



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE
TEJIDO CONECTIVO (CTGF) EN EL CURSO DE
LA FIBROSIS HEPÁTICA EN UN MODELO
MURINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

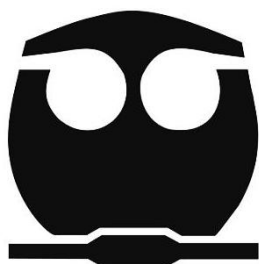
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

THALÍA AMÉRICA ARÉVALO SÁNCHEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA

CDMX, 2016





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. Guillermo Celestino Cardoso Saldaña**

Sitio donde se desarrolló el trabajo:

Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga
Unidad de Medicina Experimental
Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad, HIPAM

Asesor del Tema:

Dra. Carolina Guzmán Arriaga

Sustentante:

Thalía América Arévalo Sánchez

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 El hígado.	3
2.2 La fibrosis hepática.	5
2.2.1 Estadificación de la fibrosis.	7
2.3 Resolución de la fibrosis hepática y regeneración hepática.	8
2.4 El Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF).....	10
2.4.1 <i>Generalidades</i>	10
2.4.2 <i>Proteína</i>	11
2.4.3 <i>Señalización</i>	12
2.4.4 <i>Funciones</i>	13
2.4.5 <i>CTGF en fibrosis</i>	14
2.4.6 <i>CTGF en la regeneración</i>	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
4. HIPÓTESIS.	15
5. OBJETIVOS.....	16
5.1 Objetivos particulares.....	16
6. METODOLOGÍA.	16
6.1 Modelo murino.	16
6.2 Inducción de fibrosis hepática por CCl ₄	16
6.3 Histología.	17
6.4 Extracción de RNA total.	18
6.5 Cuantificación de RNA total.	18
6.6 Diseño de oligonucleótidos de CTGF y 18S.	18
6.7 RT.	19
6.8 PCR.....	19
6.9 Geles de agarosa.	20
6.10 Densitometría óptica.	21
6.11 Extracción de proteínas.	21
6.12 Cuantificación de proteínas totales.	21

6.13	Preparación del suero.....	22
6.14	Cuantificación de CTGF e IL-6.	22
6.15	Análisis estadístico.....	23
7.	RESULTADOS.....	25
7.1	Inducción de la fibrosis.....	25
7.2	Clasificación histológica de la fibrosis hepática.....	26
7.3	Expresión de CTGF en el curso de la fibrosis hepática.	30
7.4	Expresión de IL-6 en el curso de la fibrosis hepática.....	31
7.5	Modelo de reversión de la fibrosis.	33
7.6	Clasificación histológica de la resolución de la fibrosis hepática.....	34
7.7	Expresión de CTGF en la reversión de la fibrosis.	37
7.8	Expresión de IL-6 en la reversión de la fibrosis.....	39
8.	DISCUSIÓN.	40
9.	CONCLUSIÓN.....	43
10.	REFERENCIAS.....	44

1. RESUMEN

El Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF) es una proteína que tiene actividad en la formación de tejidos y hueso en la etapa fetal y tiene papel profibrogénico postnatal ya que se ha encontrado aumentada en el suero de pacientes que cursan con comportamiento en el espectro de la fibrosis hepática, por lo que el objetivo de este trabajo es determinar la expresión de CTGF a nivel génico y a nivel de proteína en hígado y suero. Para cumplir este objetivo se trabajó con un modelo animal de fibrosis hepática con ratas macho de la cepa Wistar de 3 meses de edad con peso aproximado de 250 ± 20 g los que les fueron inducidos diferentes grados de fibrosis mediante la administración intraperitoneal de un agente hepatotóxico (CCl_4) a diferentes dosis: 8, 12, 20 y 40 dosis, que corresponden a diferentes etapas: F1, F2, F3 y F4, según escala METAVIR, además de tener un grupo control (F0) que no tuvo ninguna administración. Adicionalmente se generó un grupo de reversión de la fibrosis hepática, al cual después de inducirle fibrosis severa, administrándole 20 dosis de CCl_4 , tuvo un mes de recuperación (F3+R). Al final de cada esquema de administración se colectaron el hígado y la sangre total.

