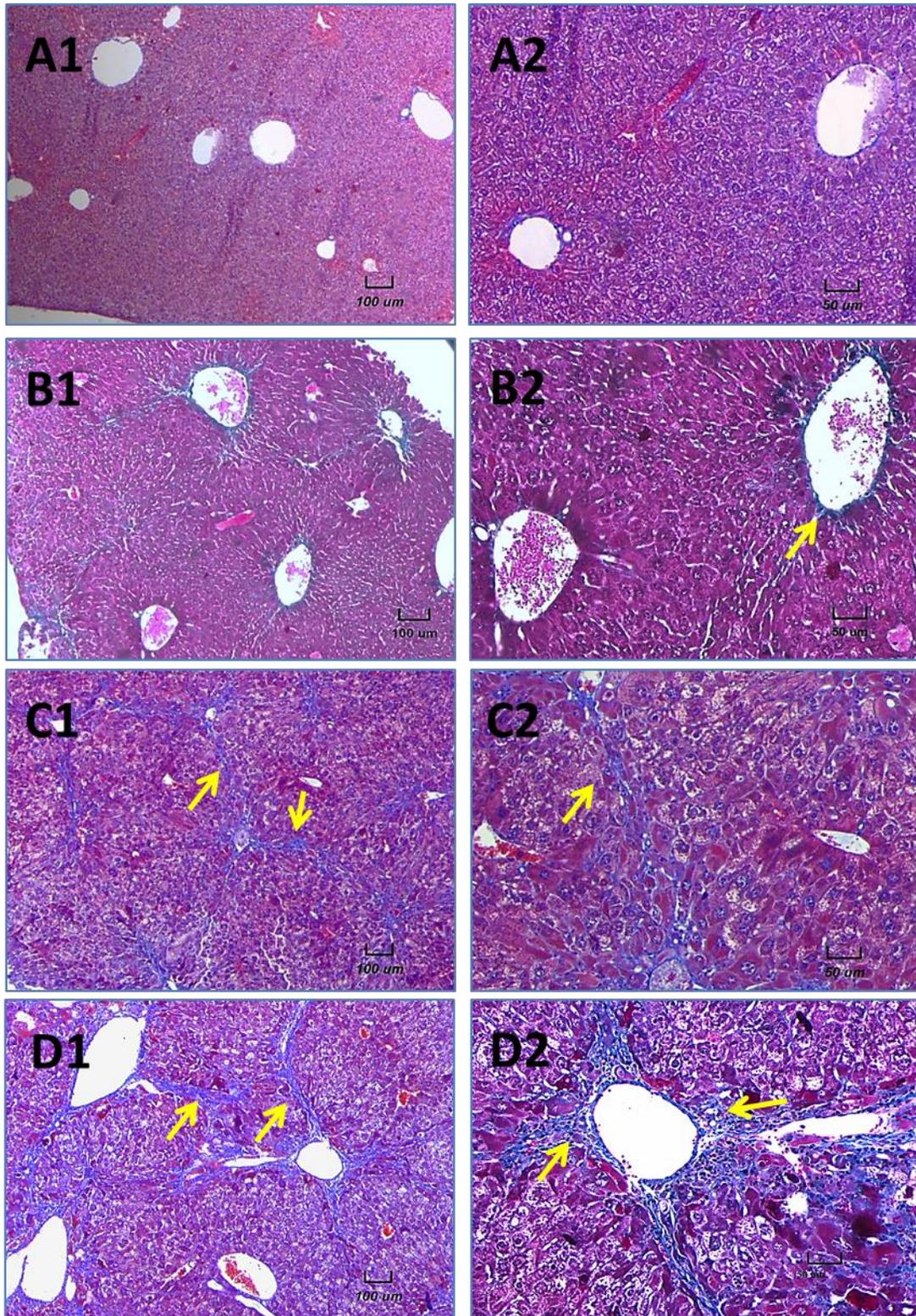


Figura 9. Imágenes de histologías con tinción tricrómica de Masson (TM). A1, A2. Hígado control (Ishak 0). B1, B2. Hígado con TAA durante 4 semanas (Ishak 2). C1, C2. Hígado con TAA durante 6 semanas (Ishak 3). D1, D2. Hígado con TAA dentro de 8 semanas (Ishak 4). Conforme el daño aumenta causado por la administración de TAA, se observa la presencia de fibras y formación de algunos puentes de colágeno. Imágenes A1, B1, C1 y D1 en aumento 4X e imágenes A2, B2, C2 y D2 en aumento 10X. Flechas amarillas indican la presencia de colágeno.



La Tabla 1 muestra la clasificación de los grupos de tratamiento con TAA de acuerdo a la escala Ishak y describiendo las características observadas en las histologías. Se observó la progresión de la fibrosis asociada al incremento en el número de dosis de TAA; en contraste los controles no mostraron fibrosis, independientemente del número de dosis de solución salina, por lo cual fueron agrupados y tratados como un solo grupo control.

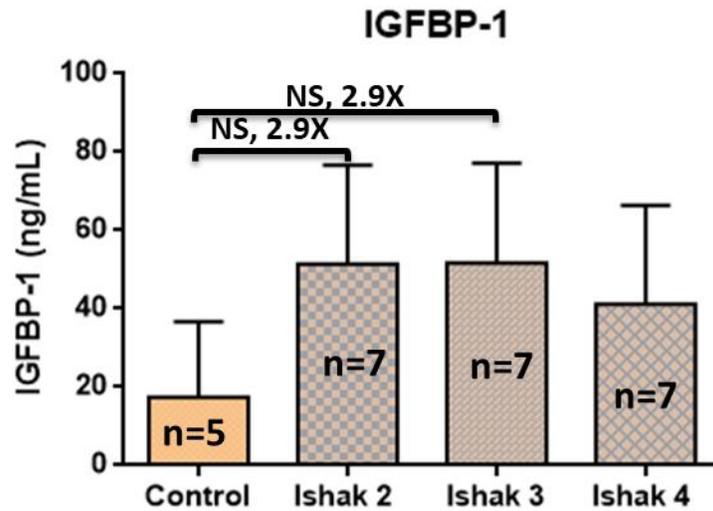
Grupo	Descripción	No. dosis de TAA o solución salina	Escala Ishak
CTAA4	No hay fibrosis	12	0
TAA4	Expansión fibrótica de la mayoría de las áreas portales con o sin septos cortos fibrosos	12	2
CTAA6	No hay fibrosis	18	0
TAA6	Expansión fibrótica de la mayoría de las áreas portales con ocasionales puentes porta-porta	18	3
CTAA8	No hay fibrosis	24	0
TAA8	Expansión fibrótica de las áreas portales con marcados puentes porta-porta o porta-central	24	4

