



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN AL
FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINOIDE (IGFBP-1) EN
EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS HEPÁTICA EN UN
MODELO MURINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

OSVALDO SÁNCHEZ JERÓNIMO



MÉXICO, D.F. 2015



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: Dr. Ignacio Camacho Arroyo
SECRETARIO: Dra. Carolina Guzmán Arriaga
1er. SUPLENTE: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
2do. SUPLENTE: Dr. Oscar Armando Pérez Méndez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

DRA. CAROLINA GUZMÁN ARRIAGA

SUSTENTANTE:

OSVALDO SÁNCHEZ JERÓNIMO

*“Del tamaño del esfuerzo
será la recompensa”*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por Beca L'Oreal-UNESCO-AMC Para las Mujeres en la Ciencia, Estímulo "Antonio Ariza Cañadilla para la investigación en Hepatología, Fundación Mexicana para la Salud Hepática y Conacyt CB-2013-01-221137.

A la Dra. Carolina Guzmán por permitirme trabajar en este gran laboratorio, por todo su apoyo y las oportunidades que me brindó durante mi estancia, estoy inmensamente agradecido, es usted una gran persona que estimo mucho.

Al personal del bioterio de la Unidad de Medicina Experimental MVZ Daniel Sánchez Almaráz y Sr. Ricardo Vargas Orozco por su ayuda en el mantenimiento y cuidado de los animales utilizados en nuestro modelo experimental.

Al Técnico en Histopatología Pedro Balderas Flores por su ayuda en la realización de la histología de nuestras muestras.

Al Técnico en Sistemas Digitales Marco Elias Gudiño Zayas del departamento de investigación de la Unidad de Medicina Experimental por su tiempo y gran habilidad en la toma de fotomicrografías digitales.

A los trabajadores del laboratorio HIPAM Leticia Sánchez Gómez, Nicanor Maya Santos y José Ángel García López.

A mis padres y hermana que siempre me han apoyado, me han alentado a seguir adelante y me han brindado un hogar feliz en el que jamás me he sentido solo ni me ha faltado nada, gracias por la paciencia que me han tenido, ustedes son lo más valioso en mi vida. Si hoy termino mi licenciatura y hago las cosas bien es gracias a la educación y ejemplo que me han brindado, los amo inmensamente.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	8
1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	13
3. ANTECEDENTES	
3.1 El hígado.....	14
3.2 Fibrosis hepática.....	16
3.2.1 Patogénesis de la fibrosis hepática.....	16
3.2.2 Composición de la Matriz Extracelular del hígado fibrótico....	18
3.2.3 Degradación de la Matriz Extracelular.....	20
3.3.3. Estadios y Diagnóstico de la fibrosis hepática.....	22
3.4 Proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide 1 IGFBP-1.....	26
3.4.1 Generalidades IGFBPs.....	26
3.4.2 IGFBP-1.....	28
3.4.3 IGFBP-1 y homeostasis de la glucosa.....	29
3.4.4 Acciones de IGFBP-1 independientes de IGF.....	30
3.4.4.1 IGFBP-1 interacciona con proteínas reguladoras.....	30
de la matriz extracelular	
3.4.4.2 IGFBP-1 y hepatocitos.....	30
3.4.4.3 IGFBP-1 como hepatoprotector.....	32
3.4.4.4 IGFBPs y fibrosis.....	34

A mis amigos que me acompañaron durante toda mi estancia en la H. Facultad de Química: Clarisa, Julieta, Hugo, Gerardo, Julián y Daniela, y con quienes compartí innumerables momentos agradables.

A mis nuevos amigos que conocí en el HIPAM: Alfredo, Ivette, Javier y Thalía, gracias por esos momentos llenos de reflexión y risas extremas.

A Sara que me acompañó y apoyó durante toda la carrera, gracias por esos bellos momentos, por siempre estar y alegrarme el día sin importar que haya sucedido, gracias por ponerle chispa a mi vida y permitirme ser parte de la tuya.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
5. HIPÓTESIS.....	35
6. OBJETIVOS.....	36
6.1 Objetivo general.....	36
6.2 Objetivos particulares.....	36
7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	36
7.1 Modelo murino.....	36
7.2 Extracción de RNA total.....	37
7.3 Cuantificación de RNA total.....	37
7.4 Integridad de RNA aislado.....	38
7.5 Rt-PCR.....	38
7.6 Obtención de las secuencias de oligonucleótidos.....	38
de IGBP-1, MMP-9 y TIMP-1	
7.7 Estandarización de PCR.....	39
7.8 Densitometría óptica.....	40
7.9 Histología.....	40
7.10 Extracción de proteína a partir del tejido hepático.....	40
7.11 Cuantificación de IGFBP-1 en tejido hepático por medio.....	40
de MILIPLEX® MAP Kit	
7.12 Análisis estadístico.....	42
8. RESULTADOS.....	42

8.1 Inducción de diferentes grados de fibrosis en el modelo murino.....	42
8.1.1 Tinciones histológicas.....	43
8.2 Expresión y cuantificación de IGFBP-1 en los diferentes grupos.....	47
8.3 Expresión de MMP-9 y su inhibidor TIMP-1 en los diferentes grupos	49
8.4 Reversión de la fibrosis.....	51
9. DISCUSIÓN.....	54
10. CONCLUSIONES.....	58
11. ANEXOS.....	59
12. REFERENCIAS.....	61

ÍNDICE DE ABREVIACIONES

AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
ATF4	Factor activador de transcripción cuatro
BAK	Antagonista asesino de Bcl2
C/EBP β	Proteína de unión al enhancer CCAAT beta
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CK	Células de Kupffer
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HSC	Células estelares hepáticas
IGF	Factor de crecimiento insulinoide
IGFBP-1	Proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide 1
IGFBP-rPs	Proteínas relacionadas a las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide
IL-6	Interleucina 6
IRE	Elemento de respuesta a insulina
MAPK	Protein cinasa activada por mitógenos
MF	Miofibroblasto
MMP	Metaloproteinasas de matriz
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica

PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PPAR γ	Receptor activado por proliferación de peroxisomas gamma
RDG	Secuencia de aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido Aspártico
RE	Retículo endoplásmico
TGF β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TIMP	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
α -2M	alfa-2 Macroglobulina

1. RESUMEN

La fibrosis hepática es la acumulación de matriz extracelular como consecuencia de un daño crónico. Múltiples etiologías de enfermedad hepática, como el alcoholismo y la hepatitis C, provocan fibrosis. La biopsia hepática, la cual es el estándar de oro para el diagnóstico de la fibrosis en este órgano, presenta varios inconvenientes, además, existen pruebas séricas de diagnóstico, pero cuentan con una pobre identificación de etapas intermedias de fibrosis y algunas de éstas no se realizan rutinariamente. Por lo cual, el estudio de moléculas que puedan ayudar al diagnóstico y estadificación de la fibrosis es muy importante. Resultados previos en nuestro laboratorio identificaron a la familia de proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP) como proteínas que pudieran estar implicadas en el progreso de la fibrosis hepática. En el presente trabajo se estudió la expresión y producción de la proteína IGFBP-1 en un modelo murino de daño crónico al hígado, además de la expresión de la metaloproteasa de matriz MMP-9 y TIMP-1, proteínas implicadas con el mantenimiento de la matriz extracelular. Se indujeron diferentes grados de fibrosis en cinco grupos de ratas macho Wistar mediante la administración de CCl₄, y paralelamente se trabajó con un grupo de ratas a las cuales se les indujo fibrosis y posteriormente se les dio un mes de recuperación para poder estudiar las proteínas antes mencionadas durante el proceso de reversión de la fibrosis hepática. La estadificación de la fibrosis se realizó mediante análisis histológico y de acuerdo a la escala de METAVIR. Se contó con un grupo control sin fibrosis (F0), cuatro grupos con diferente grado de fibrosis F1, F2, F3, F4 (cirrosis) y un grupo donde se observó la reversión de la fibrosis de una etapa F3 a una etapa F2-1 (F3-R). La expresión de IGFBP-1 disminuyó en el grupo F2 significativamente comparada con el grupo F1 y su expresión aumentó significativamente en el grupo F4 respecto al grupo F2. En cuanto a la proteína, la cantidad de IGFBP-1 presente en el tejido fue significativamente menor en el grupo F4 respecto a los grupos control y F1. La expresión del gen de MMP-9 no sufrió cambios en ningún grupo y la expresión de TIMP-1 aumentó conforme aumentó el daño en el hígado. En la reversión de la fibrosis la expresión de IGFBP-1 disminuyó drásticamente pero la proteína en el tejido hepático no presentó cambios significativos. La expresión de TIMP-1 disminuyó en la reversión de la fibrosis a niveles semejantes al grupo control. Cambios en la expresión de IGFBP-1 sólo se han reportado como consecuencia de una hepatectomía parcial o un daño agudo provocado por

hepatotoxinas. En el presente trabajo se identificó que la expresión de IGFBP-1 disminuyó en el grupo con un grado de fibrosis intermedio, aumentó en el grupo con cirrosis y la menor expresión se observó durante la reversión de la fibrosis, por otra parte, la cantidad de IGFBP-1 en el hígado disminuyó en el grupo con mayor daño. Estos cambios sugieren que IGFBP-1 pudiera estar implicada en el desarrollo y resolución de la fibrosis hepática.

2. INTRODUCCIÓN

El hígado tiene un papel central en el mantenimiento de la homeostasis ya que es responsable del metabolismo, síntesis, almacenamiento y distribución de nutrientes, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas y xenobióticos. El hígado también produce un gran número de proteínas séricas como; la albúmina, las proteínas de la fase aguda, enzimas y cofactores.

El principal tipo celular del hígado y que lleva acabo la mayoría de sus funciones son las células parenquimatosas o hepatocitos, que comprenden el 80% de las células hepáticas. El otro 20% representa a las células no parenquimatosas que son: células endoteliales, células de Kupffer, linfocitos y las células estelares hepáticas.

Los hepatocitos adultos viven por largo tiempo y normalmente se encuentran en la fase G0 del ciclo celular, pero mantienen la capacidad de proliferar en respuesta a un daño tóxico, infeccioso o una hepatectomía parcial, lo cual no ocurre con muchos de los tejidos en el cuerpo humano y de mamíferos en general. Esta regeneración no requiere del reclutamiento de células madre o células progenitoras, solo involucra la replicación de las células maduras funcionales del hígado. Una vez que la masa original del hígado se ha restablecido, la proliferación se detiene.

Muchos factores de crecimiento y citocinas están implicados en la regulación de la regeneración hepática como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF por su siglas en inglés), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante (TGF), la insulina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleucina 6 (IL-6) y la proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide 1 (IGFBP-1).

La fibrosis hepática es una respuesta cicatrizante (acumulación de matriz extracelular –ECM) después de una lesión hepática. Si la lesión es aguda estos cambios son transitorios y la arquitectura hepática se restaura a su estado normal. Sin embargo, si la lesión es sostenida, la inflamación crónica y la acumulación de ECM llevan a una sustitución progresiva del parénquima hepático por tejido cicatrizado. Este proceso resulta en la cirrosis, la consecuencia final de fibrosis progresiva, la cual tiene un mal pronóstico y una elevada morbi-mortalidad.

Entre las proteínas que pueden tener una participación directa en la progresión de la fibrosis hepática, se encuentra la familia de proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP). Esta familia de proteínas, es sintetizada principalmente en el hígado y su función más documentada está asociada al control de la biodisponibilidad de los factores de crecimiento insulinoideos (IGF) I y II.

El grupo de investigación del laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM) de la Unidad de Medicina Experimental del Hospital General de México, ha identificado la posible participación de IGFBP-1 en el avance de la fibrosis en pacientes con hepatitis C crónica. Resultados preliminares obtenidos en el laboratorio han mostrado un aumento significativo en las concentraciones circulantes de esta proteína entre pacientes con hepatopatía crónica y sujetos control. Con esta evidencia es posible plantear que esta proteína tiene un papel en la progresión del proceso fibrogénico e incluso en el desarrollo de hepatocarcinoma posterior al establecimiento de la cirrosis.

3. ANTECEDENTES

3.1 El hígado.

El hígado es parte del sistema digestivo y está compuesto por lóbulos, cada lóbulo está dividido en segmentos. Los lóbulos están separados por una banda de tejido llamado tejido falciforme, el cual permite al hígado unirse al diafragma; además está cubierto por una capa de tejido conectivo llamada cápsula de Glisson (Abdel, 2010).

El hígado tiene dos fuentes de sangre: La vena porta que acarrea sangre procedente del aparato digestivo, cerca del 75% de su suministro de sangre proviene de la vena porta. La segunda fuente es la arteria hepática, la cual suministra sangre rica en oxígeno proveniente del corazón.

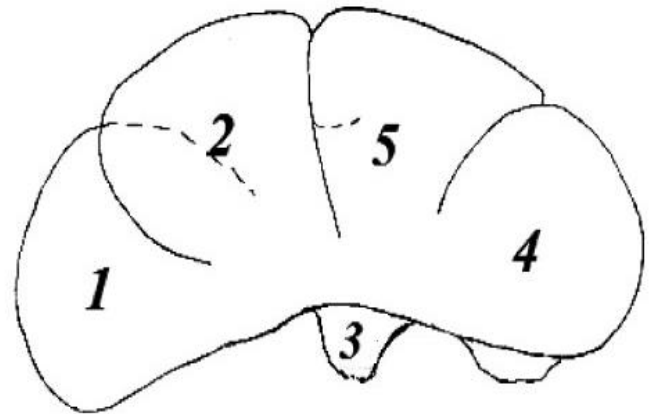
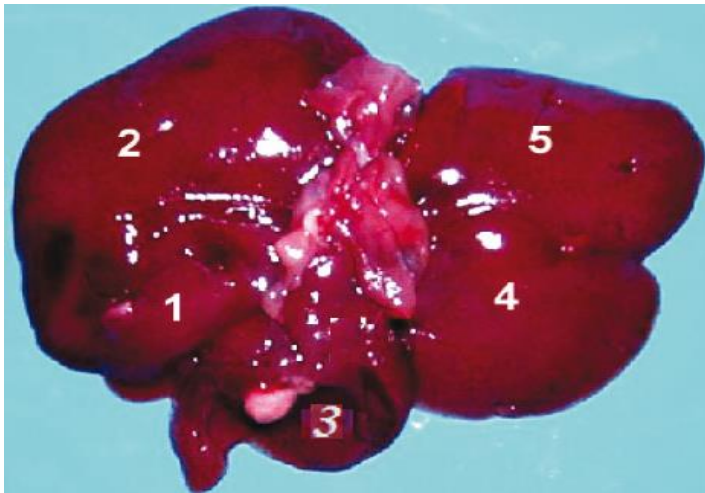


Figura 1. Anatomía general del hígado de rata. Se observan las principales estructuras del hígado (1) lóbulo lateral derecho, (2) lóbulo medio derecho, (3) lóbulo caudado, (4) lóbulo lateral izquierdo, (5) lóbulo medio izquierdo. Tomada y modificada de (Möller, 2011).

El hígado realiza muchas funciones importantes en el cuerpo. Produce bilis, la cual ayuda en el intestino delgado a la digestión y absorción de grasas, colesterol y algunas vitaminas. La bilis ayuda a absorber vitamina K, la cual es utilizada para producir factores de coagulación. Almacena vitaminas A, D, E, K y B12, y minerales como el hierro en forma de ferritina y cobre, el cual libera según las necesidades. Sintetiza y usa la bilirrubina; el hierro de la hemoglobina es almacenado en el hígado o usado por la médula ósea para producir eritrocitos. El hígado también ayuda al metabolismo de proteínas y carbohidratos. En éste órgano se produce, almacena e hidroliza el glucógeno liberando glucosa a la sangre para mantener la glicemia normal. El hígado filtra la sangre eliminando ciertas sustancias de origen endógeno o exógeno, impidiendo que se acumulen en el cuerpo por ejemplo, hormonas (estrógeno, aldosterona y hormona antidiurética), fármacos y alcohol y es el único órgano con la habilidad de regenerarse (Tzanakakis, 2000). El 80% de la función del hígado puede mantenerse después de que una gran parte del órgano se haya removido (Mangnall, 2003).

3.2 Fibrosis Hepática

3.2.1 Patogénesis de la fibrosis hepática

La fibrosis hepática es la acumulación de ECM como consecuencia de un daño. Si el daño es agudo, estos cambios son transitorios y la arquitectura se restaurará a su composición normal. Sin embargo, si el daño es sostenido habrá una inflamación crónica y una acumulación de ECM, lo que llevará a una sustitución progresiva de parénquima hepático por tejido cicatrizal. Éste proceso resulta en la cirrosis, la etapa más avanzada de la fibrosis. La progresión hasta la cirrosis es variable, pero generalmente lenta, siendo de entre 20-40 años en personas con un daño hepático crónico y dependiendo de factores tanto genéticos como ambientales (Hernandez-Gea, 2011).

El parénquima hepático está compuesto por hepatocitos, las células endoteliales y células no parenquimatosas que incluyen a las células estelares hepáticas (HSC) y células de Kupffer (CK) que conforman el resto de la población celular del hígado. El sinusoides es la unidad microvascular hepática, se caracteriza por la fenestración de sus células endoteliales y está separado de los hepatocitos por el espacio de Disse; es el lugar donde residen las HSC. Este espacio contiene una pequeña cantidad de ECM que es esencial para el mantenimiento de las diferentes funciones de las células parenquimatosas.

Con la deposición de ECM en el espacio de Disse la fenestración normal se pierde, lo que provoca una deficiencia en el intercambio metabólico bidireccional normal entre el flujo de la vena porta y los hepatocitos.

Se han descrito diferentes patrones de progresión de la fibrosis con base en la etiología, la región dañada (por ejemplo; portal o central), la fuente de células fibrogénicas involucradas y el mecanismo fibrogénico predominante (Cassiman, 2002). A nivel mundial la hepatitis crónica por virus B y C es la principal causa de fibrosis y se caracteriza por la presencia de hepatitis de interfase y necrosis portal. En problemas relacionados con el alcohol y en la enfermedad de hígado graso no alcohólico es común observar fibrosis perisinusoidal o pericelular. La fibrosis relacionada al alcohol se caracteriza por la deposición de ECM en el espacio de Disse alrededor de los sinusoides y de los cordones de hepatocitos (fibrosis perisinusoidal).