Para confirmar el estadio de la fibrosis y observar la microestructura del hígado se realizaron tinciones histológicas (Rojo de Sirio, Tricrómica de Masson y Hematoxilina y Eosina). Se realizó RT-PCR para estudiar la expresión de CTGF, el cual se normalizó con el gen constitutivo 18S. La cantidad de proteína en el hígado y el suero se cuantificó mediante ELISA para CTGF. Los datos se presentan como $\text{Media} \pm \text{EE}$, se analizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey, para comparar dos grupos se empleó t-student, $p < 0.05$ se consideró como significativo.

La expresión de CTGF aumentó desde la fibrosis intermedia (F2) y sigue aumentando hasta ser mayor en la etapa más severa, la cirrosis (F4) al ser comparado con un hígado sano (F0), además la expresión fue significativamente mayor en F4 a compararlo con la fibrosis inicial (F1). Sin embargo, la expresión a nivel proteico de CTGF en el hígado fue de manera contraria, disminuyendo la concentración a partir de que surge la fibrosis y manteniéndose disminuida hasta la cirrosis (F1-F4) a comparación con un hígado sano. CTGF en el suero no varió en ningún grupo.

En el modelo de reversión, la expresión de CTGF en el hígado en proceso de resolución de la fibrosis (F3+R) regresó a niveles del hígado sano, siendo significativamente menor en comparación con el grupo que tenía las mismas dosis de CCl₄ (F3); la proteína de CTGF en el hígado presentó el mismo comportamiento contrario, y se encontró aumentada a comparación con F3, pero sin llegar a restablecer los niveles de F0. E igual que el modelo de fibrosis, CTGF sérico no varió en los diferentes grupos de este modelo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El hígado.

El hígado es el órgano interno más grande, comprende aproximadamente del 2 al 3% del peso total del cuerpo humano [1], cumple un papel clave las vías metabólicas fundamentales y en funciones de síntesis; se halla estratégicamente situado para desempeñar diversas funciones metabólicas, ya que es el primer órgano en recibir el suministro de sangre enriquecida con nutrientes provenientes del tubo digestivo a través de la vena porta [2].

El parénquima hepático consiste en células parenquimales: células epiteliales y **hepatocitos** (células más abundantes) y no parenquimales asociadas con el sinusoide: células endoteliales, células de Kupffer, linfocitos Natural Killer (NK) residentes, células dendríticas y las células estelares hepáticas (HSCs, Hepatic Stellate Cells) [3, 4]; que en su conjunto desempeñan las actividades del hígado.

El hígado tiene muchas funciones que implican aspectos vasculares, metabólicos y secretores (**Figura 1**). Las funciones básicas del hígado incluyen:

- Regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, los lípidos y de proteínas (produce albúmina, fibrinógeno, inmunoglobulinas, proteínas de transporte, triglicéridos, lipoproteínas y otras importantes moléculas).
- Regulación de la producción y excreción de colesterol.
- Producción y secreción de ácidos biliares. La bilirrubina y otros productos de descomposición de la hemoglobina se secretan en la bilis y se eliminan del organismo en las heces.
- Funciones endócrinas. Los hepatocitos producen y secretan hormonas al torrente sanguíneo, incluido el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento tipo insulínico 1 (IGF-1), el angiotensinógeno y algunas citocinas. Convierte la tiroxina (T4) en triyodotironina (T3) y participa en la activación de la vitamina D.

- Detoxificación: el hígado contiene macrófagos residentes (**células de Kupffer**), que a medida que la sangre pasa por el hígado, los eritrocitos viejos y lesionados son fagocitados. Las hormonas, los fármacos y otras sustancias químicas son metabolizadas por los hepatocitos.
- Almacenamiento de vitaminas y de hierro. El hígado almacena varios elementos básicos para las funciones normales del organismo: Vitamina A que es almacenada en las **HSCs**, B12, ácido fólico, hierro, etc [5].