Tabla 1. Clasificación de los grupos de TAA de acuerdo a la escala Ishak

### 8.1.3. Cuantificación de las IGFBPs en el suero (TAA)

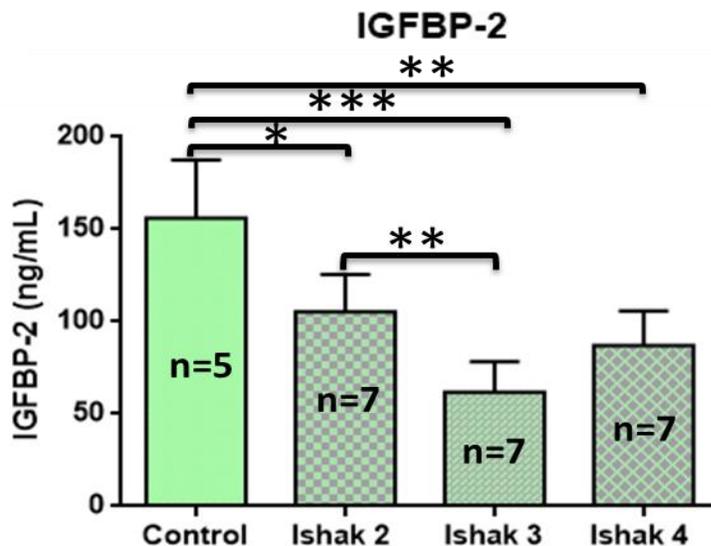
Se determinó la concentración de las IGFBPs (1, 2, 3, 6 y 7) a nivel sérico con un arreglo en suspensión múltiple. Donde cada una de las proteínas mostró un patrón de secreción diferente conforme el daño hepático fue aumentando.

Las concentraciones séricas de IGFBP-1 en los diferentes grados de fibrosis estudiados en el modelo con TAA no fueron diferentes significativamente con respecto al control (C=17.3±19.28, Ishak2=51.4±25.23, Ishak3=51.6±25.65, Ishak4=41.1±25.31 ng/mL) (*Gráfica 1*). Sin embargo se pudo observar un incremento aproximado de 2.9 veces en los estadios Ishak2e Ishak3 con respecto al grupo control.



Gráfica 1. Concentración de IGFBP-1 en el suero de los diferentes grupos tratados con TAA. Los resultados muestran la media  $\pm$ DE. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de la prueba *post-hoc* de Tukey. No se observó diferencia entre grupos. NS: No significativo, 2.9X: Incremento de 2.9 veces.

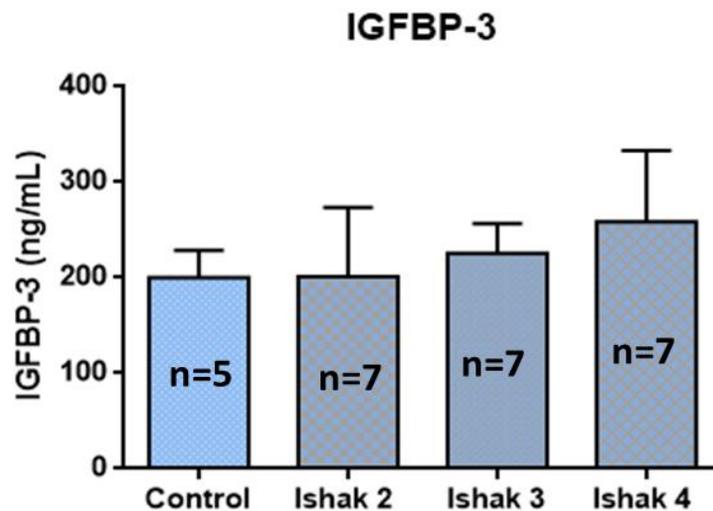
En el caso de la concentración sérica de IGFBP-2 disminuyó significativamente con respecto al control en todos los tiempos de tratamiento de TAA, así como entre el grupo Ishak3 vs Ishak4 (C=156.0 $\pm$ 31.59,Ishak2=105.4 $\pm$ 20.17,Ishak3=61.9 $\pm$ 16.50, Ishak4=87.1 $\pm$ 18.68ng/mL)(Gráfica 2).



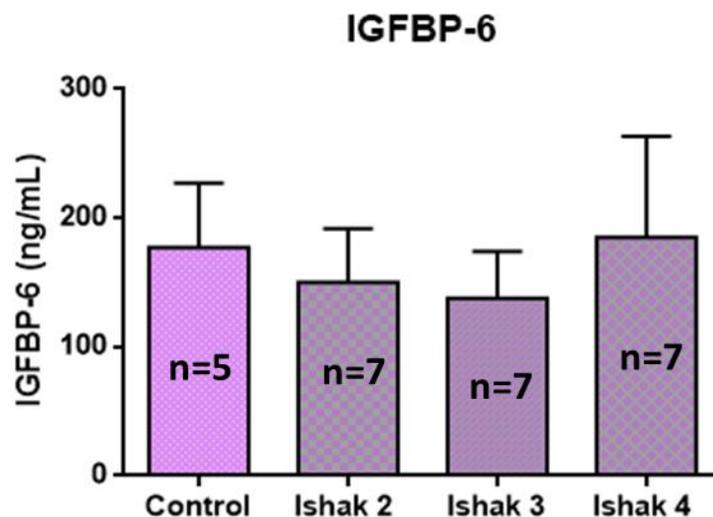
Gráfica 2. Concentración de IGFBP-2 en el suero de los diferentes grupos con tratamiento de TAA. Los resultados muestran la media  $\pm$ DE. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de la prueba *post-hoc* de Tukey. Se observó diferencia entre Control vs. Ishak2, Ishak3 y Ishak4, y también entre Ishak3 vs. Ishak4. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.



La concentración sérica de IGFBP-3 no presentó diferencia significativa en el tratamiento con TAA (C=200.3±28.47, Ishak2=201.3±72.06, Ishak3=226.0±30.88, Ishak4=258.6±74.60 ng/mL) (Gráfica 3) y la proteína IGFBP-6 tampoco presentó diferencia significativa al tratamiento con TAA (C=177.2±49.93, Ishak2=150.2±41.51, Ishak3=137.5±36.50, Ishak4=184.9±78.54 ng/mL) (Gráfica 4).