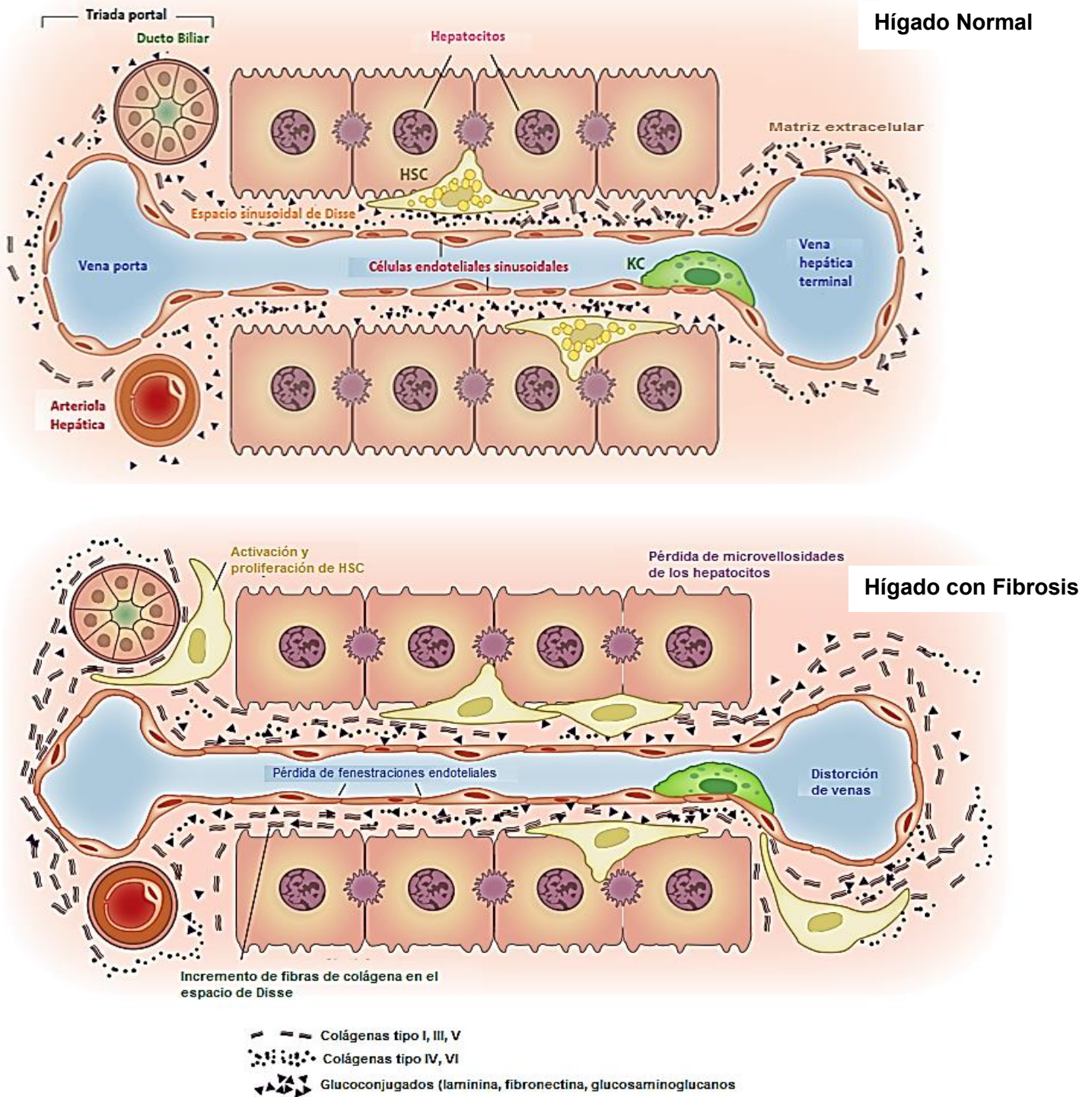


Figura 2. Cambios en la microestructura hepática durante la fibrosis. Se muestran los diferentes tipos celulares presentes en el tejido hepático y los cambios que ocurren durante la fibrosis, siendo el cambio principal la activación de las HSC y el aumento en la producción de ECM. Tomada y modificada de (Hernández-Gea, 2011).

La acumulación de fibrosis lleva a la cirrosis, la cual se caracteriza por una distorsión del parénquima hepático y de la arquitectura vascular. La principal característica patológica de la cirrosis es la formación de nódulos de regeneración hepáticos circundados por septos fibróticos. Pueden ocurrir oclusiones en vénulas, ocasionando un mal funcionamiento del hígado y produciendo hipertensión portal (Hernandez-Gea, 2011).

Mientras la fibrosis es asintomática, la cirrosis presenta una alta morbilidad y mortalidad. Una vez que se ha desarrollado cirrosis su historia natural típica incluye la progresión de una fase compensada a una fase no compensada; ésta última se define por el desarrollo de hipertensión portal y falla hepática. La hipertensión portal es la mayor complicación de la cirrosis que lleva a la muerte o a la necesidad de realizar un trasplante.

3.2.2 Composición de la matriz extracelular (ECM) en el hígado fibrótico

En un hígado normal, existe una regulación precisa del balance entre producción y degradación de la ECM. Sin embargo, durante un daño crónico al hígado su producción excede al proceso de degradación, desarrollándose así fibrosis hepática como resultado de una acumulación de septos fibróticos y fibras entrecruzadas de colágena. Además, estos cambios en la cantidad de ECM directamente estimulan la fibrogénesis (Schuppan, 2001).

Normalmente, la ECM hepática comprende menos del 3% del área relativa de una sección de tejido hepático y aproximadamente el 0.5% del peso húmedo. Los componentes estructurales más importantes de la ECM son colágenas, proteoglicanos, laminina y fibronectina (Geerts, 2001).

En un hígado normal la ECM está compuesta principalmente de colágenas tipo IV y VI. Después de un daño hay una disrupción de la matriz y un reemplazo de las fibras de colágena; ahora la matriz se forma principalmente de fibras de colágena tipo I y III y fibronectina (Olaso, 2001). Estos cambios en la composición de la ECM alteran el microambiente de la matriz y crea un impedimento físico y funcional en el flujo bidireccional del plasma entre el lumen de los sinusoides y los hepatocitos, lo que da como resultado una función hepática alterada.

La ECM aparte de contener moléculas estructurales contiene una gran cantidad de factores de crecimiento y metaloproteasas de matriz (MMPs por sus siglas en inglés) (Schuppan, 2001). La ECM por lo tanto, puede regular la actividad celular y la disponibilidad de factores de crecimiento. Por ejemplo, la decorina y el biglicano, dos componentes de la ECM, se unen al TGF- β , la fibronectina y la laminina se unen a TNF- α , y la colágena se une al Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y la interleucina 2 (IL-2). La unión de factores de supervivencia a la ECM puede prevenir la apoptosis en un daño al hígado y también prevenir la proteólisis de éstos factores de crecimiento (Schuppan, 2001).

La interacción entre la ECM y las células hepáticas es bidireccional. Después de un daño, la ECM puede modular la activación y proliferación de HSC, la angiogénesis y la disponibilidad y actividad de factores de crecimiento y MMPs. La ECM también provee a las células con señales para adhesión, migración, proliferación, supervivencia y diferenciación. La interacción ECM-célula está principalmente determinada por receptores de adhesión de membrana específicos particularmente por integrinas (Hernandez-Gea, 2011).

Las integrinas son receptores heterodiméricos transmembranales compuestos de una subunidad α - y una β -; y tienen un dominio que puede unirse a componentes de la ECM y a moléculas de adhesión (Avraamides, 2008). Los ligandos clásicos de las integrinas contienen una secuencia Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (RGD), que es necesaria pero no suficiente para una transducción de señales. Las integrinas pueden también modular vías de transducción de señales, como la vía Hedgehog y pueden interferir con TGF- β 1 y PDGF y juegan un rol importante en la biología del cáncer, incluyendo hepatocarcinogénesis (Stupack, 2007; Hehlhans, 2007; Omenetti, 2008). Se sabe que en cultivo las HSC expresan las integrinas: α 1 β 1, α 2 β 1, α 5 β 1 y α 6 β 4 (Friedman, 2008).

La respuesta cicatrizante del hígado es el resultado de diversos daños, incluyendo, tóxicos, metabólicos y virales. La causa de esta respuesta es la activación y transdiferenciación de células mesenquimatosas residentes en miofibroblastos (MF) contráctiles, principalmente derivados de HSC, que generan la cicatriz, encapsulando así el daño (Friedman, 2008). Después de un daño hepático, las HSC se activan por acción de TGF- β , lo que lleva a la conversión de una célula rica en vitamina A en reposo (una HSC quiescente) a una célula

que pierde vitamina A y que ahora cuenta con una gran capacidad de proliferación y contracción y que puede liberar citocinas proinflamatorias, profibrogénicas y prometogénicas. Estas células activadas (figura 2) tienen la capacidad de aumentar la migración y deposición de los componentes de la ECM (Reynaert, 2002; Friedman, 2010)

La activación de las HSC puede ser conceptualizada en dos fases: iniciación y perpetuación (Lee, 2011). La iniciación, también conocida como etapa preinflamatoria, se refiere a una etapa temprana en la que hay cambios en el fenotipo y expresión de genes. Esto es resultado primeramente de una estimulación paracrina debido al daño en las células parenquimatosas (hepatocitos). El mantenimiento de estos estímulos provoca una fase perpetuada regulada por estímulos autocrinos y paracrinos. La perpetuación involucra al menos seis distintos cambios en el comportamiento de las HSC: proliferación, quimiotaxis, fibrogénesis, contractilidad, degradación de matriz y pérdida de retinol (Friedman, 2010).

Los MF son definidos principalmente por su capacidad para producir ECM y exhibir contractilidad. Aunque las HSC son la fuente primaria de esta población fibrogénica en el hígado (Friedman, 2010) existe contribución de otros tipos celulares: Fibroblastos portales, su activación a MF es especialmente relevante en problemas asociados a isquemia, colestasis (Novo, 2009) y contribuyen en la fibrosis relacionada con problemas biliares (Parola, 2008); también existen células derivadas de médula ósea y fibrocitos circulantes. Se ha demostrado que después de un daño la médula ósea produce células parecidas a MF (MF-like cells) que pueden participar en la progresión de la fibrosis hepática (Russo, 2006; Baertschiger, 2009).

3.2.3 Degradación de la Matriz Extracelular (ECM)

En modelos de fibrosis en animales, se ha observado que al eliminar el agente causante de daño hepático, la fibrosis se revierte (Henderson, 2007). En humanos el tratamiento exitoso de la enfermedad subyacente puede revertir la fibrosis siempre y cuando el daño no sea tan extenso. Se ha observado reversión de fibrosis en humanos en pacientes con patologías hepáticas como: sobrexposición a hierro y cobre, enfermedad hepática alcohólica, hepatitis B, C y D, hemocromatosis, cirrosis biliar secundaria, esteatohepatitis no alcohólica y hepatitis autoinmune (Friedman, 2006; Mallet, 2008).

La ECM se vuelve progresivamente insoluble y resistente a la digestión por proteasas debido al engrosamiento de los septos fibróticos y al aumento de entrecruzamiento de las fibras de colágena (Henderson, 2007).

Las MMPs, también llamadas matrixinas, son una familia de enzimas dependientes de calcio que degradan substratos derivados de la colágena y no derivados de la colágena de la ECM. Se clasifican en cinco categorías con base en su sustrato específico: colagenasas intersticiales, gelatinasas, estromelisin, membranales y metaloelastasas. Las MMPs son secretadas como proenzimas inactivas, tienen un dominio control transcripcional y son moduladas por una familia de proteínas inhibitorias conocida como TIMPs (Inhibidores tisulares de metaloproteinasas) (McCrudden, 2000). Cuatro miembros de la familia de TIMP se unen de forma reversible al sitio activo de las MMPs teniendo diferentes afinidades por estas proteínas. Por ende, los TIMPs juegan un papel importante en la degradación de la ECM acumulada durante un daño al hígado antagonizando la actividad de las MMPs. Las HSC son la principal fuente hepática de MMPs y TIMPs, especialmente MMP-2, MMP-3, MMP-9 y MMP-13. Y se sabe que TIMP-1 tiene un efecto antiapoptótico en las HSC (Murphy, 2002).

En ratas, un daño agudo al hígado aumenta la expresión de MMPs y TIMPs en pocas horas. Después de una dosis de tetracloruro de carbono (CCl_4) se puede detectar un aumento en la presencia de MMP-13, MMP-2, MMP-9, MMP-3, MMP-10, TIMP-1 y TIMP-2. Durante la fase de recuperación los niveles de estas proteínas, excepto MMP-2 y TIMPs, disminuyen rápidamente (Knittel, 2000). En un proceso crónico en humano y en modelos animales de fibrosis, los niveles de MMP-1 a MMP-13 no cambian, pero hay un aumento progresivo de TIMP-1 y TIMP-2 al igual que el aumento de la fibrosis (Hernandez-Gea, 2011). Los modelos animales son esenciales para el estudio de la progresión y resolución de la fibrosis. Los modelos estandarizados y validados para estos experimentos son la ligación de los conductos biliares y la administración de CCl_4 (Montfort, 1978).

La explicación de la resolución espontánea de la fibrosis hasta ahora aceptada, es que la reversión se da por la desactivación y apoptosis de las HSC (Iredale, 1998; Hernandez-Gea, 2011; Troeger, 2012). Aunque esta respuesta ha sido bien caracterizada en modelos animales, la evidencia en humanos es muy limitada. Además, las HSC de los humanos

tienen una expresión relativa mayor del gen anti-apoptótico Bcl-2, que los ratones, por lo cual son menos susceptibles a la apoptosis (Novo, 2006).

3.3 Estadios y diagnóstico de la fibrosis hepática

La valoración de la fibrosis hepática es relevante para la atención del paciente y clave para la toma de decisiones respecto al manejo y tratamiento de la enfermedad. El grado de fibrosis es probablemente el factor de pronóstico más robusto en varias patologías hepáticas, por ejemplo la hepatitis C, donde la severidad de la fibrosis puede ser usada como criterio para seleccionar una terapia antiviral en los esquemas tradicionales (Schiavon, 2014).

Por muchos años, la evaluación histológica de la biopsia hepática se ha considerado el estándar de oro para diagnosticar el grado de fibrosis. Diversas escalas se han desarrollado para este fin (Tabla 1), tales como: METAVIR (Figura 3), Knodell, Scheuer, Batts-Ludwig, de la Asociación Internacional para el estudio del Hígado y la de Ishak (Scheuer, 1991; Batts, 1995; Ishak, 1995; Bedossa, 1996), las cuales analizan diferentes factores, generan un puntaje y estadifican la fibrosis.

Tabla 1. Escalas más comúnmente utilizadas para la estadificación de la fibrosis hepática.

Escala	Observación microscópica.	Estadio de la fibrosis.	Referencia.
Metavir	Sin fibrosis	F0	(Bedossa & Poynard, 1996)
	Fibrosis portal sin septos	F1	
	Fibrosis con escasos septos	F2	
	Fibrosis con numerosos septos	F3	
	Cirrosis	F4	
Ishak	Sin fibrosis	F0	(Ishak et al., 1995)
	Fibrosis portal	F1-2	
	Presencia de septos	F3-4	
	Formación incompleta de nódulos	F5	
	Cirrosis	F6	

Se indican los valores asignados a cada grado de fibrosis. (Schiavon, 2014).

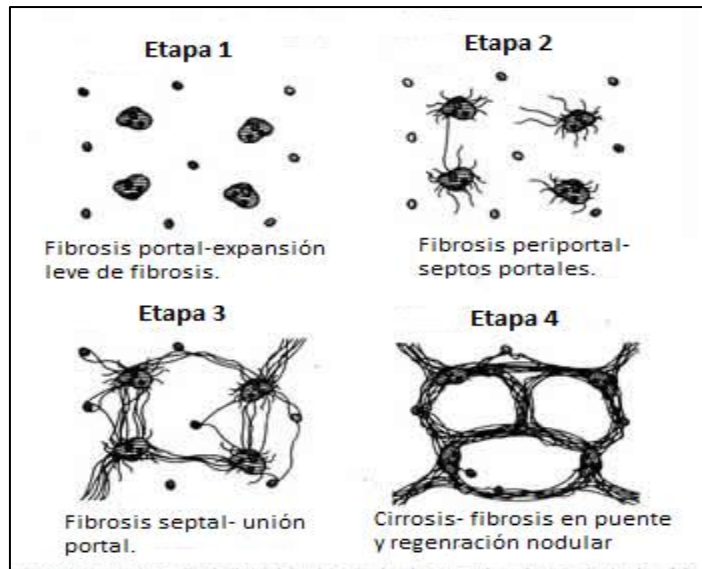


Figura 3. Representación de los estadios de fibrosis según la escala de METAVIR. Se observa un aumento en la cantidad de fibras de matriz extracelular en el tejido hepático.

Ya que existe una heterogeneidad de la fibrosis en el hígado y que la biopsia representa 1/50000 del total de la masa del órgano puede haber un considerable sesgo en su evaluación histológica, existiendo gran variación tanto inter como intra observador (Regev, 2002).

En los últimos años se han propuesto varios biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de la fibrosis. A continuación se muestra una tabla resumiendo las ventajas y desventajas tanto de la biopsia hepática como de los biomarcadores no invasivos (Tabla 2):

Tabla 2. Ventajas y limitaciones de la biopsia hepática comparada con los biomarcadores no invasivos.

	Biopsia hepática	Biomarcadores no invasivos
Ventajas	<p>Sistemas de puntaje validados.</p> <p>Diagnóstico diferencial y condiciones asociadas.</p> <p>Evaluación simultánea de inflamación y necrosis.</p>	<p>Ausencia significativa de molestias y riesgos.</p> <p>Permiten una evaluación frecuente.</p> <p>Interpretación objetiva.</p> <p>Aceptación por los pacientes.</p>

Limitaciones	Método invasivo con una morbilidad asociada. Alto costo. Errores en muestreo. Variación inter e intra observador.	Poca precisión para discriminar entre etapas intermedias de la fibrosis. Biomarcadores no específicos del hígado o de la patología. Influencia de varios factores extra hepáticos.
---------------------	--	--

(Schiavon, 2014).

Los biomarcadores no invasivos de fibrosis hepática pueden dividirse en dos grupos: biomarcadores séricos y técnicas de imagen. Los biomarcadores séricos pueden clasificarse a su vez en: directos o clase I e indirectos o clase II.

Los biomarcadores indirectos (Tabla 3) comprenden en general pruebas de moléculas no relacionadas con la fibrosis, usualmente combinados con otro parámetro clínico o prueba de laboratorio. A continuación se enlistan pruebas disponibles y los factores que toma en cuenta:

Tabla 3. Pruebas de biomarcadores indirectos y factores que toman en cuenta.

TEST	Factores que toma en cuenta.	Referencia
Índice Forns	Edad, cuenta plaquetaria, colesterol y GGT.	(Forns et al., 2002)
APRI	AST y cuenta plaquetaria	(Wai et al., 2003)
FIB-4	Edad, AST, ALT y cuenta plaquetaria.	(Sterling et al., 2006)
Fibro Index	Cuenta plaquetaria, AST y gama globulina.	(Koda et al., 2007)

GGT: gama glutamil-transpeptidasa; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa.

Los marcadores directos o de clase I son usualmente fragmentos de los componentes de matriz extracelular. Los principales marcadores directos estudiados son: ácido hialurónico, laminina, fibronectina, alfa-2-macroglobulina, el péptido carboxi terminal de la procolágena

tipo I, el péptido amino terminal de la procolágena tipo III (PIIINP), las MMPs, los TIMPs y el TGFβ -1.

Como los biomarcadores indirectos, los biomarcadores de clase I (Tabla 4) se combinan generalmente con otras pruebas para mejorar el diagnóstico. A continuación se muestran pruebas disponibles que utilizan biomarcadores directos:

Tabla 4. Pruebas disponibles que incluyen biomarcadores directos.

TEST	Factores que toma en cuenta.	Referencia
Fibro Test	Edad, sexo, haptoglobina sérica, alfa-2 macroglobulina, apolipoproteína A1, gamma glutamil transpeptidasa y bilirrubina total.	(Imbert-Bismut et al., 2001)
ELF	Edad, TIMP-1, PIIINP y ácido hialurónico.	(Rosenberg et al., 2004)
Fibrometer	Cuenta plaquetaria, índice de protrombina, AST, alfa-2-macroglobulina, ácido hialurónico, nitrógeno de urea en sangre y edad.	(Calès et al., 2005)
FIBROspect II	TIMP-1, alfa-2-macroglobulina y ácido hialurónico.	(Patel et al., 2004)
Hepascore	Edad, sexo, alfa-2-macroglobulina, ácido hialurónico, gamma glutamil transpeptidasa y bilirrubina total.	(Adams et al., 2005)

La desventaja general de estos biomarcadores, tanto los directos como los indirectos, es que tienen una estadificación pobre de las etapas intermedias de la fibrosis y disponibilidad limitada (algunos patentados o son pruebas que no se realizan rutinariamente en la clínica). Por lo cual, es necesaria la búsqueda de biomarcadores alternativos que puedan mejorar considerablemente el diagnóstico de la fibrosis hepática.

3.4 IGFBP-1

3.4.1 Generalidades

La insulina y las proteínas de la superfamilia del IGF, las Proteínas de Unión al Factor de Crecimiento Insulinoide (IGFBPs) y las proteínas relacionadas a IGFBPs (IGFBP-rPs), son una superfamilia de péptidos anabólicos presentes en todo el reino animal. Los IGFs presentan una estructura muy similar a la insulina, son expresados por todas las células y son importantes mitógenos que afectan el crecimiento y el metabolismo (Rosenfeld, 1999). En mamíferos, el gen de la insulina se expresa exclusivamente en las células β del páncreas, de donde se libera directamente al hígado, mientras que los IGFs se expresan en el hígado, en respuesta al estímulo de la hormona del crecimiento (GH). Los IGFs se liberan y funcionan en otros diversos tejidos mediante su interacción con los receptores a IGF (IGFRs) promoviendo la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular (Kelley, 1996; Philippou, 2014).