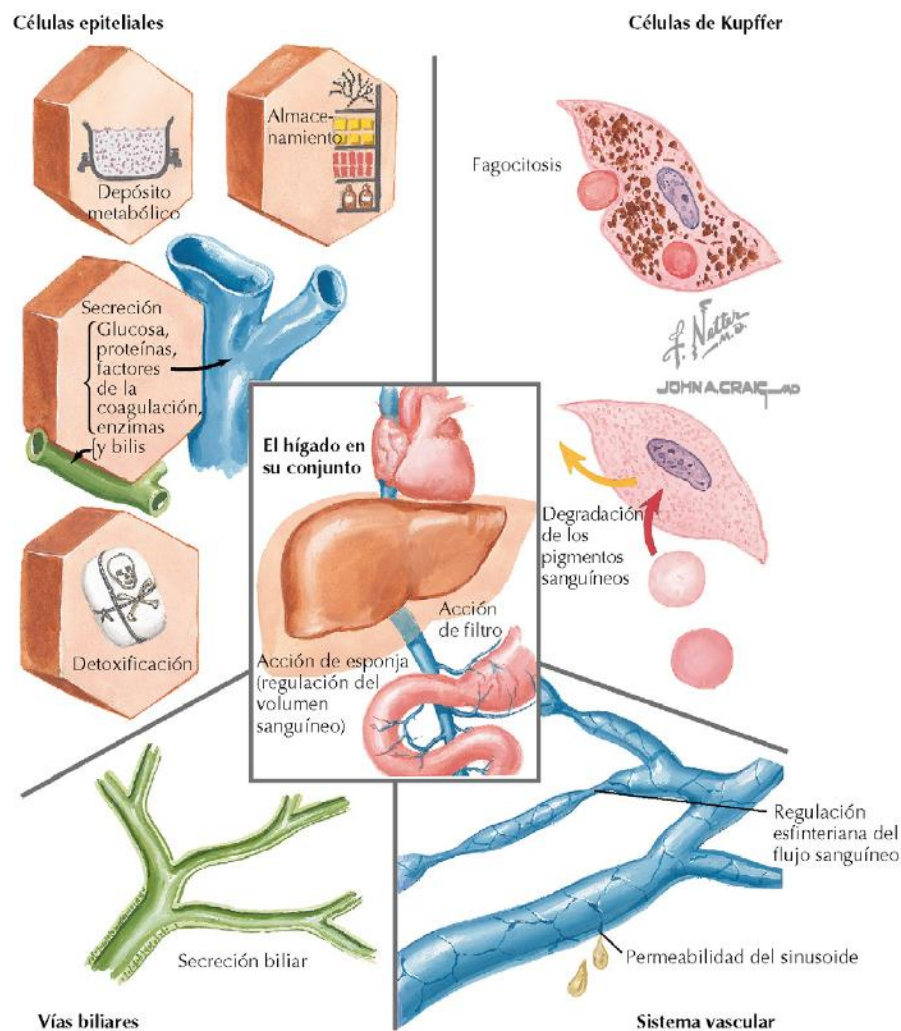


Figura 1. Funciones del hígado. Numerosas son las funciones que desempeña el hígado, en las que se encuentran, almacenamiento, secreción, degradación y detoxificación. (Mulroney, 2001)[6]

2.2 La fibrosis hepática.

Se le llama fibrosis hepática a la acumulación de componentes de la matriz extracelular (ej. colágena y fibronectina) en el hígado en respuesta a un daño hepático, que si es excesiva puede progresar y convertirse en cirrosis hepática. La cirrosis hepática es una enfermedad crónica con diferentes etiologías, causada por múltiples lesiones de largo plazo para el hígado. Mundialmente, la cirrosis hepática representa la 14^a causa de mortalidad, pero en EUA ocupa el lugar número 12 y el puesto 4 en México y en Europa Central [7]. El inicio, progresión y evolución clínica de la cirrosis hepática entre la población mexicana se ven influenciados por factores genéticos y ambientales específicos, entre ellos se encuentran un genoma mezcla de ascendencia europea, amerindia y africana; la puntuación más alta de consumo de alcohol; infecciones virales; una dieta que afecta directamente al hígado y alta prevalencia de obesidad [8]. En general, las etiologías de la cirrosis hepática son el abuso del alcohol, seguido por infecciones virales (virus de hepatitis C y B), y el hígado graso no alcohólico (Non Alcoholic Fatty Liver Disease NAFLD), que incluye la esteatohepatitis no alcohólica (Non Alcoholic Steatohepatitis NASH) [9]. Otras causas, aunque menos frecuentes, son la hepatitis autoinmunes, colestasis obstructiva, hemocromatosis hereditaria, enfermedad de Wilson y toxicidad por fármacos. Independientemente de la etiología la enfermedad hepática crónica desencadena fibrosis hepática, que es un mecanismo de reparación del hígado a un daño que conduce a la acumulación progresiva de componentes de la matriz extracelular (ECM), una forma de intentar limitar el daño generado; sin embargo, si esta continúa, la fibrogénesis persistirá y provocará la degeneración y necrosis de hepatocitos y el parénquima hepático será sustituido por tejido cicatrizal, ocasionando una pérdida de función [10]; este daño hepático desencadenará hipertensión portal y distorsión vascular intrahepática la cual tendrá varias complicaciones, por ejemplo, presencia de ascitis (acumulación de líquido en el peritoneo), sangrado esofágico, ictericia y