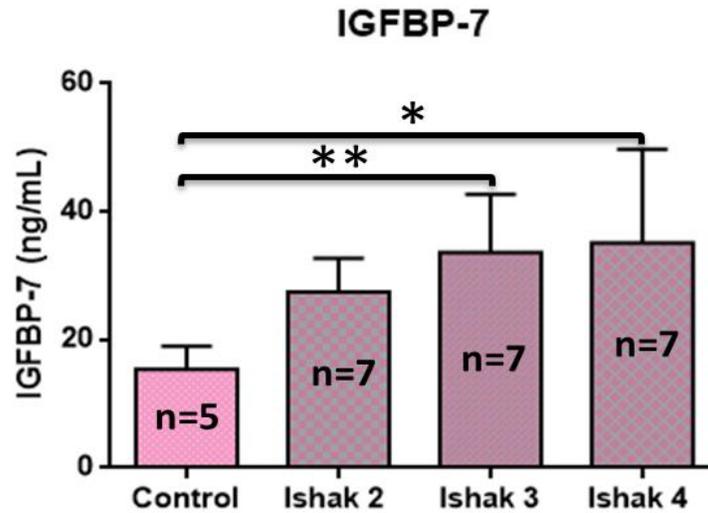
Gráfica 3. Concentración de IGFBP-3 en el suero de los diferentes grupos con tratamiento de TAA. Los resultados muestran la media ±DE. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de la prueba *post-hoc* de Tukey. No se observó diferencia significativa entre grupos.



Gráfica 4. Concentración de IGFBP-6 en el suero de los diferentes grupos con tratamiento de TAA. Los resultados muestran la media ±DE. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de la prueba *post-hoc* de Tukey. No se observó diferencia significativa entre grupos.



Por otra parte, la concentración de IGFBP-7 aumentó significativamente con respecto al control en los 2 últimos tiempos del tratamiento de TAA (C=15.4±3.66, Ishak2=27.5±5.25, Ishak3=33.6±9.12, Ishak4=35.2±14.57ng/mL)(Gráfica 5).



Gráfica 5. Concentración de IGFBP-7 en el suero de los diferentes grupos con tratamiento de TAA. Los resultados muestran la media ±DE. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de la prueba *post-hoc* de Tukey. Se observó diferencia significativa entre Control vs. Ishak3 e Ishak4. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

La determinación de IGFBP-5 sí fue realizada en el arreglo en suspensión múltiple pero al revisar los datos obtenidos de esa proteína no se obtuvo ningún dato válido para su análisis en ambos modelos, esto se puede atribuir a algún defecto que hayan presentado las esferas magnéticas correspondientes a la proteína IGFBP-5 en el kit comercial.

## 8.2. Modelo murino con daño colestásico

### 8.2.1. Inducción de fibrosis hepática por BDL

Se indujo daño hepático mediante la Ligadura de Conducto Biliar (BDL) por 7 días. Se observa el hígado del SHAM que presenta una coloración roja y superficie lisa (Figura 10A), mientras que el grupo con BDL a los 7 días post-cirugía muestra una pérdida de coloración en el tejido hepático comparado al SHAM y un mayor tamaño de la vesícula biliar (Figura 10B).

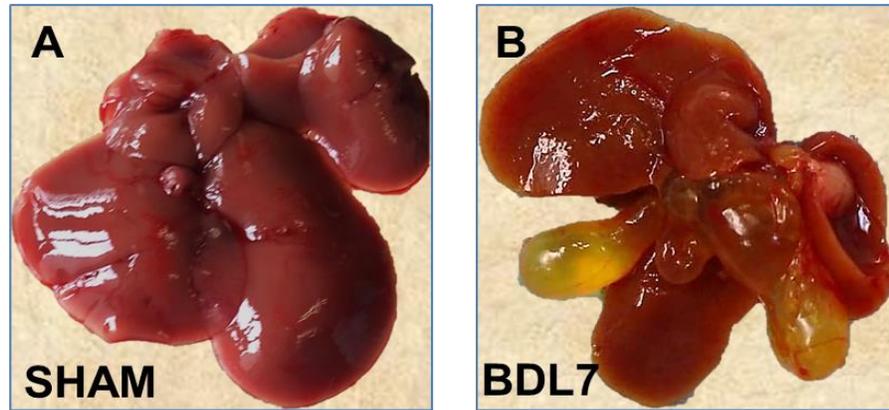


Figura 10. Imágenes del hígado, grupo SHAM y grupo BDL7. A. SHAM. Hígado con coloración rojiza sin alteraciones. BDL7. Hígado de 7 días post-cirugía con una pérdida de coloración y una vesícula biliar de tamaño anormal.

### 8.2.2. Tinciones histológicas y evaluación del grado de fibrosis (BDL)

En la tinción de hematoxilina y eosina, la arquitectura hepática en el SHAM se observa sin alteraciones (*Figura 11.A1, 11.A2*); en contraste, en la histología del grupo que recibió el tratamiento con BDL por 7 días se observa infiltrado inflamatorio y la presencia de fibras, señalado con flechas amarillas (*Figura 11. B2*).

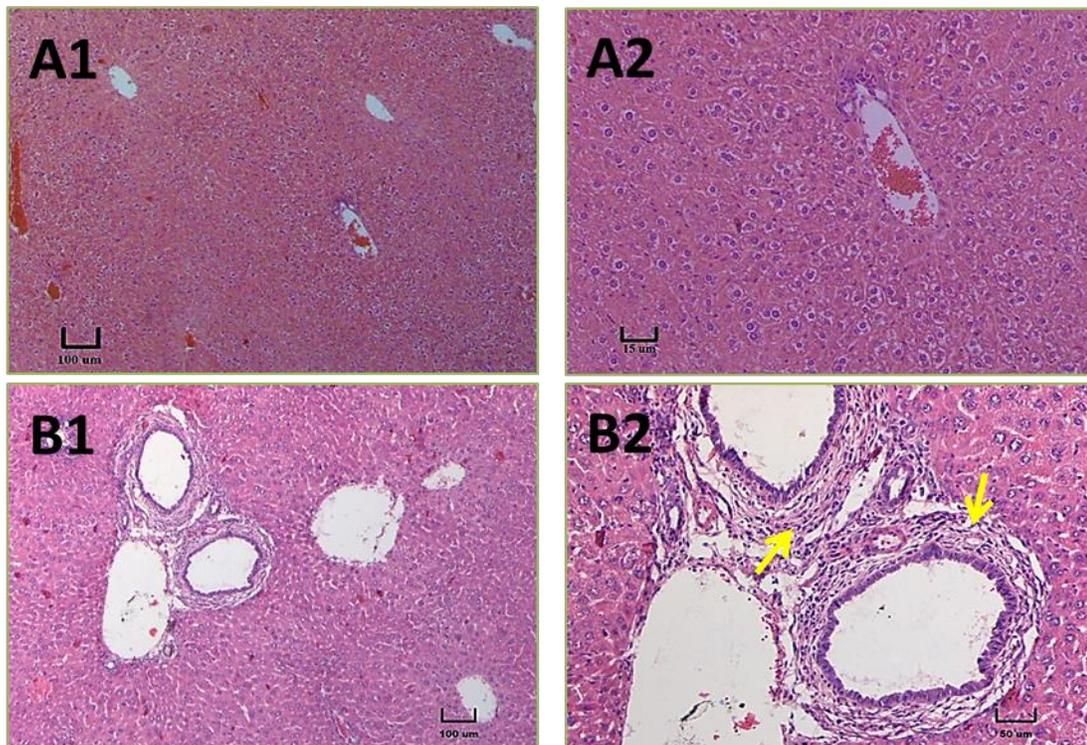


Figura 11. Imágenes de histologías con tinción hematoxilina y eosina (H&E). A1 y A2. Hígado SHAM (Ishak 0). B1 y B2. Hígado con BDL post-cirugía 7 días (Ishak 2). El daño provocado por la BDL es evidente a los 7 días comparado al SHAM. Imágenes A1 y B1 en aumento 4X e imágenes A2 y B2 en aumento 10X. Flechas indican la presencia de fibrosis e infiltrado inflamatorio.