En los fluidos biológicos los IGFs están unidos a las IGFBPs, proteínas con las que forman complejos y cuya principal función es controlar la biodisponibilidad del IGF-I e IGF-II modulando su afinidad con sus receptores específicos (IGFRs) y también prolongando la vida media de estos factores de crecimiento (Rosenfeld, 1999).

Existen seis IGFBPs (1 a 6) las cuales presentan una gran afinidad a los IGFs ($\overline{kd} = 10^{-10}$ M). Además, se han reportado nueve proteínas relacionadas con IGFBP (IGFBPrP 1 a 9) que se unen con poca afinidad a los IGFs (Figura 4). Aunque en la década de 1960 se pensaba que la única función de las IGFBPs era regular la biodisponibilidad de los IGFs, en años recientes se ha observado y comprobado que estas proteínas pueden presentar diversas funciones independientes a IGF. Existen numerosos datos *in vivo* e *in vitro* sobre la importancia de las IGFBPs en el crecimiento celular mediante mecanismos dependientes e independientes de IGF.

El sistema del factor de crecimiento insulinoide (IGF)

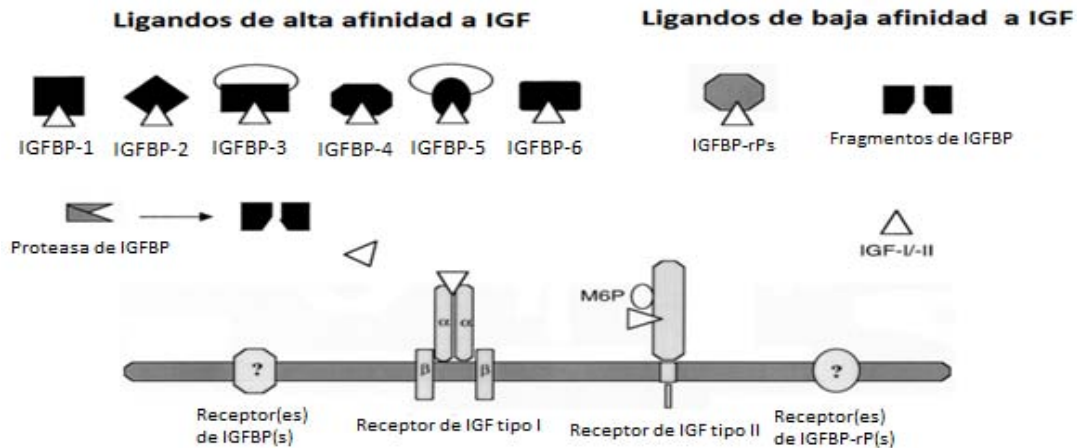


Figura 4. El sistema del factor de crecimiento insulinoide (IGF). Esquema de los componentes del sistema de IGF. IGFBPs (Proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide), IGFBP-rPs (Proteínas relacionadas a las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide), IGF-I/II (Factor de crecimiento insulinoide), Receptor de IGF tipo I, Receptor de IGF tipo II, M6P (Manosa 6-fosfato). Se piensa que IGFBPs e IGFBp-rPs pudieran tener receptores propios. Tomada y modificada de (Rosenfeld, 1999).

Las IGFBPs son proteínas ricas en cisteína y tienen una secuencia primaria de aminoácidos muy similar. La estructura de las IGFBPs contiene tres diferentes dominios: Un dominio N-terminal conservado, una región media de poca similitud entre las IGFBPs y un dominio C-terminal conservado. Esta región media muy variable parece ser única de cada proteína ya que solo se observa una similitud del 15% y es donde se ha observado que se llevan a cabo la mayoría de las modificaciones postraduccionales (N-glicosilación, O-glicosilación o fosforilación). Es a esta región a la que se le atribuyen las funciones independientes de IGF que presentan dichas proteínas. Dentro del dominio N-terminal se encuentra un motivo (GCGCCxxC) altamente conservado tanto en las IGFBPs como en las IGFBP-rPs, a este dominio se le atribuye la afinidad de estas proteínas con los IGFs (Rosenfeld, 1999).

Jones *et al*, mostraron que en el dominio C-terminal de IGFBP-1 se encuentra otro motivo notable; una secuencia RGD (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico) en los aminoácidos 221-223 (Jones, 1993). Este motivo RDG interactúa con integrinas involucradas en la adhesión célula-célula y célula-ECM (Hynes, 1992). Una hipótesis menciona que esta interacción

entre IGFBP-1 y las integrinas podrían servir para crear un reservorio de IGF (Rajaram, 1997).

Se ha visto que las IGFBPs pueden interactuar con otras moléculas aparte del IGF; por ejemplo; insulina, componentes de superficie celular, proteínas de la ECM, y potencialmente con componentes intracelulares (Rosenfeld, 1999).

3.4.2 IGFBP-1

En particular la IGFBP-1 tiene un gen de 5.2 Kb, en la rata se localiza en el cromosoma 14 (Gene ID: 25685). El mRNA resultante del splicing de los 4 exones tiene una longitud de 1.5 Kb, el cual se traduce en una proteína fosforilada, no glicosilada que consta de 234 aminoácidos y cuyo peso molecular es de 25.3 kDa (Julkunen, 1988; Kelley, 1996). Presenta una afinidad similar por IGF-I e IGF-II. La IGFBP-1 es altamente expresada en hígado y riñón, aunque presenta una menor expresión en otros tejidos. Se ha observado la presencia de esta proteína en el líquido amniótico, en suero, en la placenta, en el endometrio, en la leche materna, en la orina, en el líquido sinovial, en el líquido intersticial y en el semen (Rajaram, 1997).

El principal inhibidor de la expresión *in vivo* e *in vitro* de la IGFBP-1 es la insulina, ya que el promotor del gen de la IGFBP-1 presenta dos elementos de respuesta a insulina (IRE). Ésta secuencia en el promotor que reconoce a IRE está altamente conservada en el humano, la rata y el ratón, lo que muestra la importancia de este elemento en la regulación de la expresión de IGFBP-1.

Se sabe que los glucocorticoides aumentan la expresión de IGFBP-1 y que en la región entre 5' 273-249 pb de la secuencia del promotor del gen de IGFBP-1 hay un motivo CGTCA que puede ser reconocido por los elementos de respuesta a AMPc, llamados CREs, lo que implica que los niveles de IGFBP-1 aumenten por agentes que elevan el AMPc intracelular como; glucagón, teofilina, forskolina y análogos de AMPc (Suwanichkul, 1993). La interleucina 6 (IL-6) sobre regula la expresión de varios genes, entre ellos el gen de IGFBP-1, por la vía IL-6-STAT3. *In vitro* se ha visto que la inhibición de la expresión de IGFBP-1 producida por la insulina puede ser revertida si se adiciona IL-6 (Kelley, 1996). El gen de

IGFBP-1 es blanco principal del receptor activado por la proliferación de peroxisomas y (PPAR γ), en ausencia de insulina se ha observado que los niveles de IGFBP-1 se elevan hasta 1.6 veces al aplicar ligandos de PPAR γ (Degenhardt, 2006).

3.4.3 IGFBP-1 y homeostasis de la glucosa.

Los IGFs están estrechamente relacionados estructuralmente con el precursor de la insulina, la proinsulina, y tienen la capacidad de estimular la proliferación y la diferenciación en un gran número de tipos celulares. En circulación los niveles de IGF son de aproximadamente 100 nM, los cuales son tres veces mayores que los niveles de insulina. El potencial hipoglucemiante de los IGFs es cerca de 50 veces mayor que el de la insulina. Ésta actividad insulinoide de los IGFs es bloqueada *in vivo* muy probablemente por las IGFBPs (Lewitt, 1991). En ratones transgénicos que sobreexpresan IGFBP-1 se observa resistencia a la insulina, hiperglicemia e hiperinsulinemia. Esta proteína parece ser el más importante regulador de la actividad insulinoide de los IGFs en respuesta a cambios agudos en el estado nutricional (Dheen, 1997). Después de una administración oral de glucosa la concentración en el suero de IGFBP-1 disminuye rápidamente cerca del 50%, mientras que la administración de otros sustratos energéticos como ácidos grasos no tiene efecto en sus niveles. IGFBP-1 aumenta en respuesta a hipoglucemia, realizar ejercicio por un tiempo prolongado, ayuno, malnutrición y diabetes. Al realimentar, los niveles hepáticos del mRNA de IGFBP-1 disminuyen, lo mismo sucede cuando se administra hormona de crecimiento (GH). La respuesta de IGFBP-1 a la glucosa o a la insulina es independiente de la GH o el cortisol. Estos cambios en IGFBP-1 responden a la cantidad de insulina presente ya que como se mencionó anteriormente, el promotor de IGFBP-1 presenta dos copias del IRE T(G/A)TTT(T/G)(G/T), mediante el cual se modula su expresión. (Guan, 2014). La información documentada indica que la IGFBP-1 está relacionada con la regulación de la glucosa, siendo un enlace entre el sistema IGF-Insulina-Glucosa.

3.4.4 Acciones de IGFBP-1 independientes de IGF

3.4.4.1 Interacción con proteínas reguladoras de la ECM

La invasión tumoral y la invasión de los trofoblastos al útero comparten a las metaloproteinasas de matriz y sus inhibidores como mediadores bioquímicos. IGFBP-1, IL-1 y 6, leptina y TNF α , todos de origen endometrial, son estimuladores de MMPs (Bischof, 2000). Las formas fosforiladas y no fosforiladas de IGFBP-1 por si solas, pueden incrementar el número de citotrofoblastos y los niveles de MMPs en cultivo (Hills, 2004). También se sabe que IGFBP-1 es sustrato de las MMP-3 y -9. Al incubarse IGFBP-1 con cualquiera de éstas dos proteínas, se producen una serie de fragmentos incapaces de unirse al IGF-I. Las células deciduales también producen inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP-1 y -2) y α 2 macroglobulina. Estas tres moléculas atenúan la proteólisis de IGFBP-1 por las MMPs. Por otro lado, se ha observado que IGFBP-1 puede incrementar la secreción de TIMP-1 por los trofoblastos. La proteólisis de IGFBP-1 puede representar un mecanismo para incrementar la biodisponibilidad y acción de IGF durante el desarrollo embrionario (Coppock, 2004).

3.4.4.2 IGFBP-1 y hepatocitos

La principal fuente de producción de IGFBP-1 e IGFs es el hígado, donde es producida por los hepatocitos, tanto en adultos como en los últimos meses de desarrollo embrionario. Se sabe que los hepatocitos no cuentan con un gran número de receptores para IGF. Por lo tanto, algunas de las acciones que realiza IGFBP-1 en este órgano, de forma autócrina o parácrina, son acciones independientes de IGF.

Las células de un hígado adulto permanecen normalmente quiescentes pero mantienen la capacidad de proliferar y regenerarse después de una hepatectomía parcial, un trasplante o un daño tóxico (Michalopoulos, 1990). En cualquiera de estas condiciones existen genes de respuesta inmediata, cuya expresión aumenta poco tiempo después de la remoción de una parte del hígado o de un daño tóxico. Estos genes se pueden clasificar en tres categorías: genes que codifican factores de transcripción, genes que codifican proteínas que se secretan y genes que codifican proteínas estructurales, cuya expresión se requiere para

regenerar al hígado y mantener la homeostasis. En este contexto, Mohn *et al*, muestran en un modelo murino que IGFBP-1 es uno de los genes tempranos específicos de hígado que más se sobreexpresa después de una hepatectomía parcial, lo cual no se observaba en los animales a los que se les realizó una maniobra simulada, lo que sugiere que su expresión es necesaria para la regeneración hepática (Mohn, 1991). Después de la hepatectomía parcial a nivel transcripcional se observa gran inducción del gen de IGFBP-1, con un primer pico de expresión 1 hora después de la remoción del tejido hepático (Mohn, 1991; Myronovych, 2008) y un segundo pico en la expresión 36-60 horas después de la hepatectomía. El patrón de genes que se expresan en el pico máximo de regeneración después de una hepatectomía parcial, incluido el gen de IGFBP-1, corresponde al mismo patrón de expresión que se observa en el hígado fetal, donde IGFBP-1 es una de las proteínas que más se expresan, lo que sugiere que vías de señalización comunes se activan en estos dos diferentes tipos de proliferación y que en ambas IGFBP-1 puede estar participando (Haber, 1995).

El aumento en la expresión del gen de IGFBP-1 es mediado en parte por la IL-6, una citocina necesaria para la regeneración y reparación normal del hígado. En ratones knockout IL-6^{-/-} el patrón de genes expresados rápidamente se altera después de una hepatectomía parcial, entre esos genes se encuentra el de IGFBP-1 (Leu, 2001).

Los ratones transgénicos que sobre expresan IGFBP-1 presentan bajo peso, menor tamaño de cerebro e hiperglicemia, las hembras muestran una respuesta anormal del útero a estrógenos y alteración en la ovulación. Si a estos ratones se les realiza una hepatectomía parcial no se observan cambios significativos en la regeneración hepática en lo que concierne al tiempo del restablecimiento de la masa de hígado perdida (Liu, 1999).

Por otro lado, ratones IGFBP-1^{-/-} muestran un desarrollo adecuado pero tienen una regeneración hepática anormal después de una hepatectomía, caracterizada por necrosis del tejido hepático y por un retraso y disminución en la síntesis de DNA en los hepatocitos, debida a una pobre activación de las vías MAPK/ERK y una reducida inducción de la expresión del factor de transcripción C/EBP β , de la ciclina A y ciclina B1, lo cual sugiere que IGFBP-1 participa en la regeneración hepática al menos por su efecto sobre MAP/ERK y C/EBP β . En estos experimentos muestran una disminución en la presencia de pERK y

C/EBP β en el hígado de los ratones IGFBP-1^{-/-} sometidos a hepatectomía parcial. Cuando a estos ratones knockout se les administra IGFBP-1 recombinante un par de horas antes de realizar la hepatectomía parcial, tanto los niveles en la expresión de C/EBP β y ERK1/2 como la presencia de las proteínas pERK1 y C/EBP β no disminuyen respecto a los ratones IGFBP-1^{+/+} sometidos a hepatectomía (Leu, 2003).

Las células ovals se consideran como la progenie de las células madre hepáticas. En dos modelos murinos de inducción de células ovals, uno consistía en una dieta deficiente en colina y otro en un tratamiento con *N*-2-acetilaminofluoreno seguido de una hepatectomía parcial, se observa que dentro de los genes que se sobreexpresan el que más lo hace es el gen de IGFBP-1, por lo que se podría especular que IGFBP-1 participa en la inducción de células ovals. Además, en este modelo de hepatectomía parcial se muestra que la expresión de IGFBP-1 se mantiene elevada después de 48 horas lo que sugiere que IGFBP-1 puede tener un efecto prolongado en estos modelos de regeneración (Arai, 2004), en contraste con otros modelos donde se realiza una hepatectomía parcial y la expresión de IGFBP-1 se ve aumentada sólo en las primeras horas.

3.4.4.3 IGFBP-1 como hepatoprotector

Después de un daño mediado por virus de hepatitis o hepatotoxinas se observa una gran apoptosis en los hepatocitos. Leu *et al*, mostraron en un modelo murino que después de una estimulación con Fas en ratones que no producían IGFBP-1 se observaba una apoptosis masiva de hepatocitos. En los ratones deficientes a IGFBP-1 se observó una activación de la MMP-9, una actividad aumentada de TGF β -1, caspasa-3 y caspasa-8. Lo mismo observaron en un modelo de daño agudo producido por CCl₄. Estas anomalías se prevenían con un pre tratamiento con IGFBP-1. Mostrando así que, IGFBP-1 puede funcionar como un factor de supervivencia crítico en el hígado (Leu, 2003).

En el humano, algunas enfermedades hepáticas se cree que provocan estrés en el retículo endoplasmático (RE) (Carlson, 1989). Perturbaciones que alteran la homeostasis del RE promueven la acumulación de proteínas mal plegadas que perjudican la supervivencia celular. Se ha mostrado que IGFBP-1 es inducida potentemente durante el estrés reticular en hepatocitos humanos. Varios agentes estresantes del RE son capaces de elevar la

expresión del mRNA de IGFBP-1 así como, la concentración intracelular de IGFBP-1 y la proteína secretada hasta 20 veces. Esto ocurre mediante el factor activador de transcripción 4 (ATF4 por sus siglas en inglés) el cual reconoce una secuencia en la región reguladora (-6682/-6384) del gen de IGFBP-1. ATF4 tiene como objetivos principales genes de supervivencia, lo que sugiere que IGFBP-1 tenga una función de éste tipo bajo condiciones de estrés. El aumento en la producción de IGFBP-1 durante el estrés en el RE en el hígado puede constituir una señal para modular el crecimiento celular y el metabolismo e inducir una respuesta adaptativa sistémica (Marchand, 2006).

Aunque algunas células y tejidos, como el timo y el vaso, son muy sensibles a la apoptosis mediada por p53 como respuesta al estrés tóxico, otros tejidos como el hígado son más resistentes (Rubin, 1968). p53 es un factor de transcripción con la habilidad de modular positiva o negativamente la expresión de una gran cantidad de genes, entre ellos algunos genes pro apoptóticos y otros que promueven la supervivencia (Laptenko, 2006). En el hígado se ha observado que la activación transcripcional de p53 provoca un aumento en la expresión de IGFBP-1. Parte de la IGFBP-1 intracelular se localiza en la mitocondria, donde se une a la proteína BAK (Bcl2-antagonist/Killer) (Leu, 2007). BAK es una proteína de la membrana mitocondrial y un iniciador de la muerte celular (Griffiths, 1999). IGFBP-1 en la mitocondria obstruye la activación y la posterior inducción de la apoptosis mediada por BAK. Cuando IGFBP-1 forma un complejo con BAK, la formación del complejo pro apoptótico p53/BAK no se lleva a cabo adecuadamente (Leu, 2007). Esto se observa tanto en cultivo celular como en el hígado. En contraste, los hígados deficientes de IGFBP-1 muestran apoptosis espontánea que es acompañada por acumulación mitocondrial de p53 y oligomerización de BAK. Sin embargo, si el daño persiste o sobrepasa un umbral crítico y los niveles de IGFBP-1 disminuyen, los hepatocitos serían entonces susceptibles a la inducción de la muerte celular. El aumento en la expresión de IGFBP-1 inducida por estrés puede actuar dentro de una determinada ventana de tiempo como primera línea de defensa al antagonizar la activación de BAK en los hepatocitos (Leu, 2007).

La ocratoxina A es una micotoxina hepatotóxica que frecuentemente contamina la comida y alimentos. Se ha observado que esta toxina puede inhibir a IGFBP-1, tanto a nivel transcripcional como traduccional, por lo cual la hepatotoxicidad de la ocratoxina podría

deberse a la inhibición de IGFBP-1 y a la pérdida de sus efectos antiapoptóticos (Hundhausen, 2008).

Una disminución significativa de IGFBP-1 se ha reportado en pacientes obesos con esteatohepatitis no alcohólica (NASH) (Younossi, 2005), un desorden en el cual se observa un aumento de la apoptosis y disfunción mitocondrial. Por otro lado, niveles elevados de IGFBP-1 se han reportado en pacientes con cirrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular (Hwang, 2003).

3.4.4.4 IGFBPs y fibrosis

El papel de las IGFBPs en el proceso fibrogénico en el hígado no está establecido, sin embargo, se ha demostrado su participación en el proceso fibrogénico en otros tejidos como el pulmón y la piel (Yasuoka, 2009). Más recientemente han surgido evidencias que sustentan la participación de algunas de estas proteínas en la activación de HSC (Sokolović, 2010; Liu, 2013).

Al incubar HSC no activadas en presencia de IGFBP-1 se observa un aumento significativo en la estimulación de los efectos proliferativos de IGF-I sobre las HSC. Lo que indica que la interacción de IGFBP-1 con las HSC puede incrementar su sensibilidad por IGF-I o que IGFBP-1 por si sola puede tener un efecto sobre la proliferación de las HSC activando una vía de transducción de señales como MAPK, o incrementando la expresión del receptor a IGF-I (Scharf, 2004).