encefalopatía. Esta acumulación de ECM, es generada en el hígado principalmente por las HSCs [4].

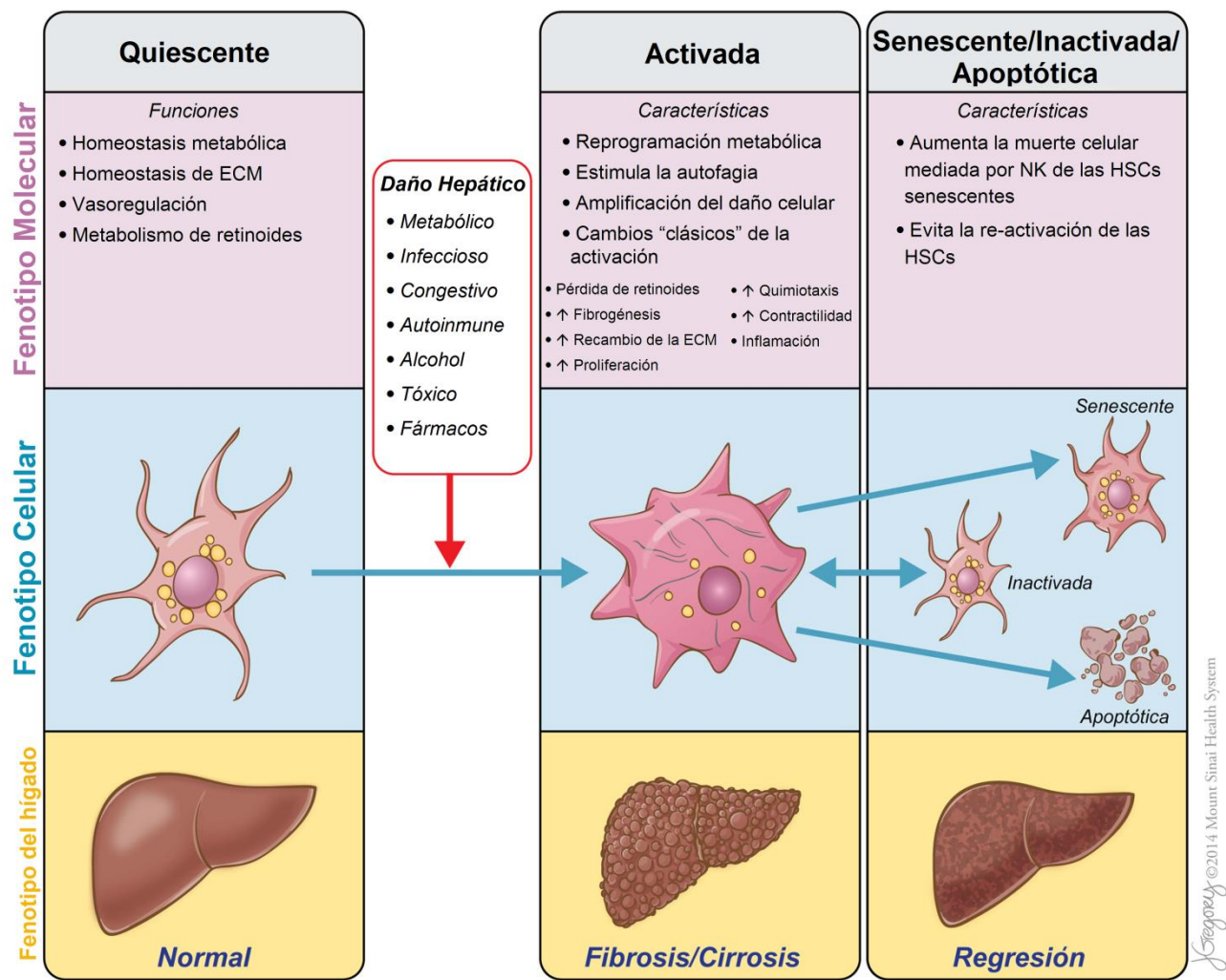


Figura 2. Funciones, características y fenotipos de las células estelares hepáticas (HSC), en el hígado normal y enfermo. Las HSC quiescentes son fundamentales para el funcionamiento metabólico normal del hígado. La lesión hepática provoca la transdiferenciación de un estado quiescente a su fenotipo activado, lo que lleva a una reprogramación metabólica. A través de estos cambios se impulsa la respuesta fibrótica a la lesión y el desarrollo de la cirrosis. ECM, extracellular matrix; HSCs, hepatic stellate cells; NK, natural killer. (Modificado de Lee, 2015) [11].

Las HSCs, consideradas de origen mesenquimal, residen en el espacio de Disse entre hepatocitos y células endoteliales del sinusoides en el hígado [12], comprenden cerca del 5-8% del total de células hepáticas y 1% del total de la

masa del hígado, estas células almacenan el 90-95% de los retinoides (vitamina A y sus metabolitos) en su citoplasma en forma de vacuolas. Estos retinoides regulan diversas actividades celulares, como son la proliferación, diferenciación, morfogénesis y tumorigénesis.

En condiciones patológicas como la fibrosis hepática, las HSC se “activan”, lo que provoca que pierdan sus retinoides, aumentando su proliferación y la síntesis y secreción de componentes de la ECM como colágena, proteoglicanos y glicoproteínas; la morfología de las HSCs cambia, de una forma estrellada a una de tipo fibroblasto o miofibroblasto [3], aumentando su contractilidad y su secreción de citocinas (como el Factor de Crecimiento Transformante, TGF- β) generando quimioatracción de células inflamatorias [8] (**Figura 2**).

2.2.1 Estadificación de la fibrosis.

La evaluación de la fibrosis hepática se ha realizado durante mucho tiempo mediante el análisis histológico de una muestra de hígado. La biopsia hepática se ha considerado como el estándar de oro para la evaluación de la fibrosis hepática [13]. Sin embargo, la biopsia hepática es un método invasivo que involucra dolor y puede resultar en complicaciones, aunado a esto existen varios errores, de muestreo principalmente que llega a ser del 30-50%; otro error es la variación intra- e inter-observador [14].

Se han desarrollado diferentes escalas para clasificar la severidad de la fibrosis. La escala METAVIR es uno de los principales sistemas de clasificación y más usados en la evaluación de la patología hepática (**Figura 3**) [15].

A pesar de que se proponen biomarcadores no invasivos, en la actualidad no existe ninguno capaz de reemplazar a la biopsia hepática [16].