En la tinción de rojo de sirio se observa la presencia de fibras alrededor del tracto portal (señalización con flechas negras y amarillas)(Figura 12. B1, B2), mientras que en el SHAM no hay alteraciones (Figura 12. A1, A2).

En la tinción de tricrómica de Masson, también se destacan las fibras en el tejido hepático con 7 días de ligadura con las flechas amarillas(Figura 13.B2).En contraste con el grupo SHAM que no muestra fibra (Figura 13. A1, A2).

El grupo SHAM se clasificó en Ishak0 por la ausencia de fibrosis, además de presentar una arquitectura normal en el tejido(Figura 13.A1, A2); el grupo BDL7 se clasificó en Ishak 2 porque se observa la expansión de fibra en la mayoría de áreas portales ya sea, con o sin septos cortos(Figura 13. B1, B2).

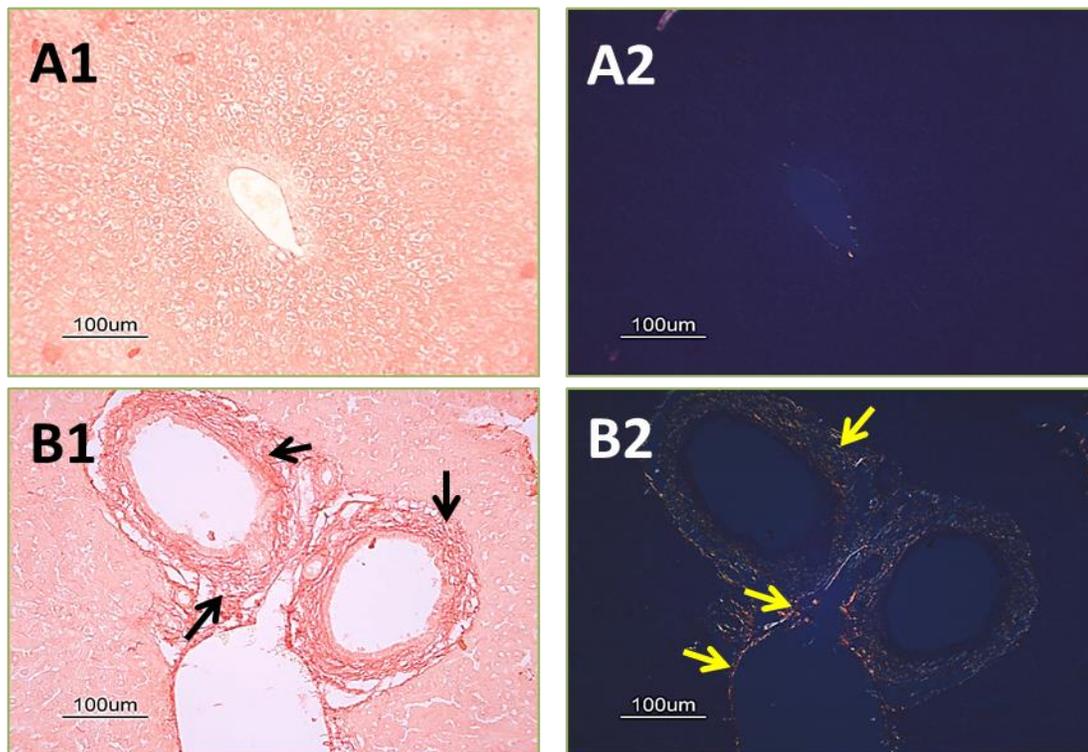


Figura 12. Imágenes de histologías con tinción rojo de sirio (RS). Imágenes a la izquierda con técnica de campo claro, imágenes a la derecha con técnica de iluminación con luz polarizada. A1, A2. SHAM (Ishak 0). B1, B2. BDL7 (Ishak 2). Imágenes en aumento 12.5X. Flechas señalan la presencia de colágena.

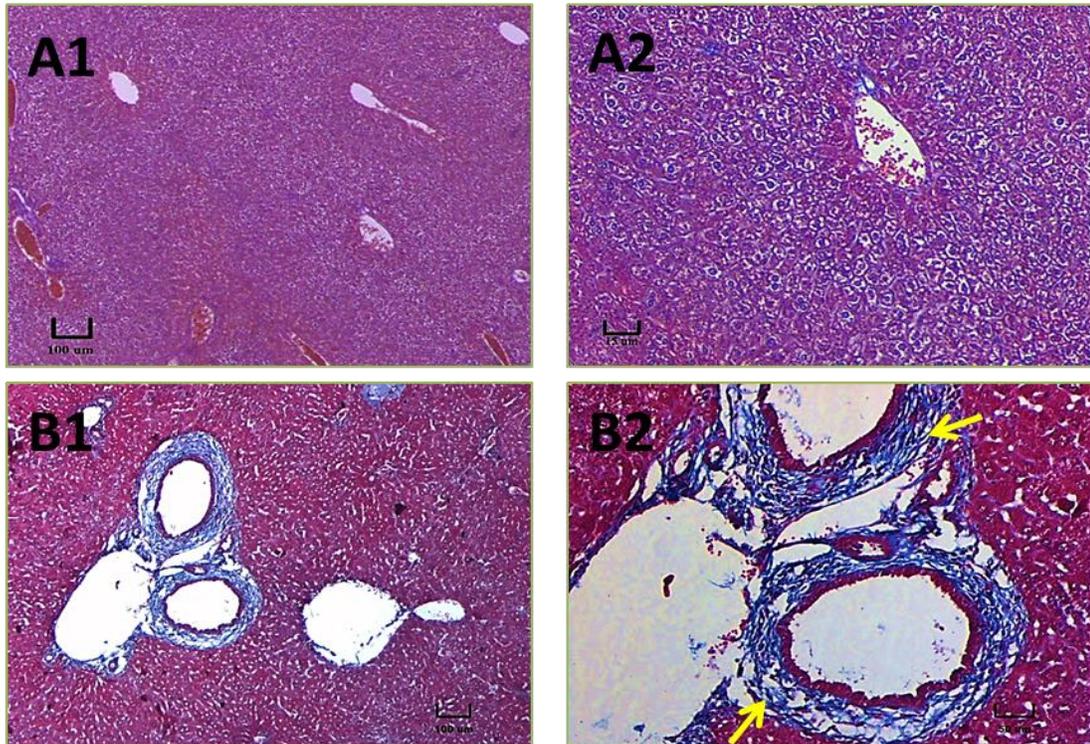


Figura 13. Imágenes de histologías con tinción tricrómica de Masson (TM). A1 y A2. Hígado SHAM (Ishak 0). B1 y B2. Hígado con BDL post-cirugía 7 días (Ishak 2).El daño provocado por la BDL es evidente a los 7 días con la presencia de fibras señaladas con las flechas, comparado al SHAM.Imágenes A1 y B1 en aumento 4X e imágenes A2 y B2 en aumento 10X.