La halofuginona es un fármaco que afecta la síntesis de colágena y por lo cual podría ser utilizado como un tratamiento antifibrótico. Esta molécula además de inhibir la síntesis de colágena estimula la síntesis de IGFBP-1 en los hepatocitos y se ha observado que la secreción de IGFBP-1 por los hepatocitos inhibe la motilidad de las HSC. El mecanismo por el cual ocurre lo antes mencionado no ha sido descrito (Gnainsky, 2004). Sin embargo, poco se sabe del papel que juega la IGFBP-1 en un proceso crónico de fibrosis.

Nuestro grupo de investigación en el laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad, de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, identificó en particular que la

IGFBP-1 se encuentra en una concentración hasta 25 veces más alta en el suero de pacientes con fibrosis hepática (Guzmán, 2010). Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio muestran diferencias significativas en las concentraciones de diferentes IGFBPs entre pacientes con hepatopatía crónica y sujetos control. A pesar de ser un grupo pequeño de pacientes el análisis estadístico permite discriminar con un alto nivel de confianza entre enfermos y sujetos sanos.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que las IGFBPs tienen funciones independientes a los IGFs. Parte de las acciones independientes que presenta IGFBP-1 las realiza en el hígado donde tiene un papel como hepatoprotector y promoviendo la proliferación de los hepatocitos. Se ha observado que su expresión cambia en diversas alteraciones hepáticas como en NASH, en la cirrosis, el carcinoma hepatocelular y en el daño agudo por hepatotoxinas. Se ha mostrado la participación de otras IGFBPs, como la IGFBP-5, en procesos fibrogénicos en piel y pulmón y también se ha mostrado que IGFBP-1 puede interactuar con proteínas involucradas en el mantenimiento de la matriz extracelular como son MMP-9 y TIMP-1, y que pudiera promover la proliferación de las HSC en las etapas tempranas de activación. Por lo cual, IGFBP-1 podría ser una molécula cuyo estudio sería de gran importancia ya que podría dar información nueva sobre la fisiopatología de la fibrosis hepática, ser un blanco terapéutico o utilizarse como un biomarcador para el diagnóstico de la fibrosis. Debido a lo anterior, el presente trabajo propone la participación de IGFBP-1 en un proceso fibrogénico crónico en un modelo murino.

5. HIPÓTESIS

La expresión y producción de IGFBP-1 aumentará conforme aumente la presencia de fibrosis en el hígado y disminuirá durante el proceso de reversión de la misma.

6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo General

Estudiar la expresión y síntesis de IGFBP-1 en un modelo murino en el cual se establecieron diferentes grados de fibrosis.

6.2 Objetivos particulares

- Administrar diferente número de dosis de tetracloruro de carbono (CCl₄) en grupos de ratas macho Wistar para inducir diferentes grados de fibrosis.
- Establecer el grado de fibrosis mediante tinciones histológicas al tejido hepático.
- Estudiar la expresión de los genes de IGFBP-1, MMP-9 y TIMP-1 en los diferentes grupos.
- Cuantificar la proteína IGFBP-1 en el tejido de las ratas de los diferentes grupos.

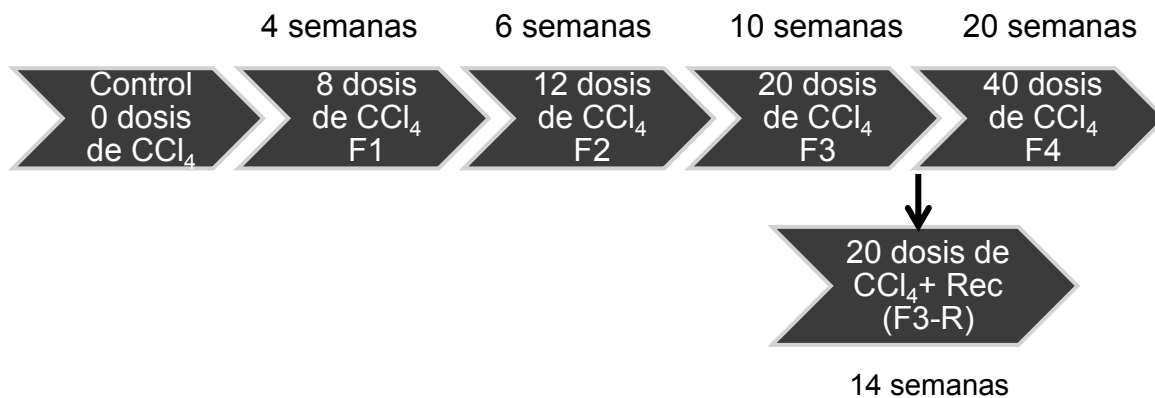
7. METODOLOGÍA

7.1 Modelo murino.

Se formaron 6 grupos de ratas macho de la cepa Wistar con peso de 250 ± 20 g y de 3 meses de edad y fueron mantenidos en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General Eduardo Liceaga, bajo condiciones controladas de humedad relativa y temperatura (75% HR, 23°C) con ciclos de luz-oscuridad de 12hr. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética en investigación del Hospital General de México y estuvieron acordes a la NOM-062-ZOO-1999. Se indujo fibrosis hepática administrando CCl₄ vía intraperitoneal como se indica a continuación: (1) Grupo control F0 (sin daño hepático, no se administró CCl₄), (2) 8 administraciones de CCl₄ que inducen fibrosis hepática en su primera fase F1, (3) 12 administraciones que inducen la fase F2 de fibrosis hepática, (4) 20 administraciones de CCl₄ que corresponden a la fase F3 de fibrosis hepática, (5) 40 dosis F4 (cirrosis) y (6) 20 dosis de CCl₄ más un mes de recuperación (F3-R), para el estudio durante la reversión de la fibrosis (Esquema 1). Las administraciones se realizaron dos veces por semana, y consistieron de 250 µl de una solución de CCl₄ al 33% v/v en aceite de oliva. Después de concluir con las

administraciones correspondientes, los animales se sacrificaron tres días después utilizando una guillotina. Se recolectaron muestras del lóbulo medio izquierdo del hígado (figura 1), de las que una porción se congeló a -70°C hasta su análisis y otra más se almacenó en formaldehído 3.7% v/v en PBS (NaCl 138 mM, KCl 0.3 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, KH_2PO_4 1.5 mM) para su posterior análisis histológico.

Esquema 1. Esquema de administración a los diferentes grupos de ratas:



7.2 Extracción de RNA total.

Parte del tejido hepático obtenido se homogenizó con 1 ml de reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se añadieron 200 μl de cloroformo y se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C . Al sobrenadante se le agregaron 500 μl de alcohol isopropílico para precipitar el RNA total, se almacenó por lo menos una noche a -70°C y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C . Se retiró el sobrenadante y el botón obtenido se lavó con 1ml de EtOH 75% v/v en agua con DEPC (dietilpirocarbonato) centrifugando nuevamente a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C . Finalmente se retiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 100 μl de agua libre de RNasas y se almacenó a -20°C .

7.3 Cuantificación de RNA total.

Se realizaron diluciones 1:100 de RNA total en agua para cada muestra y se leyeron en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm. Si la muestra se encontraba muy concentrada se

realizaba una dilución 1:1000. Con la absorbancia a 260 nm se calculó la concentración de RNA total en µg/ml. A partir de ese resultado se realizaron los cálculos necesarios para obtener alícuotas de cada muestra que tuvieran una concentración de RNA total de 10 µg/µl.

7.4 Integridad de RNA aislado.

Para conocer la integridad del RNA total aislado se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 2% con 5 µl de Bromuro de etidio. Se identificaron las bandas correspondientes a 28S y 18S.

7.5 RT.

Para obtener el cDNA a partir del RNA total aislado se realizó una rt-PCR usando un kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Por muestra se agregaron 5 µl de buffer 5X que contiene 250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15mM de MgCl₂ y 0.1 M de DTT. 10 µg de muestra de RNA. 1 µl de oligo dT (500 µg/ml). 1.25 µl de mix 10 mM de dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP). 1 µl de la enzima M-MLV RT (200 unidades) y se agregó agua hasta obtener 25 µl de volumen de reacción.

7.6 Obtención de las secuencias de oligonucleótidos para amplificar gen de IGFBP-1, MMP-9 y TIMP-1.

Se realizó la búsqueda de la secuencia de cDNA del gen de IGFBP-1 de rata en la base de datos del NCBI (BC078889.1), de MMP-9 (NM_031055.1) y de TIMP-1 (BC099821.1). Posteriormente se realizó el diseño de los oligonucleótidos introduciendo la secuencia de cDNA en la página <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>. Para observar los cambios en la expresión de IGFBP-1, MMP-9 y TIMP-1 se comparó con la expresión del gen constitutivo 18S. A continuación se muestran las características de los oligonucleótidos utilizados.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para realizar PCR.

Nombre	Secuencia	%GC	Tm °C	Tamaño del producto
IGFBP-1 Sentido	5`- GAGCCCAGAGATGACAGAGG - 3`	60	59.94	334 pb
IGFBP-1 Anti sentido	5`-CCACTCCATGGGTAGACAC - 3`	60	60.24	
MMP-9 Sentido	5`- GGATCCCCAGAGCGTACTC - 3`	60	60.99	182 pb
MMP-9 Anti sentido	5`- GCAGGAGGTCATAGGTCACG - 3`	60	60.68	
TIMP-1 Sentido	5`- GGGTGTGCACAGTGTTTCC - 3`	57.89	60	178 pb
TIMP-1 Anti sentido	5`- GTCATCGAGACCCCAAGGTA - 3`	55	59.93	
18S F Sentido	5`-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3`	45	60	219 pb
18S R Anti sentido	5`-GGTCGGCATCGTTTATGGTC-3`	55	60	

Tm: temperatura de alineamiento

7.7 Estandarización de PCR.

Del tejido hepático de las ratas de cada grupo se extrajo el RNA total a partir del cual se sintetizó cDNA partiendo en todos los casos de 10µg de RNA. Tomando en cuenta las temperaturas de alineamiento de cada par de oligonucleótidos se probaron diferentes temperaturas y número de ciclos hasta obtener en los geles de electroforesis una sola banda que correspondiera al peso molecular del fragmento del gen que se estaba amplificando. Las estandarizaciones se realizaron con muestras del grupo control.

A continuación se muestran las condiciones que se utilizaron, en cada caso, para realizar la PCR:

Tabla 6. Condiciones en las que se llevó a cabo la PCR.

Gen	Temperatura de alineamiento °C	Número de ciclos
IGFBP-1	60	30
MMP-9	61	40
TIMP-1	60	30
18S	60	28

7.8 Densitometría óptica.

Una vez realizado el ensayo de PCR las muestras se corrieron en un gel de Agarosa al 1% con bromuro de etidio. El gel resultante fue expuesto a luz UV (302nm) para observar las bandas presentes en el gel mediante el uso de un transiluminador adaptado a una cámara digital (Kodak). Se realizó una densitometría óptica comparando la intensidad de las bandas que corresponden al fragmento de cDNA del gen (IGFBP-1, MMP-9 o TIMP-1) con la intensidad de la banda correspondiente a 18S, utilizando el software *Image J* (NIH, EUA).

7.9 Histología.

Parte del hígado se conservó en formaldehído, posteriormente se incluyó en parafina y se realizaron cortes seriados de un grosor de 5 micras. Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina y eosina (tinción de H-E), con la tinción tricrómica de Masson y con rojo de Sirio; estas dos últimas para evidenciar la presencia de los septos fibróticos.

7.10 Extracción de proteína a partir de tejido hepático.

A 100 mg de tejido hepático se les realizaron 5 ciclos de congelamiento-descogelamiento con nitrógeno líquido y hielo con el fin de romper las membranas celulares. Posteriormente se adicionaron 100 µl de PBS 1X y se homogenizó el tejido. El homogenizado se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C, al finalizar la centrifugación se recuperaron los sobrenadantes. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (10 / 4%) para observar la integridad de las proteínas aisladas.

7.11 Cuantificación de IGFBP-1 en tejido hepático por medio de MILIPLEX® MAP Kit.

Una vez realizada la extracción de proteínas del tejido hepático se realizaron diluciones 1:15 a partir del sobrenadante obtenido para analizarlas mediante un arreglo en suspensión

múltiple (Miliplex #Catálogo MIGFBPMAG-43K). Brevemente: se adicionaron 200 µl de Assay buffer a cada uno de los 96 pozos, se agitó por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente el buffer se decantó. Se adicionaron 25 µl de Assay buffer a los pozos del blanco, los estándares, los controles y de las muestras. A continuación, 25 µl de los estándares, controles y muestras fueron adicionados en sus respectivos pozos, así como 25 µl de Assay buffer al pozo del blanco. 25 µl del mix de esferas magnéticas fue añadido a cada pozo. La placa se incubó una noche completa en agitación y a 4°C. La placa de 96 pozos se colocó sobre una placa magnética con el fin de que las esferas se fueran al fondo de la placa y se pudieran realizar los lavados correspondientes. Una vez hechos los lavados se adicionaron 50 µl del anticuerpo de detección a cada pozo, la placa se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurridos los 30 minutos se agregaron 50 µl de estreptavidina-ficoeritrina y se incubó nuevamente 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. Finalmente se realizaron lavados, se agregaron 100 µl de Sheath fluid a cada pozo y la placa se leyó en un equipo LUMINEX 200® (BioRad, Hercules, CA). La cantidad de proteína de IGFBP-1 se calculó con base en la curva estándar (Figura 5), la sensibilidad del ensayo fue de 0.04 ng/mL y los valores de controles de calidad del ensayo estuvieron dentro del rango esperado (Tabla 7).

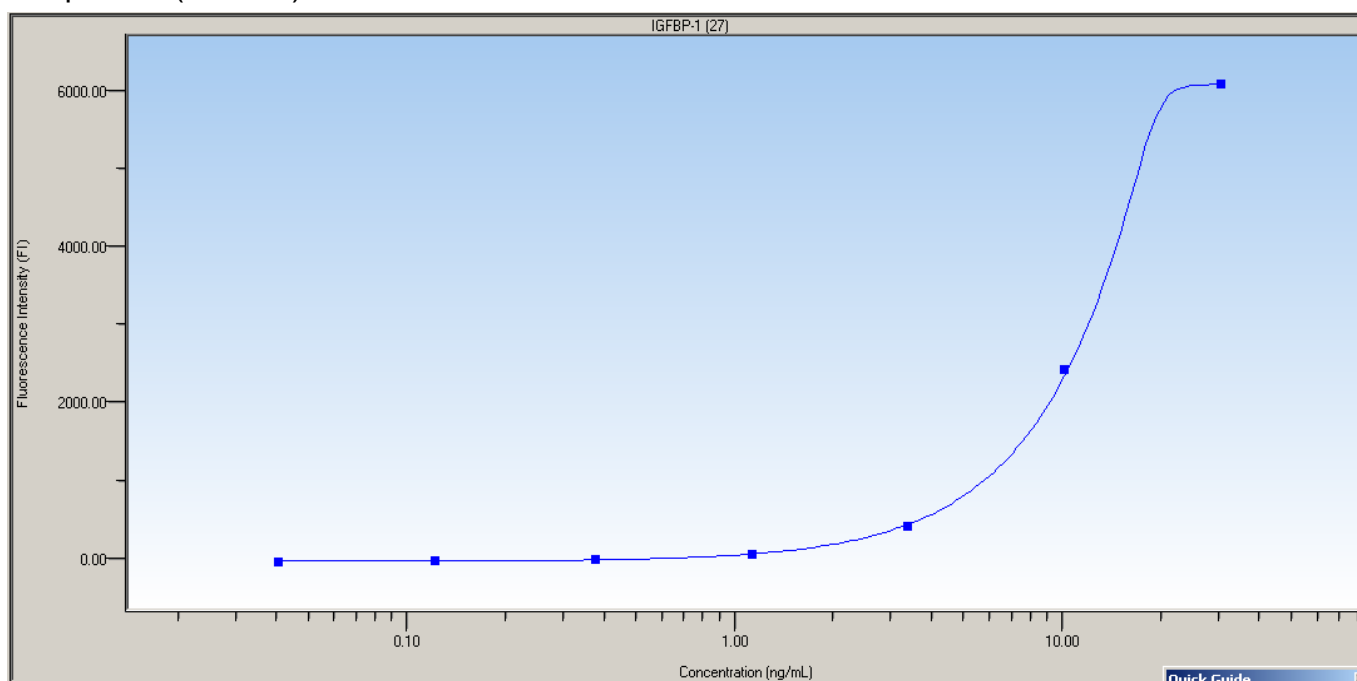


Figura 5. Curva estándar de IGFBP-1. La gráfica muestra la fluorescencia de siete estándares con diferentes concentraciones que se utilizaron para realizar la curva estándar para la cuantificación de IGFBP-1 en las muestras de proteína del tejido hepático de las ratas con diferentes grados de fibrosis.

Tabla 7. Valores obtenidos de los controles internos en la cuantificación de IGFBP-1.

Control	Rango esperado (ng/ml)	Valor obtenido (ng/ml)
I	0.36-0.75	0.62
II	2.2-4.5	4.35

En esta tabla se muestran los valores de los dos controles internos utilizados en la cuantificación de IGFBP-1. Podemos observar que en ambos casos el valor obtenido está dentro del rango esperado, lo que indica que el ensayo se realizó adecuadamente.

7.12 Análisis estadístico.

Se realizó una ANOVA de una vía seguida de la prueba pos hoc de Bonferroni para comparar diferencias entre los grupos control (F0), 8 dosis de CCl₄ (F1), 12 dosis CCl₄ (F2), 20 dosis CCl₄ (F3) y 40 dosis de CCl₄ (F4). Se realizó una t de student entre el grupo control y el grupo de 20 dosis más un mes de recuperación (F3-R) y entre el grupo de 20 dosis CCl₄ (F3) y el grupo de 20 dosis más un mes de recuperación (F3-R). El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 6. Se consideró significativa una $p < 0.05$.

8. RESULTADOS.

8.1 Inducción de diferentes grados de fibrosis en el modelo murino.

El primer objetivo fue inducir diferentes grados de fibrosis en los grupos de ratas, por lo cual se administró diferente número de dosis de CCl₄ a cada grupo y se observó que a mayor número de dosis el daño en el hígado era mayor. Por otro lado, en el grupo donde después de 20 administraciones de CCl₄ se dio un mes de recuperación pudimos observar la reversión del daño en el hígado.