Escala METAVIR

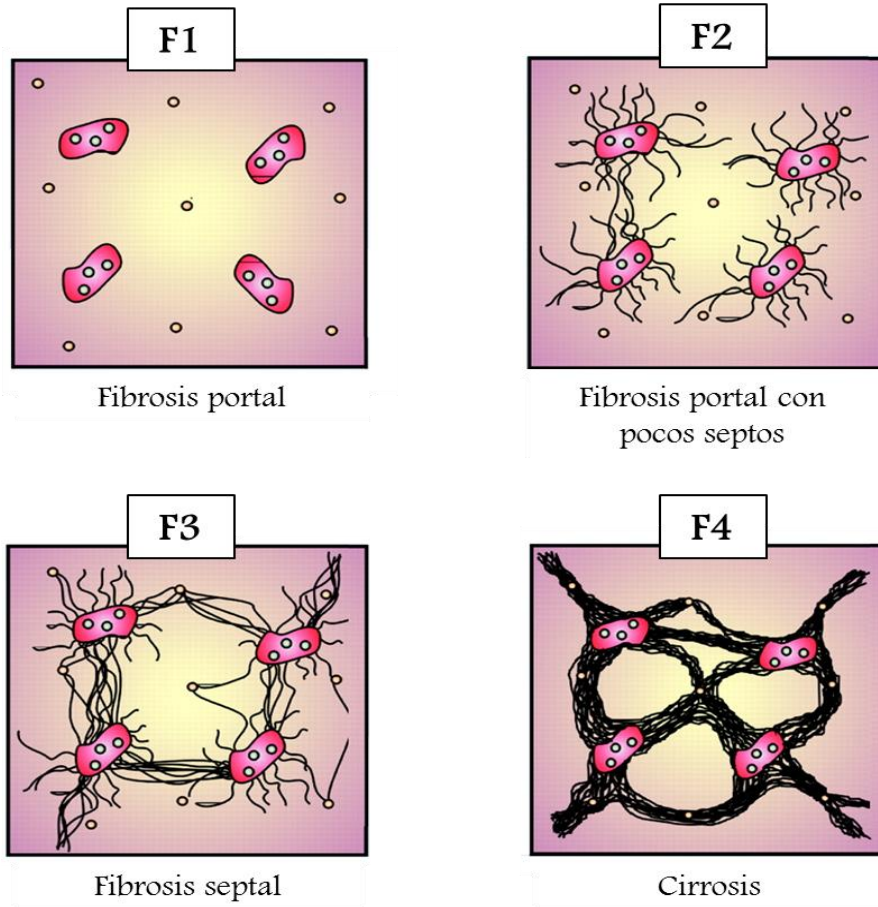


Figura 3. Representación de los estadios de la fibrosis en escala METAVIR. Conforme aumenta la severidad de la enfermedad, aumentan las fibras de colágena, hasta desencadenar una cirrosis en donde es característico los nódulos de regeneración. (Modificado de Bedossa, 1996) [15]

2.3 Resolución de la fibrosis hepática y regeneración hepática.

Está bien establecido que el evento central de la fibrosis es la activación y proliferación de las HSCs, esta activación desencadenará procesos de necrosis e inflamación hepática generando daño a los hepatocitos y comprometiendo sus funciones [17]. La inhibición de la activación de estas HSCs ha sido propuesta como estrategia para el tratamiento de la fibrosis y así disminuir la producción de componentes de la ECM. Varios estudios han demostrado que disminuyendo

tanto en cantidad como en activación a las HSCs existirá una reversión de la fibrosis [11,18]. Varios mecanismos se han identificado que contribuyen a la resolución de la fibrosis como la apoptosis, respuesta inmune y mecanismos de senescencia los cuales directamente tienen como objetivo reducir la activación de las HSCs [19].

No sólo es necesaria la disminución de la activación de las HSCs, sino también es requerido que los hepatocitos dañados sean sustituidos por nuevos hepatocitos capaces de cumplir sus funciones metabólicas [20], El hígado tiene una gran capacidad de regenerarse, y esto lo logrará mediante dos vías: la proliferación de hepatocitos y las reacciones ductulares [21].

La división celular es poco común en el hígado sano, sin embargo, en respuesta al daño, además de la fibrosis el hígado reemplaza células en estrés o que no cumplen sus funciones por células nuevas capaces de cubrir la demanda metabólica [20, 22]. La **proliferación de hepatocitos** es la primera vía de regeneración hepática en respuesta a la necrosis o la apoptosis por pérdida masiva de masa o por daño inducido por hepatotoxinas como el CCl₄. La otra vía de regeneración ocurre cuando el daño es crónico lo que genera que la proliferación de hepatocitos disminuya y las células progenitoras hepáticas (llamadas así en humanos) o células ovals (en murinos) que residen en el hígado se diferencien ya sea a hepatocitos o a colangiocitos, a lo que se le llama **reacciones ductulares** [20]. Estas reacciones ductulares empiezan formando unos ductos pequeños cerca de vasos sanguíneos, particularmente en los espacios portales donde las células ovals se especializan para luego migrar a otras zonas del tejido como células diferenciadas [21]. La **interleucina 6 (IL-6)**, es una citocina proinflamatoria secretada principalmente por macrófagos. En el hígado en proceso de regeneración esta citocina es crucial para la proliferación y diferenciación de células ovals en ratones [23]; hay varios estudios que respaldan que IL-6 es necesaria para promover las reacciones ductulares y la regeneración hepática [24].