La Tabla 2 muestra la clasificación de los 2 grupos de tratamiento con BDL de acuerdo a la escala Ishak y describiendo las características observadas en las histologías, donde el grupo con la ligadura por 7 días sí presentó fibrosis.

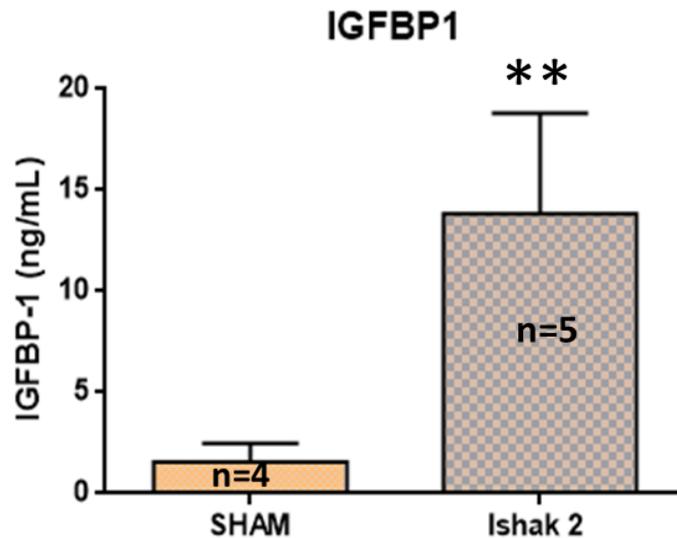
Grupo	Descripción	Escala Ishak
SHAM	No hay fibrosis	0
BDL7	Expansión fibrótica de la mayoría de las áreas portales con o sin septos cortos fibrosos	2

Tabla 2. Clasificación del grupo de BDL de acuerdo a la escala Ishak



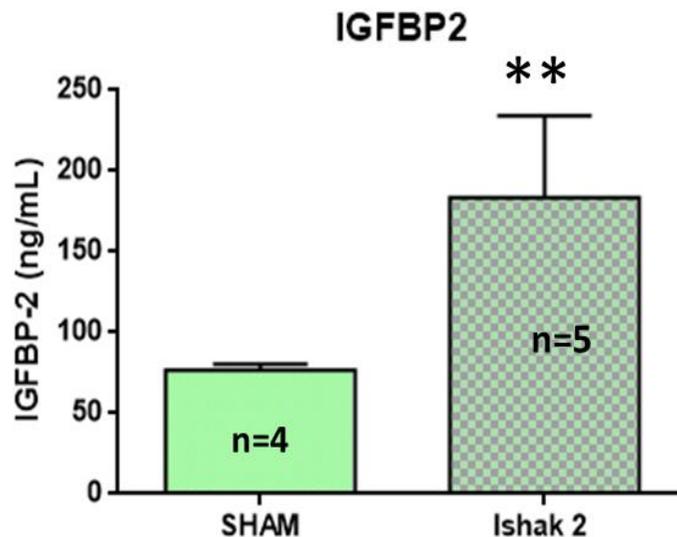
### 8.2.3. Cuantificación de IGFBPs en el suero (BDL)

La concentración sérica de IGFBP-1 a los 7 días post-cirugía con respecto al SHAMsi aumentó significativamente (SHAM= 1.56±0.53, BDL7= 13.83±2.49)(Gráfica 6).



Gráfica 6. Concentración de IGFBP-1 en suero en el modelo con Ligadura de Conducto Biliar post-cirugía 7 días. Los resultados muestran la media ±DE. Los datos fueron analizados por prueba *t* de student. Se observó diferencia significativa entre SHAM vs. BDL7. \*\**p*<0.01.

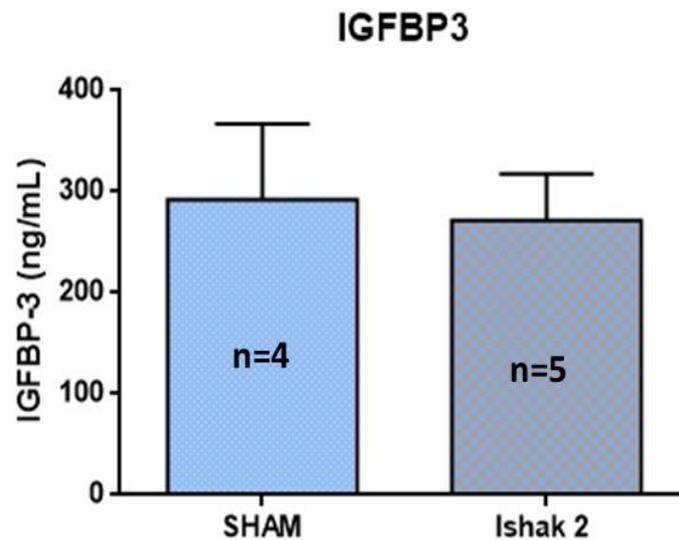
También la concentración de IGFBP-2 aumentó significativamente en el grupo con la ligadura (SHAM= 76.83±1.77, BDL7=183.40±22.66)(Gráfica 7).



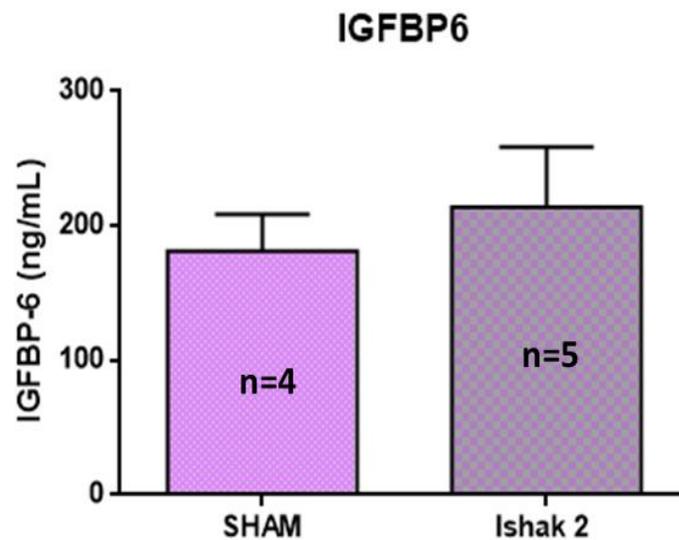
Gráfica 7. Concentración de IGFBP-2 en suero en el modelo con Ligadura de Conducto Biliar post-cirugía 7 días. Los resultados muestran la media ±DE. Los datos fueron analizados por la prueba *t* de student. Se observó diferencia significativa entre SHAM vs. BDL7. \*\**p*<0.01.