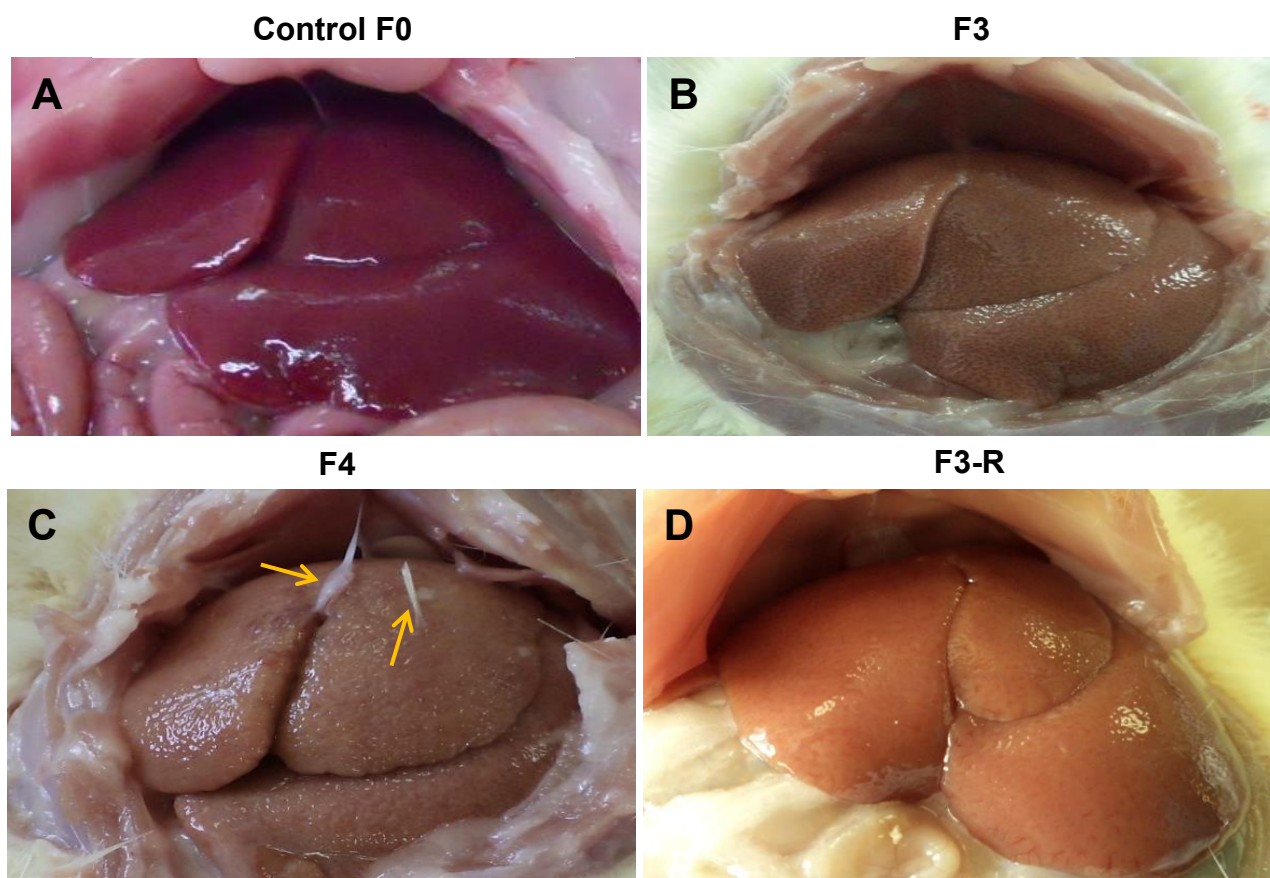


Figura 6. Imágenes al momento de la toma de muestra. Se muestran fotografías al momento de la toma de muestras del grupo control (A) se muestra un hígado en condiciones y apariencia normal, (B) después de 20 dosis de CCl_4 se observa un cambio en la apariencia del hígado tanto en su coloración como en su textura, (C) después de 40 dosis de CCl_4 muestra un hígado cirrótico con un daño importante y presencia de adherencias (flechas).y después de 20 dosis de CCl_4 y un mes de recuperación (D). Se observa que a mayor número de dosis de CCl_4 hay un daño mayor en el hígado Se puede observar una diferencia entre la imagen (B) y la imagen (D), en ambos casos se administraron 20 dosis de CCl_4 pero la imagen (D) muestra la recuperación después de un mes de concluidas las administraciones.

8.1.1 Tinciones histológicas.

Utilizamos las tinciones de Hematoxilina y eosina, la tinción tricrómica de Masson y la tinción de rojo de Sirio para microscópicamente poder establecer el grado de fibrosis hepática presente en los diferentes grupos. De acuerdo a la escala de METAVIR, en nuestro modelo experimental, 8 dosis de CCl_4 dan como resultado fibrosis en su primera fase (F1), 12 dosis

corresponden a la fase 2 (F2), 20 dosis a la fase 3 (F3) y 40 dosis provocan cirrosis hepática (F4) de acuerdo a lo descrito en la Tabla 1 (escala de METAVIR).

En la tinción general de Hematoxilina y Eosina los núcleos de las células se tiñen de color morado y el citoplasma de color rosado. La tinción de H y E es la tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos mediante el uso de microscopia fotónica y nos permite observar la morfología y la organización celular.

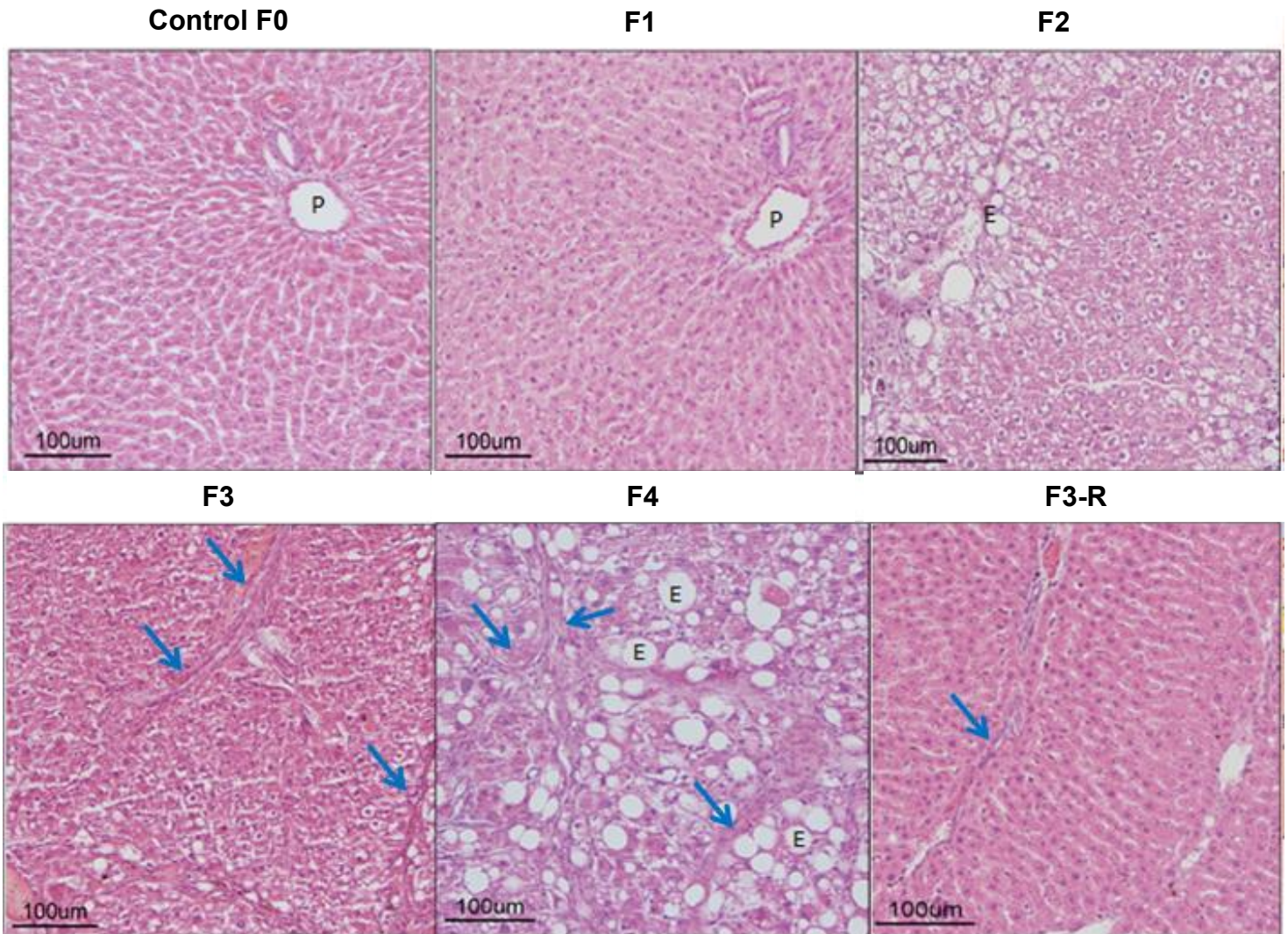


Figura 7. Imágenes de las tinciones de H y E del tejido hepático de las ratas tratadas con diferentes dosis de CCl_4 . Se observan alteraciones en la microestructura del hígado debida a la administración de CCl_4 . A partir de 12 dosis de CCl_4 (F2) se observa la presencia de esteatosis (E) la cual se observa abundantemente en el grupo F4. En los grupos F3 y F4 se pueden observar septos fibróticos (flechas). En el grupo F3-R aún se observa la presencia de septos (flecha), sin embargo, en cuanto la organización de los hepatocitos, se observa una diferencia respecto al grupo F3. (P) vaso portal. Imágenes observadas a 8X.

La tinción tricrómica de Masson es una tinción que nos permite visualizar fibras de colágena tipo 1 las cuales se tiñen de color azul, mientras que el citoplasma de las células de color rosa y los núcleos de color lila. Ésta tinción junto con la tinción de rojo de sirio nos permitieron observar y estadificar la fibrosis presente en cada grupo utilizando la escala de Metavir.

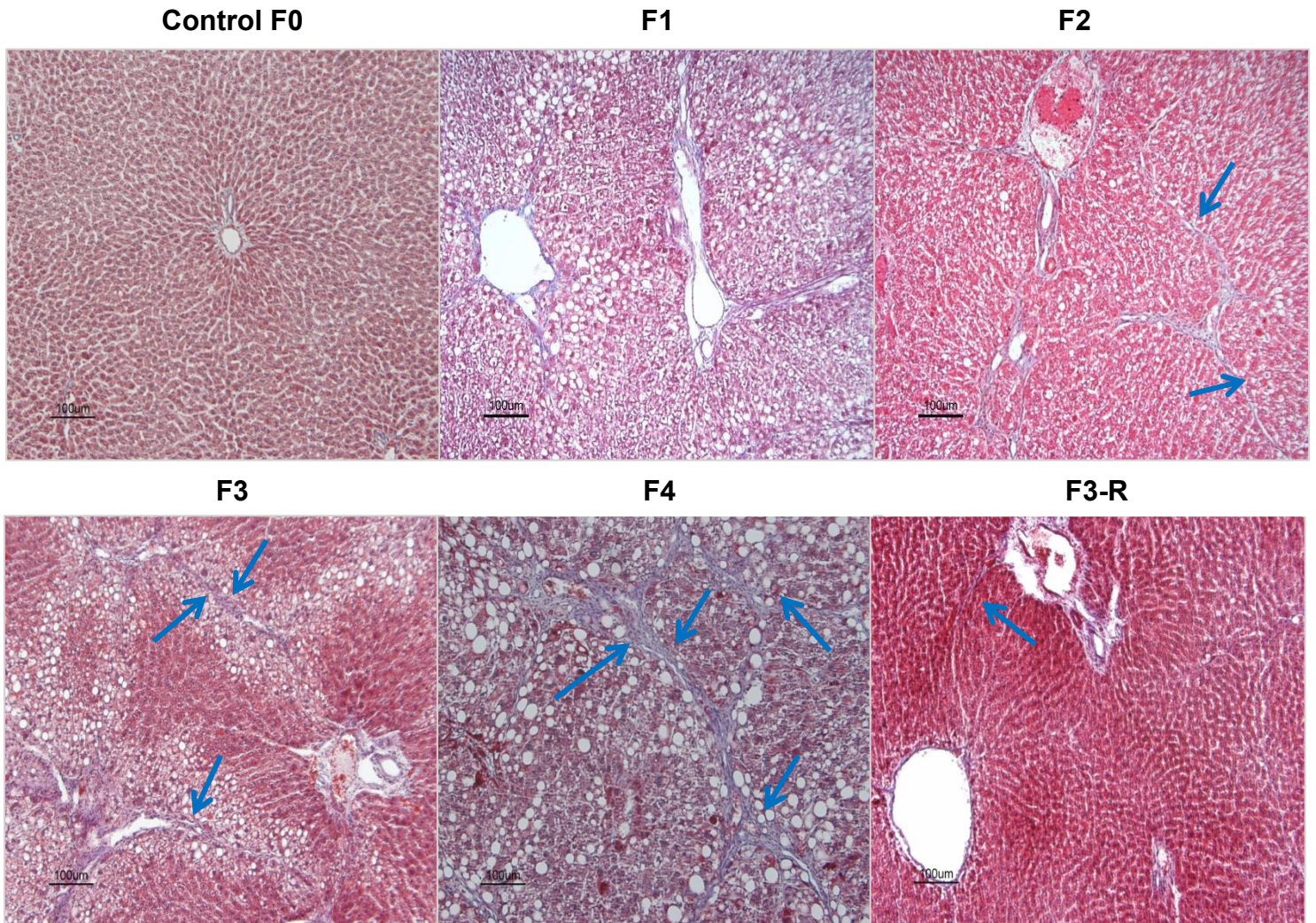
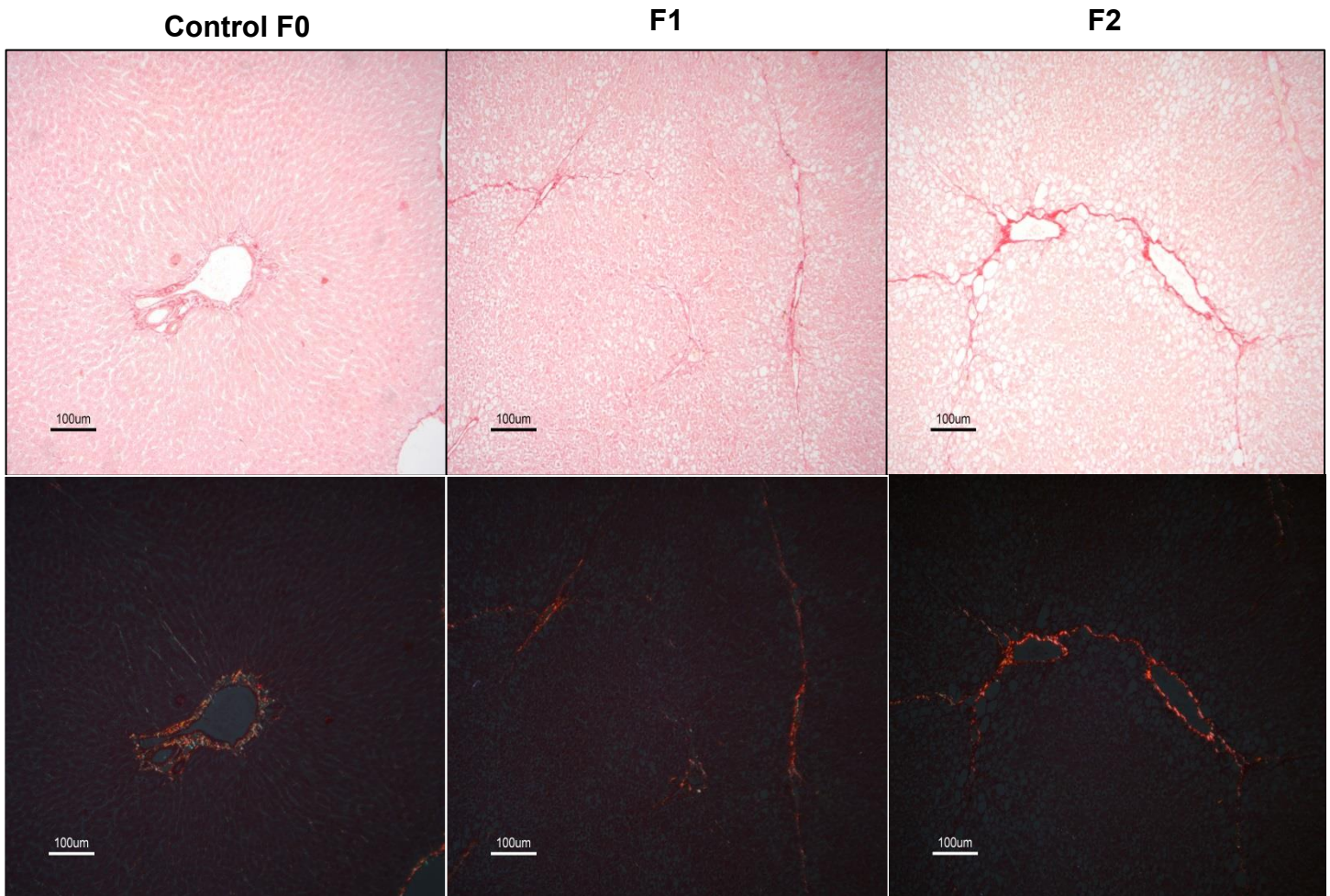


Figura 8. Imágenes de las tinción tricrómica de Masson del tejido hepático de las ratas tratadas con diferentes dosis de CCl_4 . En la imagen del grupo control no se observa coloración azul que corresponda a fibras de colágena. En el grupo F3 observamos la presencia de septos gruesos y largos (flechas) y la presencia de esteatosis. En F4 se observa una gran cantidad de esteatosis, la organización de los hepatocitos se ha perdido completamente, se observan septos gruesos que se unen (flechas) y comienzan a formar redes, todo esto corresponde a la cirrosis. Por último, en la imagen del grupo F3-R se observa una reversión clara de la fibrosis a una etapa 2 si lo comparamos con el grupo F3. Imágenes observadas a 8X.

La tinción de rojo de Sirio tiñe el tejido conectivo de color rojo y aunque no es una tinción específica para fibras de colágeno nos permite identificarlas cuando esta tinción se combina con el uso de la luz polarizada; las fibras de colágena tipo I de a cuerdo a su orientación se observan de color amarillo brillante, naranja o rojo. Las fibras de colágena tipo II se pueden apreciar de color azul o amarillo claro y las fibras de colágena tipo III se observan de color verde.



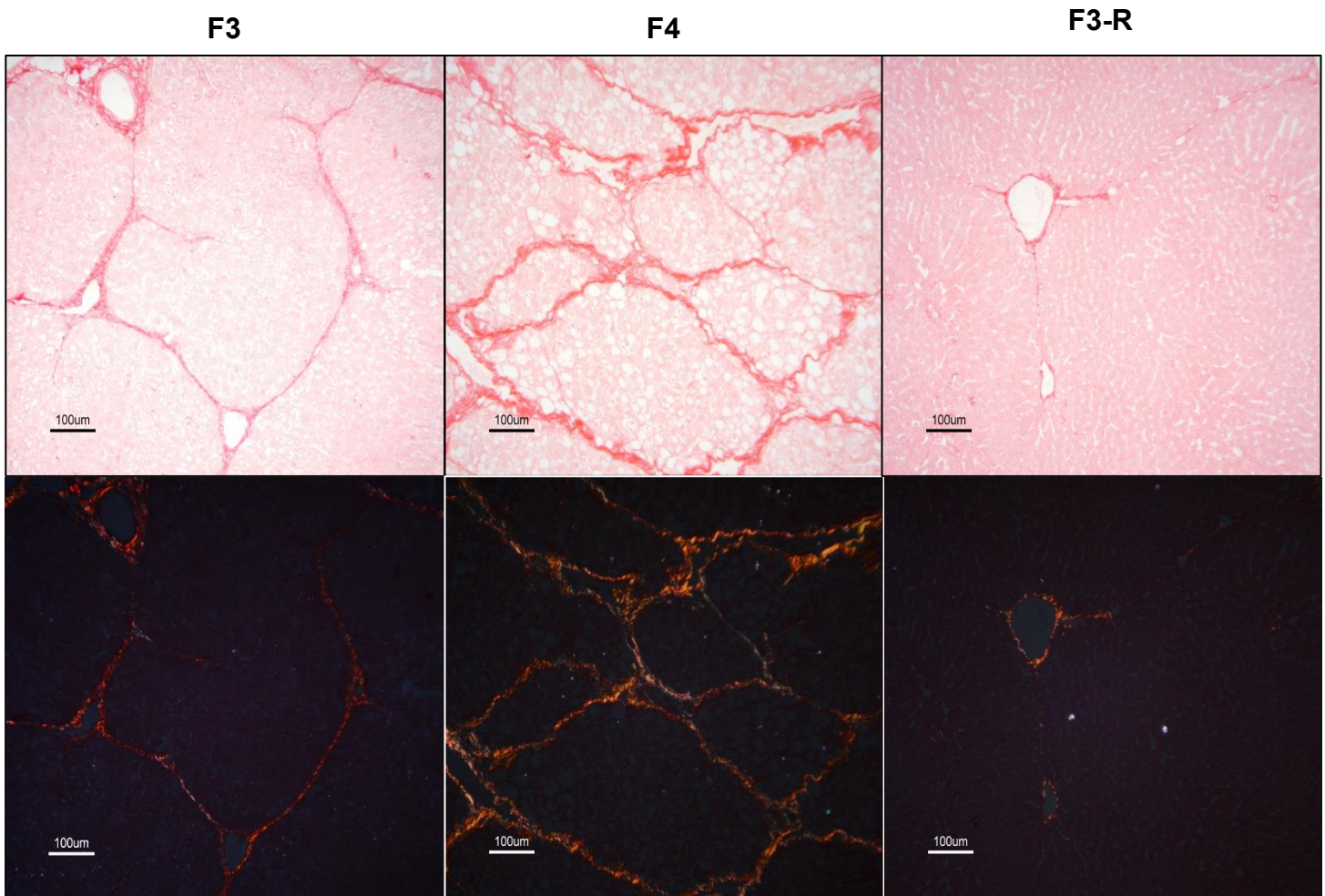


Figura 9. Imágenes de tinción de rojo de Sirio. Se muestran imágenes de los diferentes grupos con y sin luz polarizada. Se observa el incremento de las fibras de colágeno. En el grupo F1 se observa la presencia de fibras pequeñas y finas. En el grupo F2 las fibras son de un grosor mayor y se observa fibrosis en puente característica de éste estadio de la fibrosis. En el grupo F3 observamos la presencia de un mayor número de fibras las cuales comienzan a unirse. En el grupo F4 se observa la presencia de nódulos de regeneración, que son áreas delimitadas por septos gruesos de colágena tipo I y III, y característicos de la cirrosis hepática. Por último, en el grupo de Recuperación observamos reversión del proceso fibrogénico, la presencia y grosor de fibras disminuye respecto al grupo F3 (20 dosis de CCl_4). Imágenes observadas a 8X.