2.4 El Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF).

2.4.1 Generalidades.

En 1991 se identificó una nueva proteína de 38 kDa secretada por células endoteliales del cordón umbilical que era un principal atrayente y tenía una función relacionada con el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), pero que no era un producto de esta proteína. A este nuevo péptido se le nombró **Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (Connective Tissue Growth Factor, CTGF)** [25], se ha encontrado mRNA expresado en altos niveles en el bazo, ovarios, tracto gastrointestinal, próstata, corazón y testículos, pero es casi ausente en muestras de hígado normal [26]. Aunque CTGF se localiza en el citoplasma, la gran mayoría es secretado cumpliendo funciones en el espacio extracelular. También es detectable en plasma, suero [27, 28] y en orina [29]. Las plaquetas retienen el CTGF que se libera durante procesos de coagulación, por lo que hay un aumento local de CTGF en el sitio de lesión como se puede observar en la aterosclerosis [30].

CTGF, también es conocido como CCN2, proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide 8 (IGFBP-8/IGFBP-rP3), Fisp 12, proteína hipertrófica específica de condrocitos 24 (Hcs24), factor de crecimiento de unión a heparina – (HBGF)-0.8 [31] y como ecogenina. CTGF pertenece a una familia de proteínas CCN (**C**yr61-**C**TGF-**N**ov) las cuales se caracterizan en ser ricas en cisteína [32-34], los miembros de esta familia poseen un péptido señal en la región NH-2 terminal y cuatro dominios conservados [25, 32, 35].

- Dominio de unión al factor de crecimiento insulinoide IGF [36, 37]
- Dominio factor von Willebrand tipo C [38]
- Dominio trombospondina-1 [39]
- Dominio de dimerización en la región C-terminal, responsable de su interacción con fibronectina [40].