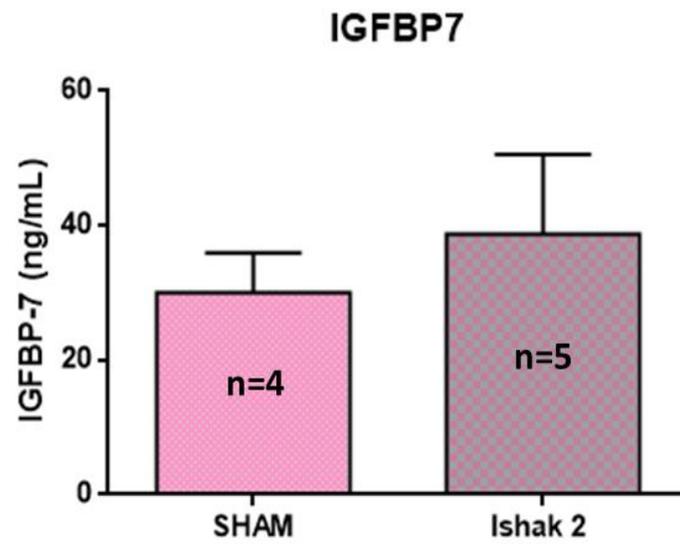
Tanto la concentración sérica de IGFBP-3 (SHAM=  $292.10 \pm 37.50$ , BDL7=  $272.0 \pm 20.38$ ) (Gráfica 8), IGFBP-6 (SHAM=  $181.40 \pm 13.54$ , BDL7=  $213.90 \pm 19.85$ ) (Gráfica9) e IGFBP-7 (SHAM=  $30.04 \pm 2.97$ , BDL7=  $38.72 \pm 5.31$ )(Gráfica 10) no mostraron diferencia significativa a los 7 días posteriores a la ligadura.



Gráfica 8. Concentración de IGFBP-3 en suero en el modelo con Ligadura de Conducto Biliar post-cirugía 7 días. Los resultados muestran la media  $\pm$ DE. Los datos fueron analizados por la prueba *t* de student. No se observó diferencia significativa entre SHAM vs. BDL7.



Gráfica 9. Concentración de IGFBP-6 en suero en el modelo con Ligadura de Conducto Biliar post-cirugía 7 días. Los resultados muestran la media  $\pm$ DE. Los datos fueron analizados por la prueba *t* de student. No se observó diferencia significativa entre SHAM vs. BDL7.



Gráfica 10. Concentración de IGFBP-7 en suero en el modelo con Ligadura de Conducto Biliar post-cirugía 7 días. Los resultados muestran la media  $\pm$ DE. Los datos fueron analizados por la prueba *t* de student. No se observó diferencia significativa entre grupos.



## 9. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran la inducción de diferentes grados de fibrosis en los dos modelos experimentales con la administración de distintas dosis de TAA y con la ligadura del conducto biliar, los cuales se demostraron con la histología del tejido hepático. El estudio de la concentración sérica de las IGFBPs mostró la disminución significativa de IGFBP-2 en los 3 estadios de la fibrosis hepática clasificada por escala Ishak en el modelo de hepatotoxicidad por TAA, mientras que la IGFBP-7 sérica aumentó significativamente en los estadios Ishak 3 e Ishak 4 de la fibrosis. Por su parte, en el modelo de colestasis por BDL se mostró que la concentración sérica de IGFBP-1 e IGFBP-2 aumentaron significativamente a los 7 días post-cirugía (Ishak 2).

Las IGFBPs, son péptidos que se han reportado que participan en diferentes procesos celulares como proliferación, apoptosis y senescencia[23]. Además, se han encontrado implicadas en procesos de cicatrización lo que sugiere que son potenciales reguladoras de la síntesis de EMC, como parte de sus acciones independientes a IGFs.

Estudios recientes han mostrado su participación en el proceso fibrogénico. Como ejemplo es la IGFBP-5, que en fibrosis pulmonar, fibrosis intestinal y fibrosis en piel se ha evidenciado su sobreexpresión asociada al incremento en la deposición de colágena y fibronectina por fibroblastos en estudios *in vitro*[26, 27, 38, 39]. Sugiriendo que esta IGFBP pueden estar involucradas en la iniciación y/o perpetuación de la fibrosis por su habilidad de inducir la producción de componentes de la matriz extracelular.

La similitud estructural que existe entre estas proteínas nos permite sugerir la hipótesis de que otras IGFBPs además de la IGFBP-5 pueden participar en el proceso fibrogénico de otros órganos, como el hígado; además de que se considera a este último el principal productor de estos péptidos.

Con respecto a IGFBP-1, hay evidencia de que en pacientes con fibrosis hepática debida a la infección crónica por el virus de hepatitis C, sus niveles séricos son 25 veces más elevados contra sujetos sanos [29]. También se han reportaron cambios en



su expresión después de una hepatectomía parcial [40] o de un daño agudo producido por  $\text{CCl}_4$ [41]. Nuestros resultados con respecto a esta proteína muestran que en el modelo de TAA, IGFBP-1 no resultó significativa estadísticamente, sin embargo se observó un incremento de casi 3 veces en todos los tiempos de tratamiento, con lo cual, no es posible descartar que pudiera estar implicado en algún efecto biológico a pesar de no mostrar diferencia significativa estadísticamente. Para el caso del daño por BDL, la concentración si estaba incrementada significativamente en ratones que tuvieron la ligadura 7 días.

Con la evidencia que se tiene en la literatura, podemos sugerir que esta proteína está participando en algún mecanismo de reparación, regeneración o proliferación celular dentro de la fibrosis hepática que se generó con los dos diferentes insultos.

Como se mencionó, la expresión de IGFBP-1, se ha asociado a la regeneración hepática por inducción de células ovas [42]. En presencia de un daño en el tejido hepático, la proliferación de hepatocitos es la primera forma de regeneración en respuesta a la necrosis o apoptosis. Pero también existe la posibilidad de que la proliferación de hepatocitos disminuya, y por ende las células ovas (células madre hepáticas) que residen en el hígado se diferencien en hepatocitos o colangiocitos, a esto se le llama reacciones ductulares[43]. Es importante considerar esto, puesto que BDL se trata de un modelo de proliferación y regeneración hepática. Teniendo en cuenta esto, se puede sugerir que el incremento de la proteína IGFBP-1 en suero en ambos modelos tiene relación con el proceso de regeneración-reparación que realiza el tejido.