8.2 Expresión y cuantificación de IGFBP-1 en el tejido hepático en los diferentes grupos.

Se realizó una PCR para estudiar la expresión de IGFBP-1 en los diferentes estadios de la fibrosis. Su expresión disminuyó en el grupo F2 (figura 10), que corresponde a una etapa

intermedia de daño, comparada con la observada en el grupo F1 ($F1=0.64 \pm 0.02$; $F2=0.53 \pm 0.03$ expresado en Unidades Relativas) .La expresión más alta del gen de IGFBP-1 se observó en el grupo que recibió 40 dosis de CCl_4 (F4), existe una diferencia significativa entre este grupo y el grupo F2 ($F2= 0.53 \pm 0.03$; $F4= 0.74 \pm 0.06$ expresado en Unidades Relativas). (Control (F0)= 0.62 ± 0.07 ; $F3= 0.63 \pm 0.04$).

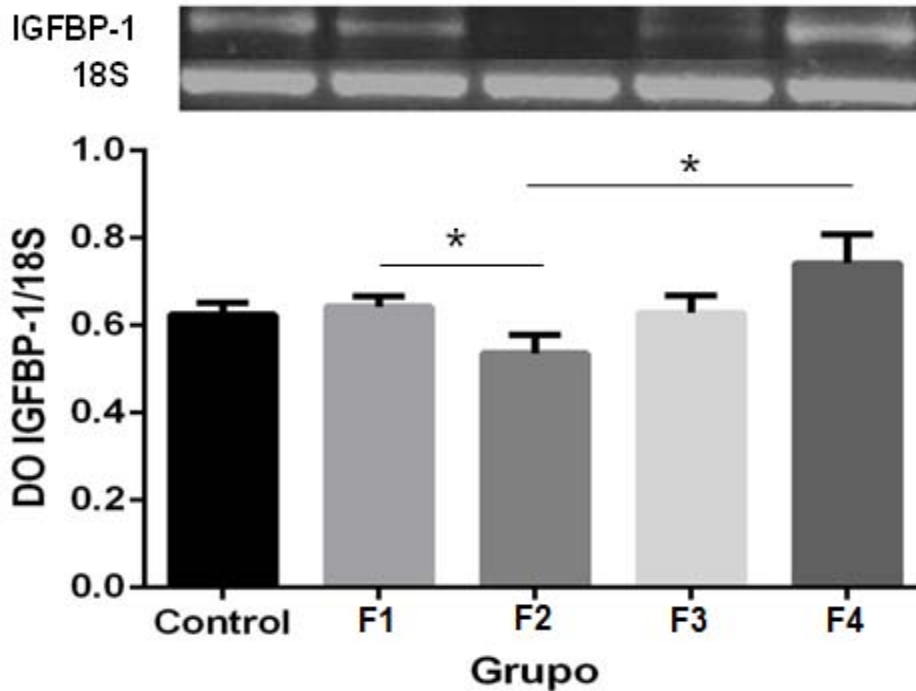


Figura 10. Expresión de IGFBP-1 en el hígado con diferentes grados de fibrosis. En éste gráfico se pueden observar los niveles de expresión de IGFBP-1 en los diferentes grupos. Se utilizó la expresión de 18S para normalizar los datos. Los resultados que se muestran son la media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de la prueba pos hoc de Bonferroni para comparar los diferentes grupos y se observó una diferencia significativa entre el grupo F1 vs F2 y F2 vs F4. DO= Densidad óptica. n= 6. *= $p < 0.05$.

La cuantificación de IGFBP-1 se realizó utilizando un arreglo en suspensión. Observamos una disminución significativa en la cantidad de proteína presente en el tejido hepático en el grupo F4 comparada con la proteína presente en el grupo control (F0) y F1 (figura 11).

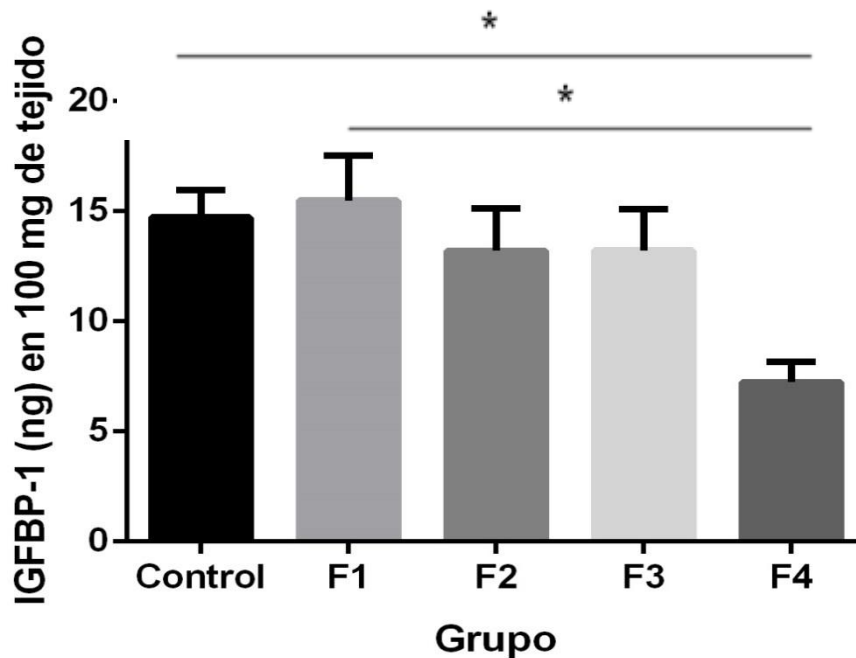


Figura 11. Cantidad de IGFBP-1 en ng/ 100g de tejido. En éste gráfico se pueden observar la cantidad de IGFBP-1 presente en 100 gr de tejido hepático de ratas que presentan diferente grado de fibrosis y se observa que en el grupo F4 la cantidad de IGFBP-1 en el tejido disminuye. Los resultados que se muestran son la media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de la prueba pos hoc de Bonferroni para comparar los diferentes grupos y se observan diferencias significativas entre los grupos Control vs F4 y F1 vs F4. n= 6.
*= $p < 0.05$.

8.3 Expresión de MMP-9 y su inhibidor TIMP-1 en los diferentes grupos.

Estudiamos la expresión de MMP-9 y TIMP-1 durante los diferentes estadios de la fibrosis ya que son proteínas implicadas en el mantenimiento de la ECM, pueden interactuar con IGFBP-1 y su papel es importante en el progreso y resolución de la fibrosis. No observamos cambios en la expresión de MMP-9 en ningún grupo (figura 12) (Control (F0)= 0.87 ± 0.09 ; F1= 0.88 ± 0.09 ; F2= 0.87 ± 0.08 ; F3= 0.87 ± 0.06 ; F4= 0.87 ± 0.05), mientras que la expresión de TIMP-1 aumenta conforme aumenta el daño en el hígado (figura 13). En la expresión de TIMP-1 existen diferencias significativas entre los grupos Control vs F3 (Control (F0)= $0.69 \pm$

0.05; F3= $0.77 \pm .07$), Control vs F4 (Control (F0)= 0.69 ± 0.05 ; F4= $0.99 \pm .08$), F1 vs F4 (F1= $0.69 \pm .05$; F4= $0.99 \pm .08$) y F2 vs F4 (F2= $0.72 \pm .05$; F4= $0.99 \pm .08$).

Expresión de MMP-9 en los diferentes grupos.

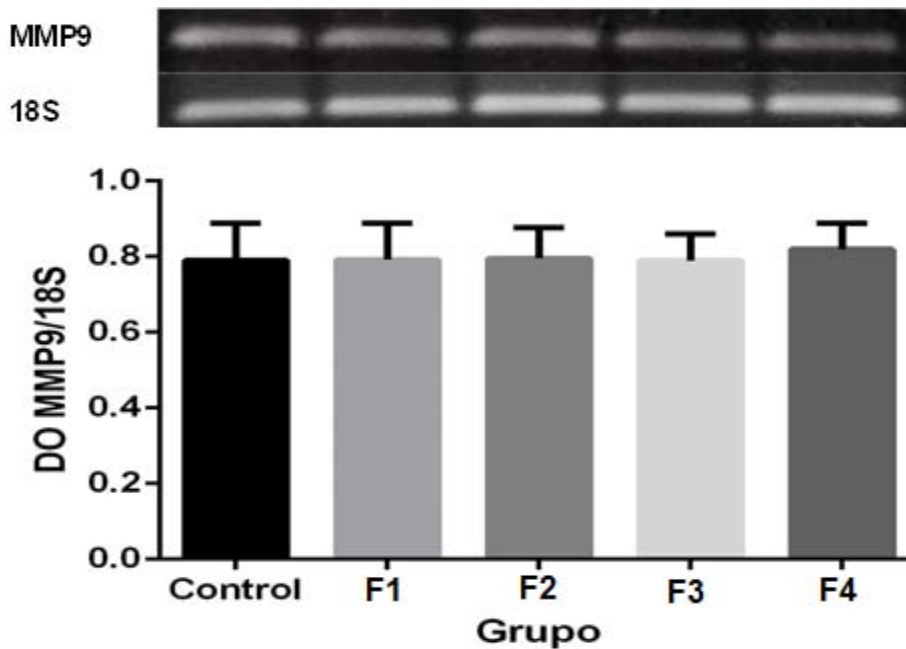


Figura 12. Expresión de MMP-9 en el hígado con diferentes grados de fibrosis. En éste gráfico se pueden observar los niveles de expresión de MMP-9 en los diferentes grupos. Se utilizó la expresión de 18S para normalizar los datos. Los resultados que se muestran son la media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía para comparar los diferentes grupos y no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos.

DO= Densidad óptica. n= 6 p < 0.05.

Expresión de TIMP-1 en los diferentes grupos.

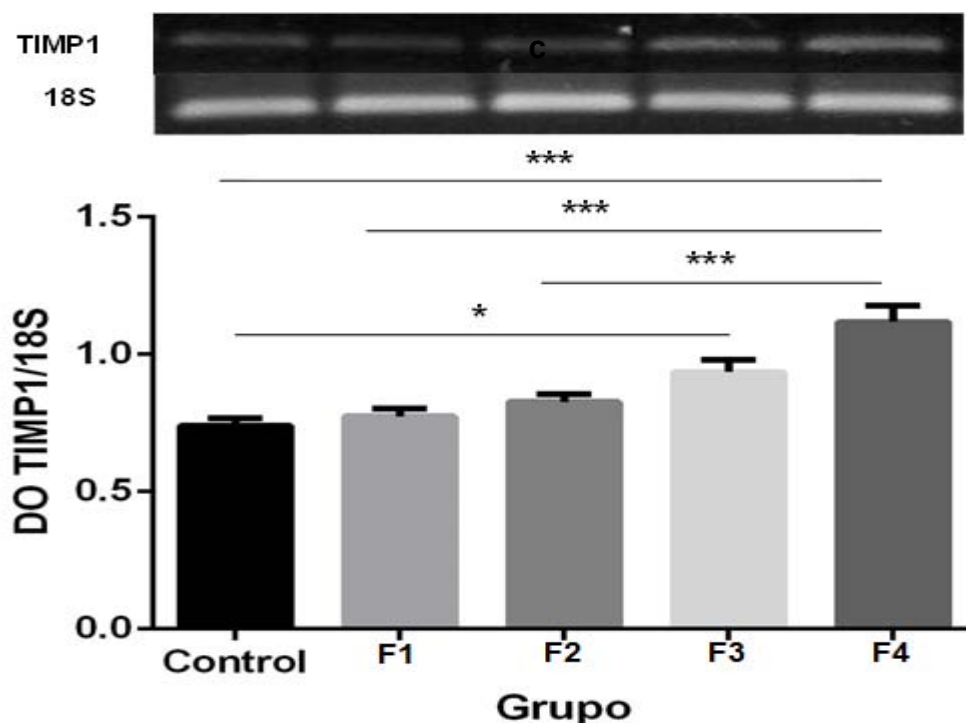


Figura 13. Expresión de TIMP-1 en el hígado con diferentes grados de fibrosis. En éste gráfico se pueden observar los niveles de expresión de TIMP-1 en los diferentes grupos. Se utilizó la expresión de 18S para normalizar los datos. Los resultados que se muestran son la media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de la prueba pos hoc de Bonferroni para comparar los diferentes grupos. Se observa un aumento en la expresión de TIMP-1 conforme el número de dosis aumenta. DO= Densidad óptica. n= 6. *= $p < 0.05$.

***= $p < 0.001$

8.4 Reversión de fibrosis.

Estudiamos la expresión de MMP-9, TIMP-1, además de la expresión y cuantificación de IGFBP-1 en el hígado durante el proceso de reversión de la fibrosis. A un grupo de ratas se les administró 20 dosis de CCl_4 y finalizadas las administraciones se esperó un mes para la toma de muestra. Observamos que la expresión de IGFBP-1 disminuye drásticamente en el grupo de ratas donde observamos la reversión de la fibrosis comparada con la expresión del grupo control (Control (F0)= 0.62 ± 0.02 ; F3-R= 0.13 ± 0.009) y el grupo F3 (F3= 0.63 ± 0.03) (figura 14). A pesar de esto no observamos cambios significativos en la cantidad de proteína

presente en el hígado (Figura 15). La expresión de MMP-9 no cambia durante la reversión de la fibrosis (figura 16), mientras que la expresión de TIMP-1 disminuye significativamente cuando se compara al grupo donde se observó la reversión de la fibrosis con el grupo que recibió el mismo número de dosis de CCl₄ (20 dosis, F3) (F3= 0.89± 0.04; F3-R= 0.73± 0.02) (figura 17).

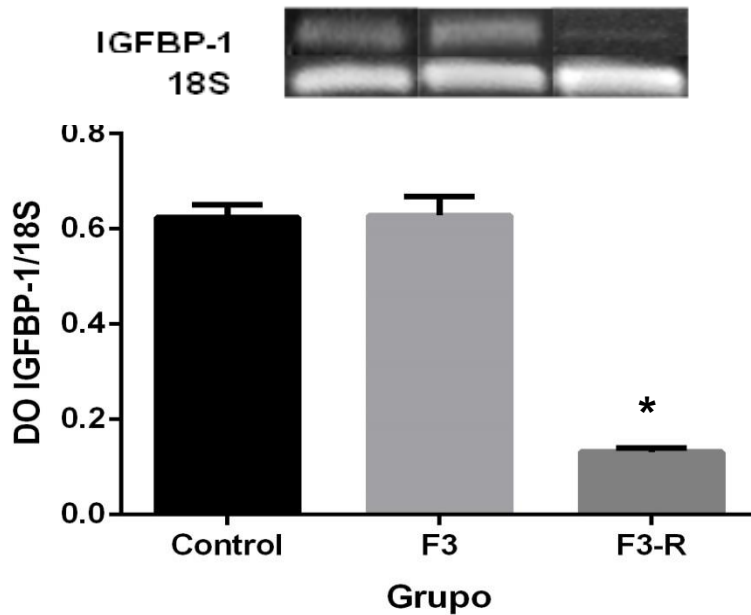


Figura 14. Expresión de IGFBP-1 durante el proceso de reversión de la fibrosis. Se observa una disminución en la expresión de IGFBP-1 durante el proceso de reversión de la fibrosis, la disminución de la expresión es significativamente menor comparada con todos los otros grupos. Los resultados que se muestran son la media ± EEM. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de la prueba pos hoc de Bonferroni para comparar los diferentes grupos. DO= Densidad óptica. n= 6 *p < 0.05

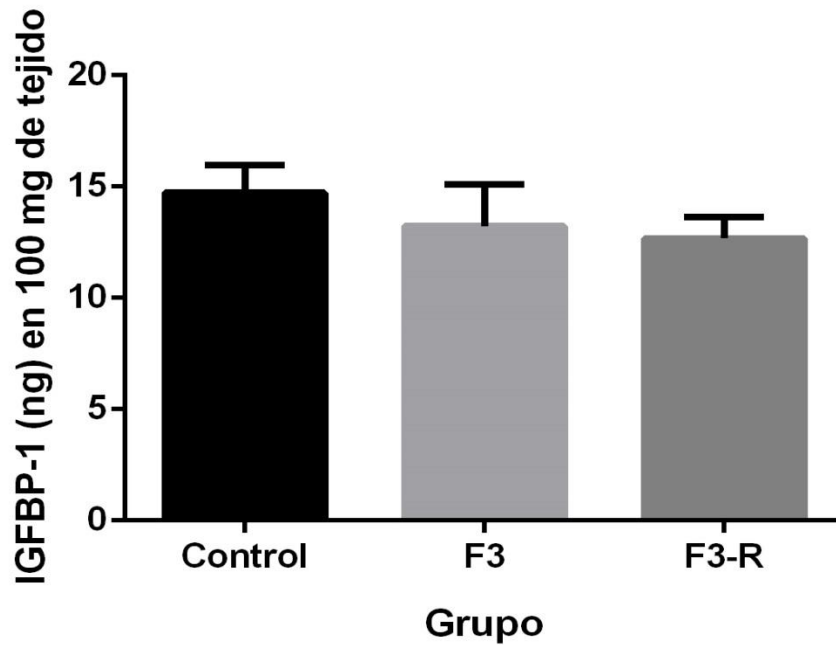


Figura 15. Cuantificación de IGFBP-1 durante la reversión de la fibrosis. No se observan diferencias significativas en la cantidad de IGFBP-1 presente en el hígado durante la reversión de la fibrosis. Los resultados que se muestran son la media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía. n= 6

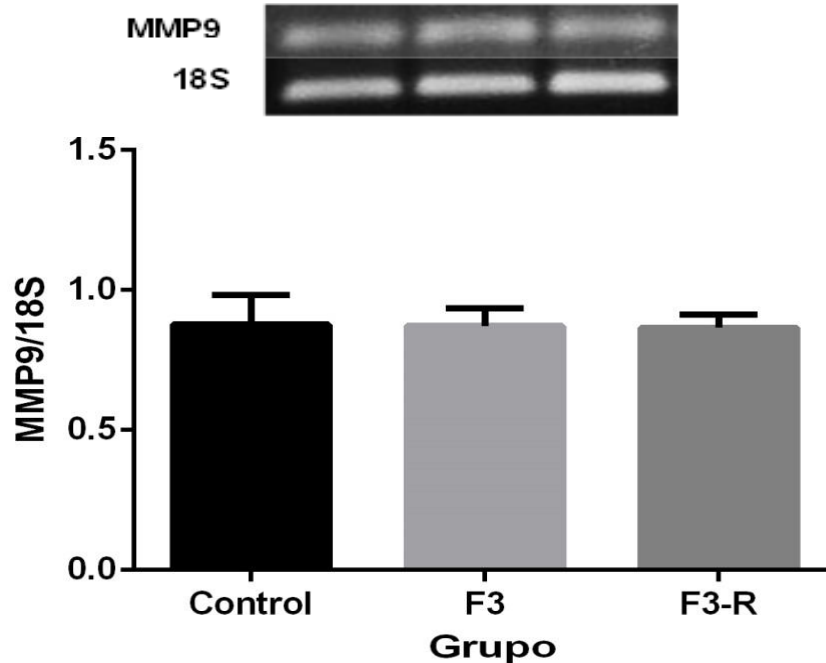


Figura 16. Expresión de MMP-9 durante el proceso de reversión de la fibrosis. Los resultados que se muestran son la media \pm EEM. No se observan cambios en la expresión de MMP-9 durante la reversión de la fibrosis. Se realizó una ANOVA de una vía para comparar los diferentes grupos. DO= Densidad óptica. n= 6

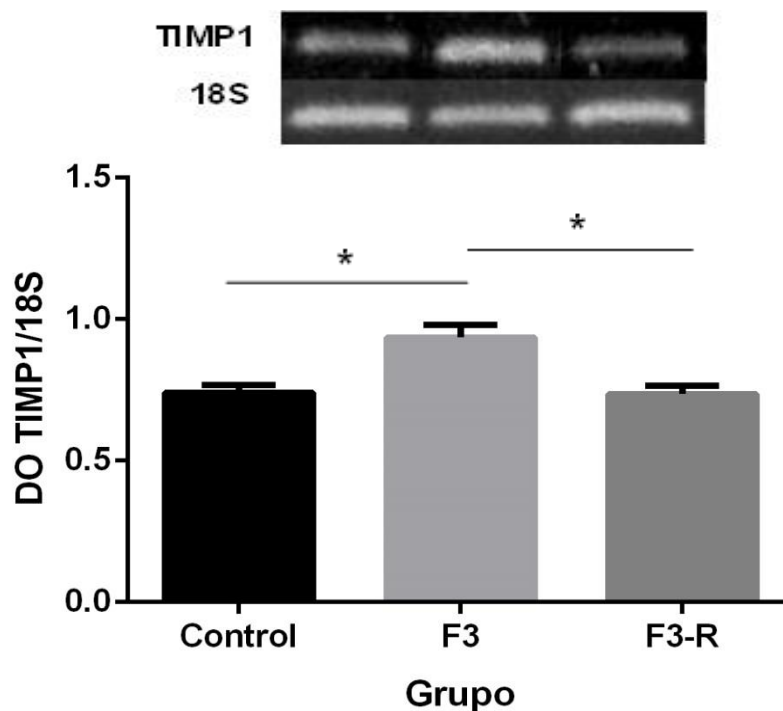


Figura 17. Expresión de TIMP-1 durante la reversión de la fibrosis. La expresión de TIMP-1 disminuye durante el proceso de reversión de la fibrosis llegando a niveles similares a los que presenta el grupo control. Los resultados que se muestran son la media \pm EEM. Se realizó una ANOVA de una vía seguida de la prueba pos hoc de Bonferroni para comparar los diferentes grupos y se observan diferencias significativas entre el grupo control vs el grupo F3 y F3 vs 20D+R. DO= Densidad óptica. n= 6 * $p < 0.05$.