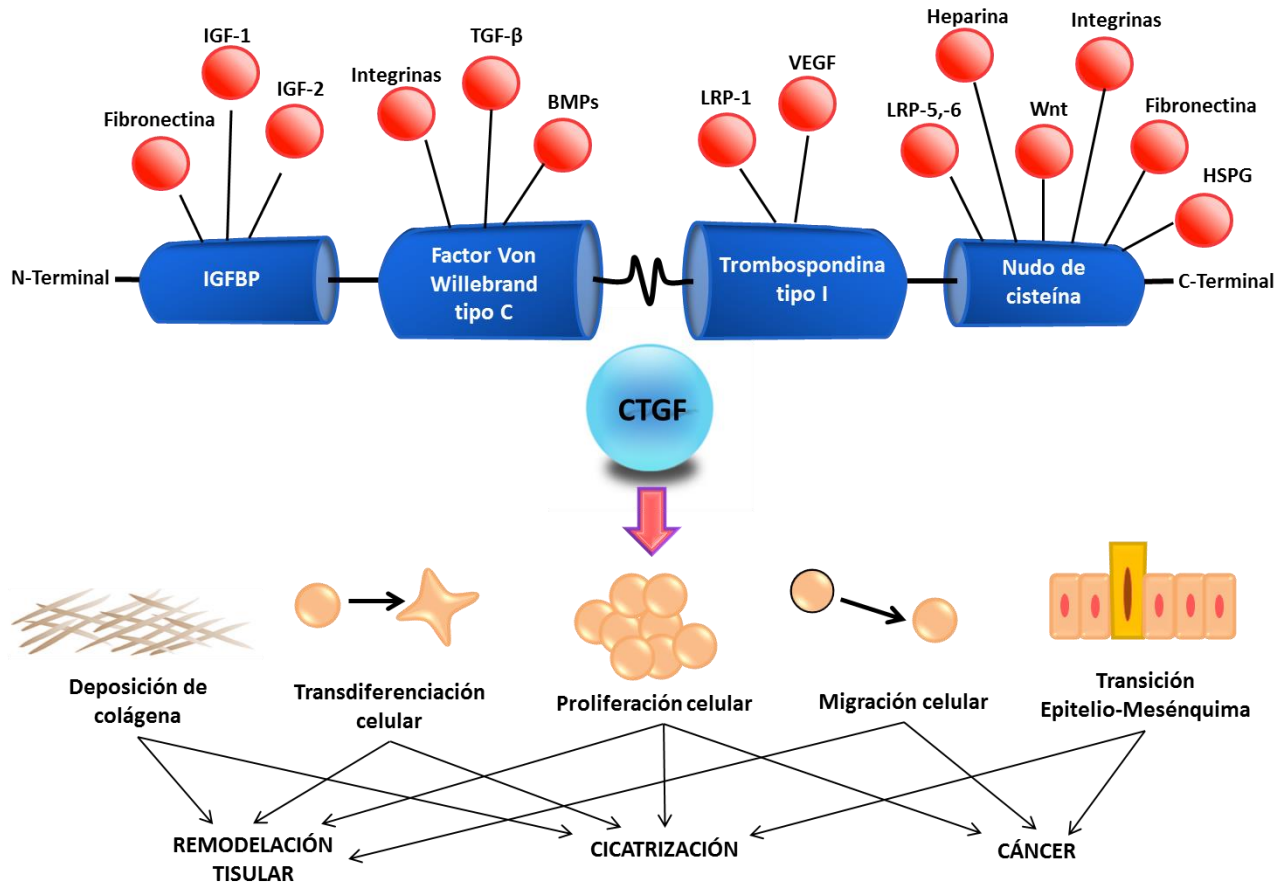


Figura 4. Estructura y funciones del Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo, CTGF. Los diferentes módulos presentes en esta proteína responden con sus interacciones con una gran variedad de moléculas provocando diferentes respuestas que culminan ya sea en una remodelación tisular, la cicatrización o en cáncer. *IGF*, Factor de Crecimiento Insulinoide; *TGF-β*, Factor de Crecimiento Transformante β; *BMP* Proteína Morfogénica de Hueso; *LRP*, Proteína relacionada al receptor de LDL; *VEGF*, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular; *HSPG*, proteoglicano heparan sulfato.

2.4.2 Proteína.

La estructura multimodular de CTGF sugiere que su efecto puede depender de sus interacciones con otras proteínas y glucosaminoglicanos (**Figura 4**). Esto puede ser a través de la señalización de IGF, por su unión reportada con IGF-I e IGF-II [26], que también puede ser por unión a diversas integrinas ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 6$) o su unión a un receptor específico de CTGF (todavía no encontrado) [41].

2.4.3 Señalización.

El modo de acción de CTGF todavía no está bien establecido, ya que por su estructura multimodular, la función dependerá de sus interacciones con otras proteínas (**Figura 5**), se conoce que este factor de crecimiento se internaliza de la superficie celular en los endosomas y se acumula en un organelo junto al núcleo para que se transloque al citoplasma, donde es fosforilado por la proteína cinasa C; CTGF fosforilado, puede ejercer un efecto en el citoplasma, pero translocándose al núcleo puede afectar directamente a