Con respecto a IGFBP-2, esta proteína se ha relacionado con la obesidad, con la regulación de la insulina y el estado metabólico[24]. Además se ha encontrado su asociación con integrinas de la membrana celular, por lo cual se le atribuye una posible función en la proliferación y migración celular [25]. IGFBP-2 también se ha encontrado expresada en muchos tejidos con cáncer, lo que sugiere como un modulador en el crecimiento de los tumores; las altas concentraciones séricas encontradas en pacientes con HCC pueden ser indicadoras de actividad tumoral [44]. Hasta el momento, no hay



evidencia que la relación en procesos previos al HCC, como son la fibrosis y la cirrosis hepática.

Los resultados aquí obtenidos muestran que IGFBP-2 disminuyó su concentración sérica en el modelo de TAA a todos los tiempos de tratamiento, en contraste, en el modelo BDL aumentó significativamente su secreción en los ratones que tuvieron la ligadura por 7 días. Ambos modelos muestran resultados opuestos para este péptido dentro de la fibrosis, una de las posibles explicaciones que se propone es que estas diferencias son causadas por etiologías completamente distintas. Con lo que podríamos sugerir que IGFBP-2 sí tiene implicación en la síntesis de ECM durante la progresión del daño hepático, pero los mecanismos por los cuales actúa aún son desconocidos. Otra explicación para esta diferencia podría estar en la cepa utilizada en cada caso o bien en la presencia de dimorfismo sexual en la secreción de este péptido en particular, de lo cual no ha sido reportado previamente.

Se debe considerar que para estas proteínas en general, no se ha reportado la influencia de manera directa por el sexo en su síntesis o secreción, tanto en humanos como en roedores, y que están más involucradas en el crecimiento y el desarrollo. Las IGFBPs están reguladas de forma directa por la concentración presente de IGFs y a su vez este factor de crecimiento está regulado por la hormona de crecimiento.

En el caso de IGFBP-3 no se observaron cambios significativos en sus concentraciones séricas de ambos modelos; se sabe que de todas las proteínas de unión al factor de crecimiento, IGFBP-3 es la que se encuentra en mayor cantidad en la circulación [32]. Se ha encontrado que la concentración de IGFBP-3 disminuye en el suero de pacientes con cirrosis hepática, observándose mayor disminución con un mayor avance en la clasificación de Child-Pugh de la cirrosis y asociándose a descompensación y falla hepática [31]. Si el daño hepático continuará en ambos modelos, se esperaría que esta proteína disminuya en el estadio de cirrosis.

Las concentraciones de IGFBP-5 si estaban consideradas en el desarrollo experimental de este trabajo, y en el arreglo en suspensión múltiple empleado cuando se realizó el



experimento. Al momento de analizar los datos se observó que la mayoría eran no detectables, lo cual no concuerda con la literatura ni con experimentos previos realizados en el laboratorio, por lo cual estos datos no fueron incluidos en este trabajo. Sin embargo, con base en los antecedentes podemos proponer la hipótesis de que las concentraciones de la proteína IGFBP-5 se encontrarían aumentadas en el suero debido a su implicación en la fibrosis de otros tejidos.

IGFBP-6 tampoco mostró diferencias significativas en sus concentraciones séricas en la fibrosis hepática inducida por los dos diferentes insultos, sin embargo su expresión se ha encontrado decrecida en células cancerosas, asociándola a un papel de supresor tumoral. También se ha visto que participa en la inhibición de la proliferación de fibroblastos, ya sea bajo mecanismos dependientes o independientes de IGFs [34]. Sin embargo, nuestros resultados parecen indicar que no tiene un papel en la fibrosis en los estadios aquí estudiados.

En el caso de IGFBP-7 se observó incrementada en el estadio Ishak 3 y 4 del modelo de TAA, se ha reportado que esta proteína participa como un factor profibrótico, que induce la activación y transdiferenciación de células estelares hepáticas *in vitro* [37], esto es importante considerarlo en la fibrosis hepática debido a que estas células conforman el principal componente celular fibrogénico de esta patología.

Además IGFBP-7 se ha considerado un supresor de tumores, porque se encuentra disminuido en HCC, mientras que esta significativamente elevada en hígado de humano cirrótico y también fibrótico [36]. La sobreexpresión de esta proteína se ha asociado con el incremento significativo de la producción de colágena, fibronectina y TGF- $\beta$  reportado en diferentes estudios, lo cual nos sugiere que contribuye en el desarrollo de fibrosis hepática.

Considerando que en este trabajo, no se observaron cambios significativos de IGFBP-7 en el modelo BDL se puede sugerir que esta proteína tiene su papel en la fibrogénesis dependiendo de la etiología o que su concentración sérica podría mostrar cambios en estadios más avanzados del modelo BDL, tal como se muestran los resultados de



IGFBP-7 en el daño con TAA a partir delshak3. Por lo tanto, si ampliamos el tiempo con la ligadura, la concentración de las proteínas posiblemente aumente y sea significativa por tratarse de un daño de mayor duración.

Es importante considerar que las concentraciones fueron analizadas únicamente en suero y que desconocemos que sucede en el hígado. Sin embargo, con las evidencias aquí expuestas se puede proponer que los cambios de las concentraciones de las proteínas en la circulación es causada por la fibrosis hepática provocada en ambos modelos murinos por TAA y BDL, que fue comprobada con las histologías del tejido.

## 10. CONCLUSIONES

Las proteínas IGFBP-2 e IGFBP-7 mostraron cambios en circulación cuando hay un daño hepatotóxico crónico en el hígado producido por la administración de TAA. IGFBP-2 tuvo una disminución en todos los grupos de tratamiento (Ishak2, Ishak3 e Ishak4) y también mostró diferencia entre el grupo Ishak2 e Ishak3.

En el caso de IGFBP-7 evaluada en el daño por el hepatotóxico, se observaron sus concentraciones aumentadas significativamente en el grupo Ishak3 e Ishak4 con respecto al control, sugiriendo la posibilidad de tener un papel profibrogénico en la patología hepática.

En el modelo BDL, las proteínas IGFBP-1 e IGFBP-2 mostraron un aumento en sus concentraciones séricas a los 7 días de la obstrucción del conducto biliar. Proponiendo a IGFBP-1 una posible participación en un proceso de regeneración hepática. El contraste entre ambos modelos respecto a IGFBP-2, sugiere que esta proteína es dependiente de la etiología y que sí participa en el proceso fibrogénico pero sus mecanismos aún son desconocidos.