9. DISCUSIÓN

Se identificaron variaciones en la expresión del gen y la producción de la proteína IGFBP-1 en el tejido hepático durante los diferentes estadios de la fibrosis en nuestro modelo experimental.

Recientemente se ha demostrado la participación de algunas IGFBPs en el proceso fibrogénico. En la fibrosis pulmonar, la sobre expresión de IGFBP-5 favorece la producción de ECM (colágenas y fibronectina) y la respuesta fibrogénica por parte de los fibroblastos (Yasuoka, 2009; Yasuoka, 2009; Sureshbabu, 2009). Efectos similares se han observado en la fibrosis en piel (Yasuoka, 2006). Por otra parte, IGFBP-4 ha mostrado asociación con los niveles de expresión de las principales moléculas involucradas en la remodelación de ECM, las metaloproteinasas de matriz. Particularmente las MMP -1, -3 y -13 muestran una

correlación con IGFBP-4 en la remodelación tisular del endometrio en el periodo post-parto (Wathes, 2011).

Debido a la similitud estructural entre las IGFBPs se puede pensar que otras proteínas, adicionalmente a IGFBP 4 y 5, tengan un papel en el proceso de la fibrosis en otros tejidos. En el hígado IGFBP-1 aumenta la estimulación de los efectos proliferativos de IGF-I sobre las HSC (Scharf, 2004), aumenta su expresión al administrar halofuginona, un fármaco anti fibrótico (Gnainsky, 2004), y pacientes con fibrosis hepática debida a la infección crónica por virus de hepatitis C presentan niveles séricos de IGFBP-1 25 veces mayores respecto a sujetos sanos (Guzmán, 2010); por lo cual es factible una participación de IGFBP-1 en el proceso fibrogénico.

Cambios en la expresión de IGFBP-1 en el hígado se han reportado después de una hepatectomía parcial (Mohn, 1991) o de un daño agudo producido por hepatotoxinas como el CCl₄ (Scharf, 2004), sin embargo, no se ha reportado el comportamiento de la expresión de IGFBP-1 durante el progreso de daño crónico al hígado.

Observamos una disminución significativa de la expresión en el grupo F2 comparada con el grupo F1 y un aumento de la expresión significativo en el grupo F4 comparado con el grupo F2 (Figura 12). Una expresión disminuida de IGFBP-1 podría ayudar a distinguir una etapa de daño moderado (F2) de una etapa inicial del daño. Los cambios en la expresión observados en las primeras etapas de la fibrosis no alteran la cantidad de la proteína presente en el tejido hepático. En la figura 16 observamos que la cantidad de proteína sólo cambia en el grupo F4. En éste grupo, en el cual observamos cirrosis hepática, se presenta la mayor expresión del gen de IGFBP-1, no obstante, la cantidad de proteína en el tejido hepático es menor comparada con los grupos control y F1. El aumento en la expresión de IGFBP-1 durante la cirrosis puede deberse al aumento en la producción de IL-6 por las HSC o porque vías que promueven su transcripción son activadas como consecuencia del daño presenta. Ya que IGFBP-1 tiene un efecto sobre la regulación de la glicemia y se sabe que la cirrosis es acompañada por hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (Petrides, 1989) es posible que parte de la proteína que se produce se está excretando y por ello se encuentra poca cantidad de la proteína en el hígado en el grupo F4. También podría deberse a que durante un daño crónico en el hígado los hepatocitos comienzan a sufrir apoptosis (Duval,

2014), por lo cual la destrucción de estas células genere la liberación de la IGFBP-1 que han producido, provocando una disminución de la proteína en el tejido. Por otro lado, durante la cirrosis se observa disminución en la producción de ciertas proteínas como la albúmina y proteínas de la coagulación, mecanismos que disminuyen la producción de estas proteínas pudieran de igual forma influir en la disminución de la cantidad de IGFBP-1.

La proteólisis de IGFBP-1 en el grupo F4 resulta poco probable pues en este grupo se encontró la expresión más alta de TIMP1, lo que significa que MMP-9 se encuentra altamente inhibida y por lo tanto no ejerce su función principal, la degradación de ECM, y por otro lado, tampoco degrada a IGFBP-1 (Coppock, 2004).

Se sabe que IGFBP-1 puede aumentar los niveles de MMPs en cultivo de citotrofblastos (Hills et al., 2004) y promover la secreción de TIMP-1 por los trofblastos. En el hígado existe poca evidencia de la participación de IGFBP-1 en la regulación de los niveles de MMPs y TIMPs, sólo existe un reporte en el cual se muestra que concentraciones altas de IGFBP-1 pueden reducir los niveles de la proteína MMP-9 en células de hepatocarcinoma celular (Dai, 2014). Siendo MMP-9 y TIMP-1 proteínas implicadas en el mantenimiento de la ECM y cuyo papel es importante en el progreso y resolución de la fibrosis estudiamos su expresión durante los diferentes estadios de la fibrosis. Nuestros resultados de la expresión de MMP-9 y TIMP-1 concuerdan con estudios previos; no se observa cambio en la expresión de MMP-9 en ningún grupo (Figura 11), mientras que los niveles de expresión de TIMP-1 aumentan conforme aumenta el grado de fibrosis (Figura 12).

En nuestro modelo experimental observamos la reversión de fibrosis de una etapa F3 a una etapa F2-F1 después de un mes de finalizado el tratamiento con CCl₄. Como se podría pensar encontramos una menor expresión de TIMP-1 en el grupo donde observamos la reversión de la fibrosis y observamos que su expresión en este grupo es prácticamente igual a la expresión que se observó en el grupo control (Figura 16). La expresión de MMP-9 no cambia incluso durante la reversión de la fibrosis (Figura 15) pero al disminuir la expresión de TIMP-1 existe menor inhibición a MMP-9 y por ende, una mayor actividad sobre la degradación de ECM, que se refleja en una disminución en la cantidad y grosor de septos.

En nuestro conocimiento no hay reportes que hablen sobre la expresión de IGFBP-1 durante la reversión de la fibrosis. Muy interesante resultó observar una expresión tan baja de IGFBP-1 durante la reversión de la fibrosis (Figura 14), la expresión es significativamente menor a todos los otros grupos. Aunque hay una expresión tan baja del gen de IGFBP-1 durante la reversión de la fibrosis no se observaron cambios significativos en la cantidad de proteína presente en el tejido hepático (Figura 17). Probablemente hay una cantidad suficiente de IGFBP-1 durante la reversión de la fibrosis y no se necesita más expresión del gen, o alguna molécula, por ejemplo la insulina, pueda provocar una disminución en la expresión de IGFBP-1.

En el tejido hepático de las ratas observamos abundante cantidad de grasa (esteatosis) principalmente cuando el daño es grave (Figura 7). Un estudio en pacientes obesos que presentaban NASH, cuyo fin era identificar diferencias en el patrón de expresión de varios genes por medio de un microarreglo, mostró que las personas que presentaban este padecimiento tenían una expresión de IGFBP-1, menor comparada con sujetos sanos (Younossi, 2005). Por lo cual la gran cantidad de esteatosis en los hígados de las ratas podría afectar de alguna forma la expresión de IGFBP-1 sin embargo, se sabe muy poco sobre los mecanismos involucrados en la presencia de NASH. Sería interesante estudiar la expresión de IGFBP-1 en diferentes grados de fibrosis en otros modelos experimentales, por ejemplo; dieta deficiente de colina o administración de tioacetamida, los cuales generan fibrosis mediante mecanismos diferentes al CCl_4 y nos ayudarían a entender si los cambios en la expresión de IGFBP-1 se deben al grado de fibrosis independientemente de cual sea el proceso fibrogénico.

El gen de IGFBP-1 es regulado de una forma muy compleja pues responde a diversos estímulos. Muy interesante resultaría estudiar en nuestro modelo moléculas como IL-6, insulina y otras proteínas relacionadas con la activación o inhibición de la transcripción del gen y así entender a que responden los cambios en la expresión que observamos. Se ha identificado que IGFBP-1 puede alterar los niveles de MMP-9 y TIMP-1 en ciertos tipos celulares, por lo que sería interesante estudiar más a fondo si durante el proceso fibrogénico existe una relación entre IGFBP-1 y proteínas relacionadas con el mantenimiento de ECM.

Existe la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico de fibrosis alternativos, seguros y eficaces, con el fin de mejorar el diagnóstico, estadificación y pronóstico de pacientes que sufren de este padecimiento. Resultados preliminares en nuestro laboratorio mostraron que pacientes que presentaban fibrosis hepática debida a infección crónica por el virus de hepatitis C presentaban niveles séricos de IGFBP-1 hasta 25 veces mayores comparados con sujetos sanos, sugiriendo una posible participación de ésta proteína durante el desarrollo o progresión de la fibrosis hepática. De gran importancia sería estudiar en nuestro modelo si los cambios observados en la expresión y producción de IGFBP-1 durante el proceso fibrogénico se ven reflejados en los niveles séricos de la proteína y establecer si tienen alguna utilidad para diagnosticar o estadificar la fibrosis en este órgano.

10. CONCLUSIONES

Se identificaron cambios en la expresión y producción de IGFBP-1 en un daño crónico al hígado mediante la administración de CCl₄, sugiriendo que IGFBP-1 pudiera estar implicada en el desarrollo y resolución de la fibrosis hepática.

La disminución en la expresión de IGFBP-1 en el grupo F2 puede diferenciar entre etapas iniciales e intermedias de daño hepático, sin embargo, ésta no sería una alternativa viable para considerarla como un posible biomarcador.

La cantidad de IGFBP-1 en el tejido hepático disminuye significativamente durante la cirrosis probablemente como resultado de la excreción de la proteína al torrente sanguíneo o la disminución en el número de hepatocitos.

La expresión de IGFBP-1 durante la reversión de la fibrosis disminuye notablemente pero la cantidad de proteína presente en el tejido no cambia.

La expresión de MMP-9 no cambia en ningún grupo, mientras que la expresión de TIMP-1 aumenta conforme aumenta el daño en el hígado y disminuye durante la reversión a niveles similares al grupo control.

11. ANEXOS



EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN AL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINOIDE 1 (IGFBP-1) DURANTE LA FIBROSIS HEPÁTICA EN LA RATA.



O. Sánchez-Jerónimo¹, I.I. Romero-Bello¹, A. Ramírez-Mendoza¹, E. Ibarra-Coronado², G. Gutiérrez-Reyes¹, C. Guzmán¹.

¹Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad, Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM/Hospital General de México, México. ²Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, UNAM, México. carova@prodigy.net.mx

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP) son principalmente producidas en el hígado. Se ha observado que la IGFBP-1 aumenta significativamente en la sangre de pacientes que presentan una infección crónica por el virus de hepatitis C. Después del daño agudo por administración de tetracloruro de carbono (CCl₄), el patrón de expresión de IGFBP-1 en el hígado de las ratas cambia, lo cual se ha relacionado con la proliferación de hepatocitos y la regeneración hepática. Sin embargo, esta proteína no ha sido estudiada durante un tratamiento crónico con CCl₄, ni ha sido relacionada con el proceso fibrogénico en el hígado.

OBJETIVO

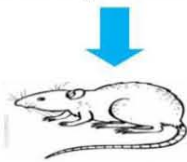
Evaluar la expresión del mRNA de Igfbp-1 en el hígado de ratas con diferente grado de fibrosis inducida por la administración de CCl₄.

MATERIAL Y MÉTODOS

GRUPOS

- Control 0 Dosis
- 8 Dosis de CCl₄
- 12 Dosis de CCl₄
- 20 Dosis de CCl₄
- 40 Dosis de CCl₄
- 20 Dosis de CCl₄ + recuperación 20D+R

Administración de 250µl de CCl₄ vía i.p. 2 veces por semana.



Ratas macho Wistar de 250±20 g de peso y 3 meses de edad.

Extracción de RNA a partir de tejido hepático.

PCR

RESULTADOS

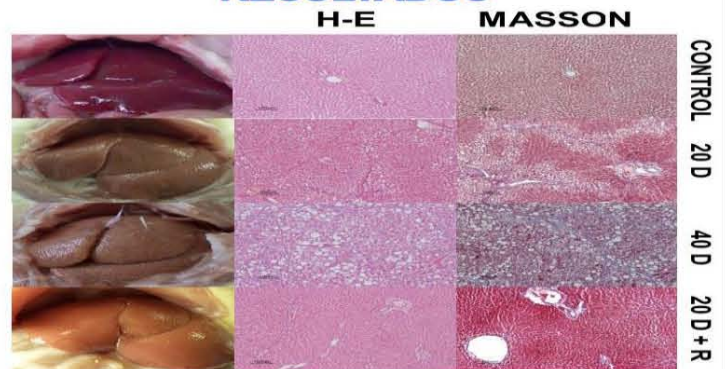
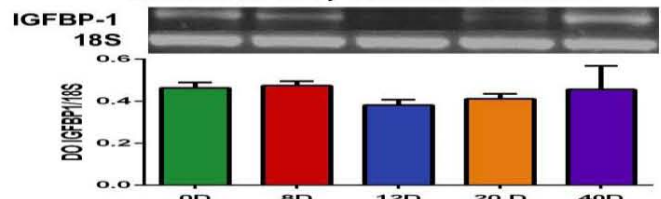
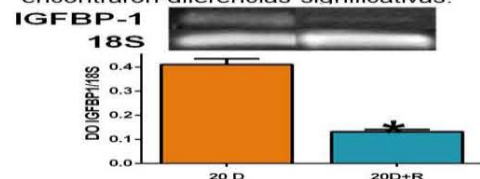


Figura 1. Fotografías de hígado de los diferentes grupos e histología que muestra diferentes grados de fibrosis. Tinciones de H-E y tricrómica de Masson.



Gráfica 1. Expresión de IGFBP-1 en el hígado con diferentes grados de fibrosis. Se realizó una ANOVA de una vía para comparar los diferentes grupos pero no se encontraron diferencias significativas.



Gráfica 2. Comparación de los niveles de expresión de IGFBP-1 entre el grupo con 20 dosis de CCl₄ y el grupo con el mismo número de dosis más un mes de recuperación (20 R). Los datos se analizaron mediante una t de student. * p< 0.05

CONCLUSIONES

La expresión de IGFBP-1 en el hígado tiene el potencial de diferenciar las etapas tempranas y moderadas de fibrosis en la rata. En la recuperación de un hígado con fibrosis se disminuye la expresión de IGFBP-1. La expresión y la función de IGFBP-1 pueden estar asociadas tanto a la progresión como a la reversión de la fibrosis inducida por CCl₄.



Semana Nacional de Gastroenterología 2014.

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN AL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINOIDE 1 (IGFBP-1) DURANTE LA FIBROSIS HEPÁTICA EN LA RATA.



O. Sánchez-Jerónimo, I.I. Romero-Bello, A. Ramírez-Mendoza, G. Gutiérrez-Reyes, C. Guzmán. Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad, Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM/Hospital General de México, México. carova@prodigy.net.mx

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP) son principalmente producidas en el hígado. Se ha observado que la IGFBP-1 aumenta significativamente en la sangre de pacientes que presentan una infección crónica por el virus de hepatitis C. Después del daño agudo por administración de tetracloruro de carbono (CCl₄), el patrón de expresión de IGFBP-1 en el hígado de las ratas cambia, lo cual se ha relacionado con la proliferación de hepatocitos y la regeneración hepática. Sin embargo, esta proteína no ha sido estudiada durante un tratamiento crónico con CCl₄, ni ha sido relacionada con el proceso fibrogénico en el hígado.

OBJETIVO

Evaluar la expresión del mRNA de IGFBP-1 en el hígado de ratas con diferente grado de fibrosis inducida por la administración de CCl₄.

MATERIAL Y MÉTODOS



RESULTADOS



Figura 1. Imágenes de hígado de los diferentes grupos e histología que muestra diferentes grados de fibrosis. Tinciones de H-E y tricrómica de Masson.

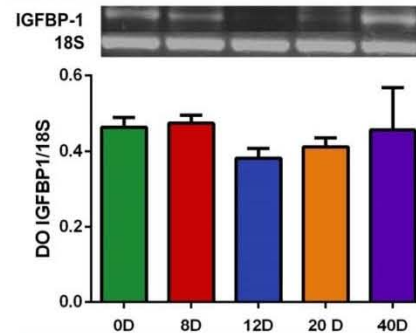


Figura 2. Expresión de IGFBP-1 en el hígado con diferentes grados de fibrosis. Los resultados que se muestran son el promedio ± desvest. Una ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas. n= 8

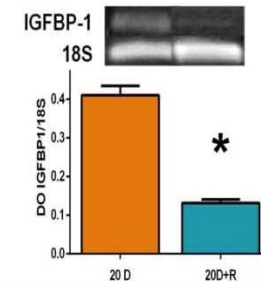


Figura 3. Comparación de los niveles de expresión de IGFBP-1 entre el grupo con 20 dosis de CCl₄ y el grupo con el mismo número de dosis más un mes de recuperación (20 R). Los resultados que se muestran son el promedio ± desvest y se analizaron mediante una t de student. * p< 0.05. n= 8

CONCLUSIONES

La expresión de IGFBP-1 en el hígado tiene el potencial de diferenciar las etapas tempranas y moderadas de fibrosis en la rata. En la recuperación de un hígado con fibrosis disminuye la expresión de IGFBP-1. La expresión y la función de IGFBP-1 pueden estar asociadas tanto a la progresión como a la reversión de la fibrosis inducida por CCl₄.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo fue realizado con el apoyo de Beca L'Oreal-UNESCO-AMC para las Mujeres en la Ciencia y Estimulo Antonio Ariza Cañadilla 2014, Fundación Mexicana para la Salud Hepática, Fundación Mexicana para la Salud.

12. REFERENCIAS

- Abdel-Misih, S. R. Z., & Bloomston, M. (2010). Liver Anatomy. *Surgical Clinics of North America*, 90(4), 643–653. doi:10.1016/j.suc.2010.04.017
- Adams, L. A., Bulsara, M., Rossi, E., DeBoer, B., Speers, D., George, J., Jeffrey, G. P. (2005). Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clinical Chemistry*, 51, 1867–1873. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16055434
- Arai, M., Yokosuka, O., Fukai, K., Imazeki, F., Chiba, T., Sumi, H., ... Seki, N. (2004). Gene expression profiles in liver regeneration with oval cell induction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(2), 370–6. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.057
- Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B., & Varnier, J. a. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 8, 604–17. doi:10.1038/nrc2353
- Baertschiger, R. M., Serre-Beinier, V., Morel, P., Bosco, D., Peyrou, M., Clément, S., Gonelle-Gispert, C. (2009). Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. *PLoS ONE*, 4. doi:10.1371/journal.pone.0006657
- Barbara Haber, Leyla Najj, Drew Cressman, R. T. (1995). Coexpression of Liver-Specific and Growth-Induced Genes in Perinatal and Regenerating Liver : Attainment and Maintenance of the Differentiated State During Rapid Proliferation. *Hepatology*, 22(3), 906–914.
- Batts, K. P., & Ludwig, J. (1995). Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *The American Journal of Surgical Pathology*, 19, 1409–1417. doi:10.1097/00000478-199512000-00007
- Bedossa, P., & Poynard, T. (1996). An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 24, 289–293. doi:10.1002/hep.510240201
- Bischof, P., Meisser, A., & Campana, A. (2000). Mechanisms of endometrial control of trophoblast invasion. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 55, 65–71.
- Calès, P., Oberti, F., Michalak, S., Hubert-Fouchard, I., Rousselet, M. C., Konaté, A., Lunel, F. (2005). A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology*, 42, 1373–1381. doi:10.1002/hep.20935
- Carlson, J. A., Rogers, B. B., Sifers, R. N., Finegold, M. J., Cliff, S. M., Demayo, F. J., Woo, S. L. C. (1989). Accumulation of PiZ α 1-Antitrypsin Causes Liver Damage in Transgenic Mice. *J. Clin. Invest.*, 83(April), 1183–1190.

- Cassiman, D., Libbrecht, L., Desmet, V., Deneff, C., & Roskams, T. (2002). Hepatic stellate cell / myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *Journal of Hepatology*, 36, 200–209.
- Coppock, H. a, White, A., Aplin, J. D., & Westwood, M. (2004). Matrix metalloprotease-3 and -9 proteolyze insulin-like growth factor-binding protein-1. *Biology of Reproduction*, 71(2), 438–43. doi:10.1095/biolreprod.103.023101
- Dai, B., Ruan, B., Wu, J., Wang, J., Shang, R., Sun, W., Dou, K. (2014). Insulin-like growth factor binding protein-1 inhibits cancer cell invasion and is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(9), 5645–5654.
- Degenhardt, T., Matilainen, M., Herzig, K.-H., Dunlop, T. W., & Carlberg, C. (2006). The insulin-like growth factor-binding protein 1 gene is a primary target of peroxisome proliferator-activated receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(51), 39607–19. doi:10.1074/jbc.M605623200
- Dheen, S. T., Rajkumar, K., & Murphy, L. J. (1997). Islet cell proliferation and apoptosis in insulin-like growth factor binding protein-1 in transgenic mice. *The Journal of Endocrinology*, 155(3), 551–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488000>
- Duval, F., Moreno-Cuevas, J. E., González-Garza, M. T., Rodríguez-Montalvo, C., & Cruz-Vega, D. E. (2014). Liver Fibrosis and Protection Mechanisms Action of Medicinal Plants Targeting Apoptosis of Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/373295
- Forns, X., Ampurdanès, S., Llovet, J. M., Aponte, J., Quintó, L., Martínez-Bauer, E., Rodés, J. (2002). Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36, 986–992. doi:10.1053/jhep.2002.36128
- Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological Reviews*, 88, 125–172. doi:10.1152/physrev.00013.2007
- Friedman, S. L. (2010). Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 7, 425–436. doi:10.1038/nrgastro.2010.97
- Friedman, S. L., & Bansal, M. B. (2006). Reversal of hepatic fibrosis - Fact or fantasy? *Hepatology*. doi:10.1002/hep.20974
- Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminars in Liver Disease*.

- Gnainsky, Y., Spira, G., Paizi, M., Bruck, R., Nagler, A., Abu-Amara, S. N., Pines, M. (2004). Halofuginone, an inhibitor of collagen synthesis by rat stellate cells, stimulates insulin-like growth factor binding protein-1 synthesis by hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 40(2), 269–277. doi:10.1016/j.jhep.2003.10.020
- Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., Hickman, J. A. (1999). Cell Damage-induced Conformational Changes of the Pro-Apoptotic Protein Bak In Vivo Precede the Onset of Apoptosis. *The Journal of Cell Biology.*, 144(5), 903–914.
- Guan, H.-P., & Chen, G. (2014). Factors affecting insulin-regulated hepatic gene expression. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 121, 165–215. doi:10.1016/B978-0-12-800101-1.00006-5
- Guzmán, C., Kershenovich, R., Kershenobich, D., & Gutierrez-Reyes, G. (2010). INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN 1 LEVELS IN CHRONIC HEPATITIS C PATIENTS. *Hepatology*, 52(4), 1232A.
- Hehlgans, S., Haase, M., & Cordes, N. (2007). Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. doi:10.1016/j.bbcan.2006.09.001
- Henderson, N. C., & Iredale, J. P. (2007). Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 112, 265–280. doi:10.1042/CS20060242
- Hernandez-Gea, V., & Friedman, S. L. (2011a). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual Review of Pathology*, 6, 425–56. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130246
- Hernandez-Gea, V., & Friedman, S. L. (2011b). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual Review of Pathology*, 6, 425–56. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130246
- Hills, F. a, Elder, M. G., Chard, T., & Sullivan, M. H. F. (2004). Regulation of human villous trophoblast by insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding protein-1. *The Journal of Endocrinology*, 183(3), 487–96. doi:10.1677/joe.1.05867
- Hundhausen, C., Boesch-saadatmandi, C., Matzner, N., Lang, F., Blank, R., Wolffram, S., ... Rimbach, G. (2008). Ochratoxin A Lowers mRNA Levels of Genes Encoding for Key Proteins of Liver Cell Metabolism. *Cancer Genomics and Proteomics*, 332, 319–332.
- Hwang, D. L., Huang, S.-P., Lan, W.-S., & Lee, P. D. . (2003). Elevated insulin, proinsulin and insulin-like growth factor-binding protein-1 in liver disease. *Growth Hormone & IGF Research*, 13(6), 316–321. doi:10.1016/S1096-6374(03)00042-X
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1), 11–25. doi:10.1016/0092-8674(92)90115-S

- Imbert-Bismut, F., Ratziu, V., Pieroni, L., Charlotte, F., Benhamou, Y., & Poynard, T. (2001). Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet*, *357*, 1069–1075. doi:10.1016/S0140-6736(00)04258-6
- Iredale, J. P., Benyon, R. C., Pickering, J., McCullen, M., Northrop, M., Pawley, S., ... Arthur, M. J. (1998). Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *The Journal of Clinical Investigation*, *102*(3), 538–49. doi:10.1172/JCI1018
- Ishak, K., Baptista, a, Bianchi, L., Callea, F., De Groote, J., Gudat, F., ... MacSween, R. N. (1995). Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*, *22*(6), 696–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3755837&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jones, J. I., Gockerman, A. M. Y., Busby, W. H., Wright, G., & Clemmons, D. R. (1993). Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the $\alpha 5 \beta 1$ integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence, *90*(November), 10553–10557.
- Julkunen, M., Koistinen, R., Aalto-Setälä, K., Seppälä, M., Jänne, O. a, & Kontula, K. (1988). Primary structure of human insulin-like growth factor-binding protein/placental protein 12 and tissue-specific expression of its mRNA. *FEBS Letters*, *236*(2), 295–302.
- Kelley, K., Oh, Y., & Gargosky, S. (1996). Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *28*(6), 619–637. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1357272596000052>
- Knittel, T., Mehde, M., Grundmann, A., Saile, B., Scharf, J. G., & Ramadori, G. (2000). Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochemistry and Cell Biology*, *113*, 443–453.
- Koda, M., Matunaga, Y., Kawakami, M., Kishimoto, Y., Suou, T., & Murawaki, Y. (2007). FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *45*, 297–306. doi:10.1002/hep.21520
- Laptenko, O., & Prives, C. (2006). Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death and Differentiation*, *13*(6), 951–61. doi:10.1038/sj.cdd.4401916
- Lee, U. E., & Friedman, S. L. (2011). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, *25*, 195–206. doi:10.1016/j.bpg.2011.02.005
- Leu, J. I., Crissey, M. A., Leu, J. P., Ciliberto, G., & Taub, R. (2001). Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(2), 414–24. doi:10.1128/MCB.21.2.414-424.2001

- Leu, J. I., Crissey, M. A. S., Craig, L. E., & Taub, R. (2003). Impaired Hepatocyte DNA Synthetic Response Posthepatectomy in Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1-Deficient Mice with Defects in C/EBP β and Mitogen-Activated Protein Kinase / Extracellular Signal-Regulated Kinase Regulation, *23*(4), 1251–1259. doi:10.1128/MCB.23.4.1251
- Leu, J. I., Crissey, M. A. S., & Taub, R. (2003). Massive hepatic apoptosis associated with TGF-beta1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein-1-deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *111*(1), 129–139. doi:10.1172/JCI200316712.Introduction
- Leu, J. I., & George, D. L. (2007). Hepatic IGFBP1 is a prosurvival factor that binds to BAK, protects the liver from apoptosis, and antagonizes the proapoptotic actions of p53 at mitochondria. *Genes and Development*, *21*, 3095–3109. doi:10.1101/gad.1567107.define
- Lewitt, M. S., & Baxter, R. C. (1991). At the Cutting Edge Insulin-like growth factor-binding protein-1: a role in glucose counterregulation?, *79*, 47–52.
- Liu, Y., Liu, H., Meyer, C., Li, J., Nadalin, S., Königsrainer, A., ... ten Dijke, P. (2013). Transforming growth factor- β (TGF- β)-mediated connective tissue growth factor (CTGF) expression in hepatic stellate cells requires Stat3 signaling activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(42), 30708–19. doi:10.1074/jbc.M113.478685
- Liu, Y. Y., Rajkumar, K., & Murphy, L. J. (1999). Hepatic regeneration in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *Journal of Hepatology*, *30*(4), 674–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10207810>
- Mallet, V., Gilgenkrantz, H., Serpaggi, J., Verkarre, V., Vallet-Pichard, A., Fontaine, H., & Pol, S. (2008). Brief communication: the relationship of regression of cirrhosis to outcome in chronic hepatitis C. *Annals of Internal Medicine*, *149*, 399–403.
- Mangnall, D., Bird, N. C., & Majeed, A. W. (2003). The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, *23*(2), 124–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654135>
- Marchand, A., Tomkiewicz, C., Magne, L., Barouki, R., & Garlatti, M. (2006). Endoplasmic reticulum stress induction of insulin-like growth factor-binding protein-1 involves ATF4. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(28), 19124–33. doi:10.1074/jbc.M602157200
- McCrudden, R., & Iredale, J. P. (2000). Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Histol Histopathol*, *15*, 1159–1168. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11005241

- Michalopoulos, K. (1990). Liver regeneration : control molecular mechanisms of growth. *FASEB Journal*, 4, 176–187.
- Mohn, K., Melby, A., Tewari, D., & Laz, T. (1991). The gene encoding rat insulinlike growth factor-binding protein 1 is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Molecular and Cellular ...*, 11(3), 1393–1401. Retrieved from <http://mcb.asm.org/content/11/3/1393.short>
- Möller Bredo, R., & Vazquez Odo, N. (2011). Anatomía del Hígado de la Rata Wistar (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Morphology*, 29(1), 76–79. doi:10.4067/S0717-95022011000100012
- Montfort, I., & Pérez-Tamayo, R. (1978). Collagenase in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of the liver. *The American Journal of Pathology*, 92, 411–420.
- Murphy, F. R., Issa, R., Zhou, X., Ratnarajah, S., Nagase, H., Arthur, M. J. P., H. (2002). Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition. *Journal of Biological*, 277, 11069 –11076. doi:10.1074/jbc.M111490200
- Myronovych, A., Murata, S., Chiba, M., Matsuo, R., Ikeda, O., Watanabe, M., Ohkohchi, N. (2008). Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. *Journal of Hepatology*, 49(3), 363–72. doi:10.1016/j.jhep.2008.04.019
- Novo, E., Marra, F., Zamara, E., Valfrè di Bonzo, L., Monitillo, L., Cannito, S., Parola, M. (2006). Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut*, 55, 1174–1182. doi:10.1136/gut.2005.082701
- Novo, E., Valfrè di Bonzo, L., Cannito, S., Colombatto, S., & Parola, M. (2009). Hepatic myofibroblasts: A heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.
- Olaso, E., Ikeda, K., Eng, F. J., Xu, L., Wang, L. H., Lin, H. C., & Friedman, S. L. (2001). DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 108, 1369–1378. doi:10.1172/JCI200112373
- Omenetti, A., Porrello, A., Jung, Y., Yang, L., Popov, Y., Choi, S. S., Diehl, A. M. (2008). Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 3331–3342. doi:10.1172/JCI35875
- Parola, M., Marra, F., & Pinzani, M. (2008). Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Molecular Aspects of Medicine*. doi:10.1016/j.mam.2007.09.002

- Patel, K., Gordon, S. C., Jacobson, I., Hézode, C., Oh, E., Smith, K. M., McHutchison, J. G. (2004). Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Journal of Hepatology*, *41*, 935–942. doi:10.1016/j.jhep.2004.08.008
- Petrides, A. S., & DeFronzo, R. A. (1989). Glucose and insulin metabolism in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, *8*(1), 107–114. doi:10.1016/0168-8278(89)90169-4
- Philippou, A., Maridaki, M., Pneumaticos, S., & Koutsilieris, M. (2014). The Complexity of the IGF1 Gene Splicing , Posttranslational Modification and Bioactivity, 202–214. doi:10.2119/molmed.2014.00011
- Rajaram, S., Baylink, D. J., Mohan, S., Pettis, J. L., & Veterans, M. (1997). Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in Serum and Other Biological Fluids : Regulation and Functions *. *Endocrine Reviews*, *18*(April), 801–831.
- Regev, A., Berho, M., Jeffers, L. J., Milikowski, C., Molina, E. G., Pyrsopoulos, N. T., Schiff, E. R. (2002). Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *The American Journal of Gastroenterology*, *97*, 2614–2618. doi:10.1111/j.1572-0241.2002.06038.x
- Reynaert, H., Thompson, M. G., Thomas, T., & Geerts, A. (2002). Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut*, *50*, 571–581.
- Rosenberg, W. M. C., Voelker, M., Thiel, R., Becka, M., Burt, A., Schuppan, D., Arthur, M. J. P. (2004). Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study. *Gastroenterology*, *127*, 1704–1713. doi:10.1053/j.gastro.2004.08.052
- Rosenfeld, R. O. N. G. (1999a). The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein. *Endocrine Reviews*, *20*(March), 761–787.
- Rosenfeld, R. O. N. G. (1999b). The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein, *20*(6), 761–787.
- Rubin, P., & Casarett, G. W. (1968). Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy. *Cancer*, *22*(4), 767–778. doi:10.1002/1097-0142(196810)22:4<767::AID-CNCR2820220412>3.0.CO;2-7
- Russo, F. P., Alison, M. R., Bigger, B. W., Amofah, E., Florou, A., Amin, F., Forbes, S. J. (2006). The Bone Marrow Functionally Contributes to Liver Fibrosis. *Gastroenterology*, *130*, 1807–1821. doi:10.1053/j.gastro.2006.01.036
- Scharf, J.-G., Dombrowski, F., Novosyadlyy, R., Eisenbach, C., Demori, I., Kübler, B., & Braulke, T. (2004). 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*, 145(7), 3463–72.
doi:10.1210/en.2003-1541

Scheuer, P. J. (1991). Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *Journal of Hepatology*. doi:10.1016/0168-8278(91)90084-O

Schiavon, L. D. L., Narciso-Schiavon, J. L., & de Carvalho-Filho, R. J. (2014). Non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(11), 2854–2866. doi:10.3748/wjg.v20.i11.2854

Schuppan, D., Ruehl, M., Somasundaram, R., & Hahn, E. G. (2001). Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Seminars in Liver Disease*.

Sokolović, A., Sokolović, M., Boers, W., Elferink, R. P. O., & Bosma, P. J. (2010). Insulin-like growth factor binding protein 5 enhances survival of LX2 human hepatic stellate cells. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 3(3), 13.

Sterling, R. K., Lissen, E., Clumeck, N., Sola, R., Correa, M. C., Montaner, J., Nelson, M. (2006). Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(6), 1317–25.
doi:10.1002/hep.21178

Stupack, D. G. (2007). The biology of integrins. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 21, 6–12.

Sureshbabu, A., Okajima, H., Yamanaka, D., Shastri, S., Tonner, E., Rae, C., Flint, D. J. (2009). IGFBP-5 induces epithelial and fibroblast responses consistent with the fibrotic response. *Biochemical Society Transactions*, 37, 882–885. doi:10.1042/BST0370882

Suwanichkul, A., DePaolis, L. A., Lee, P. D., & Powell, D. R. (1993). Identification of a promoter element which participates in cAMP-stimulated expression of human insulin-like growth factor-binding protein-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(13), 9730–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683658>

Troeger, J. S., Mederacke, I., Gwak, G., & Dapito, D. H. (2012). Deactivation of Hepatic Stellate Cells during Liver Fibrosis Resolution in Mice. *Gastroenterology*, 143(4).
doi:10.1053/j.gastro.2012.06.036.Deactivation

Tzanakakis, E. S., Hess, D. J., Sielaff, D., & Hu, W.-S. (2000). Extracorporeal Tissue Engineered Liver-Assist Devices. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 02, 607–632.

Wai, C. T., Greenson, J. K., Fontana, R. J., Kalbfleisch, J. D., Marrero, J. A., Conjeevaram, H. S., & Lok, A. S. F. (2003). A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 38, 518–526.
doi:10.1053/jhep.2003.50346

- Wathes, D. C., Cheng, Z., Fenwick, M. A., Fitzpatrick, R., & Patton, J. (2011). Influence of energy balance on the somatotrophic axis and matrix metalloproteinase expression in the endometrium of the postpartum dairy cow. *Reproduction*, *141*, 269–281. doi:10.1530/REP-10-0177
- Yasuoka, H., Hsu, E., Ruiz, X. D., Steinman, R. a, Choi, A. M. K., & Feghali-Bostwick, C. a. (2009). The fibrotic phenotype induced by IGFBP-5 is regulated by MAPK activation and egr-1-dependent and -independent mechanisms. *The American Journal of Pathology*, *175*(2), 605–615. doi:10.2353/ajpath.2009.080991
- Yasuoka, H., Jukic, D. M., Zhou, Z., Choi, A. M. K., & Feghali-Bostwick, C. A. (2006). Insulin-like growth factor binding protein 5 induces skin fibrosis: A novel murine model for dermal fibrosis. *Arthritis and Rheumatism*, *54*, 3001–3010. doi:10.1002/art.22084
- Yasuoka, H., Yamaguchi, Y., & Feghali-Bostwick, C. A. (2009). The pro-fibrotic factor IGFBP-5 induces lung fibroblast and mononuclear cell migration. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *41*, 179–188. doi:10.1165/rcmb.2008-0211OC
- Younossi, Z. M., Gorreta, F., Ong, J. P., Schlauch, K., Del Giacco, L., Elariny, H., Chandhoke, V. (2005). Hepatic gene expression in patients with obesity-related non-alcoholic steatohepatitis. *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, *25*(4), 760–71. doi:10.1111/j.1478-3231.2005.01117.x