## 11. REFERENCIAS

1. Junqueira, L.C., Carneiro, J., *Órganos asociados con el tubo digestivo*, in *Histología Básica Texto y atlas*, M. Panamericana, Editor. 2015: España p. 318.
2. Fortoul, T., *Aparato digestivo*, in *Histología y Biología Celular* M.G. Hill, Editor. 2013: México p. 242.
3. Delgado Coello, B.A., Mas Oliva J., *Avances en el estudio experimental de la Bioquímica Hepática*. 1ra ed, ed. UNAM. 2017, México.
4. Tortora, G., *Principles of Anatomy and Physiology*. 12 ed. 2009
5. Hernandez-Gea, V. and S.L. Friedman, *Pathogenesis of liver fibrosis*. *Annu Rev Pathol*, 2011. **6**: p. 425-56.
6. Kim, Y.O., Y. Popov, and D. Schuppan, *Optimized Mouse Models for Liver Fibrosis*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1559**: p. 279-296.
7. Mokdad, A.A., et al., *Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis*. *BMC Med*, 2014. **12**: p. 145.
8. Cequera, A. and M.C. Garcia de Leon Mendez, *[Biomarkers for liver fibrosis: advances, advantages and disadvantages]*. *Rev Gastroenterol Mex*, 2014. **79**(3): p. 187-99.
9. Rockey, D.C. and D.M. Bissell, *Noninvasive measures of liver fibrosis*. *Hepatology*, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S113-20.
10. Bravo, A.A., S.G. Sheth, and S. Chopra, *Liver biopsy*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(7): p. 495-500.
11. Goodman, Z.D., *Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases*. *Journal of Hepatology*, 2007. **47**: p. 598-607.
12. Baranova, A., et al., *Non-invasive markers for hepatic fibrosis*. *BMC Gastroenterol*, 2011. **11**: p. 91.
13. Patel, K. and D.C. Rockey, *Clinical Utility of Biomarkers of Liver Fibrosis*. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 2006. **2**(1): p. 48-57.
14. Rockey, D.C., et al., *Liver biopsy*. *Hepatology*, 2009. **49**(3): p. 1017-44.
15. Liedtke, C., et al., *Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects*. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2013. **6**(1): p. 19.
16. Stanková, P., et al., *The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 2010: p. 2097-2103.
17. Hajovsky, H., et al., *Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes*. *Chem Res Toxicol*, 2012. **25**(9): p. 1955-63.
18. Amirtharaj, G.J., et al., *Role of Oxygen Free Radicals, Nitric Oxide and Mitochondria in Mediating Cardiac Alterations During Liver Cirrhosis Induced by Thioacetamide*. *Cardiovasc Toxicol*, 2017. **17**(2): p. 175-184.
19. Yanguas, S.C., et al., *Experimental models of liver fibrosis*. *Arch Toxicol*, 2016. **90**(5): p. 1025-1048.
20. Tag, C.G., et al., *Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis*. *J Vis Exp*, 2015(96).
21. Engin, A., et al., *Regulation of fibrogenesis during the early phase of common bile duct obstruction*. *ANZ J Surg*, 2006. **76**(7): p. 645-8.
22. Mohan, S. and D.J. Baylink, *IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms*. *J Endocrinol*, 2002. **175**(1): p. 19-31.
23. Hwa, V., Y. Oh, and R.G. Rosenfeld, *The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily*. *Endocr Rev*, 1999. **20**(6): p. 761-87.
24. Ferry, R.J., Jr., et al., *Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins*. *Horm Metab Res*, 1999. **31**(2-3): p. 192-202.
25. Russo, V.C., et al., *IGFBP-2: The dark horse in metabolism and cancer*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015. **26**(3): p. 329-46.



26. Pilewski, J.M., et al., *Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins 3 and 5 Are Overexpressed in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Contribute to Extracellular Matrix Deposition*. The American Journal of Pathology, 2005. **166**(2): p. 399-407.
27. Yasuoka, H., et al., *Insulin-like growth factor binding protein 5 induces skin fibrosis: A novel murine model for dermal fibrosis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(9): p. 3001-10.
28. Lee, P.D., et al., *Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions*. Proc Soc Exp Biol Med, 1997. **216**(3): p. 319-357.
29. Guzmán, C., Kershenobich, D., Gutierrez-Reyes G. , *Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1 Levels in Chronic Hepatitis C Patients*. Hepatology 2010. **52**(S1): p. 1232A.
30. Cohen, P., et al., *Leukotriene D4 facilitates airway smooth muscle cell proliferation via modulation of the IGF axis*. Am J Physiol, 1995. **269**(2 Pt 1): p. L151-7.
31. Correa, C.G., et al., *Circulating insulin-like growth factor-binding protein 3 as prognostic biomarker in liver cirrhosis*. World J Hepatol, 2016. **8**(17): p. 739-48.
32. Rajaram, S., D.J. Baylink, and S. Mohan, *Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions*. Endocr Rev, 1997. **18**(6): p. 801-31.
33. Romero, I., *Estudio de la expresión de la proteína acarreadora del factor de crecimiento insulinoide 5 (IGFBP5) durante el desarrollo de la fibrosis hepática 2015*, UNAM.
34. Bach, L.A., *Recent insights into the actions of IGFBP-6*. J Cell Commun Signal, 2015. **9**(2): p. 189-200.
35. Sun, H., et al., *Antibody Arrays Identify Potential Diagnostic Markers of Hepatocellular Carcinoma*. Biomark Insights, 2008. **3**: p. 1-18.
36. Guo, X.H., et al., *Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 contributes to hepatic fibrogenesis*. Journal of Digestive Diseases, 2014: p. 202-210.
37. 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: p. 3246-3253.
38. Yasuoka, H., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein-5 induces pulmonary fibrosis and triggers mononuclear cellular infiltration*. Am J Pathol, 2006. **169**(5): p. 1633-42.
39. Pilewski, J.M., et al., *Insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5 are overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis and contribute to extracellular matrix deposition*. Am J Pathol, 2005. **166**(2): p. 399-407.
40. Mohn, K., Melby, A., Tewari, D. & Laz, T. , *The gene encoding rat Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 1 is rapidly and highly induced in regenerating liver*. Molecular and Cellular, 1991. **11**(3): p. 1393-1401
41. Scharf, J.G., et al., *Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-1 is highly induced during acute carbon tetrachloride liver injury and potentiates the IGF-I-stimulated activation of rat hepatic stellate cells*. Endocrinology, 2004. **145**(7): p. 3463-72.
42. Arai, M., et al., *Gene expression profiles in liver regeneration with oval cell induction*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(2): p. 370-6.
43. Taub, R., *Liver regeneration: from myth to mechanism*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 836-47.
44. Ranke, M.B., et al., *Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma*. Horm Res, 2003. **60**(4): p. 174-80.



## 12. ANEXOS

### 12.1. Anexo 1. Tinciones

#### Tinción hematoxilina-eosina

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

#### Tinción rojo de sirio

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



### Tinción tricrómica de Masson

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