la transcripción [42]. CTGF contiene una secuencia de localización nuclear (residuos 149-155) en el módulo de von Willebrand que pudiera dirigir el factor de crecimiento al núcleo. CTGF actúa a través de ambos receptores (de superficie e intracelular). En su unión a la membrana celular activa varias cascadas de señalización [43]. CTGF se endocita después de la unión al receptor de membrana, se puede degradar por lisosomas o almacenar en un organelo juxtannuclear. El mecanismo de esta translocación todavía no está claro, pero se requiere de la vía PI3K. Se sigue estudiando a CTGF en su papel como posible factor de transcripción translocándose al núcleo y su actividad como una proteína fosforilada [42].

La regulación de la expresión de CTGF depende del tipo celular, existen factores y moléculas implicadas en esta regulación, por ejemplo, el microambiente con alta concentración de glucosa e insulina favorece la sobreexpresión de CTGF [44], también se ha demostrado que TGF- β es una molécula que regula a este factor de crecimiento, se ha encontrado un elemento de respuesta a Smad en el promotor de CTGF para su estímulo por TGF- β [41]. Otros factores que aumentarían la expresión de CTGF son: Angiotensina II (AngII), Proteína Morfogénica de Hueso (BMP), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), IGF, Factor de Estimulación de Colonias de Macrófagos (GM-CSF), IL-4, concentraciones altas de glucosa, hipoxia, estrés mecánico y estrés oxidativo. Por su parte el Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α , IL-1b, Adenosín Monofosfato

cíclico (AMPC) y el Receptor de Proliferador de Peroxisoma Activado (PPAR)-y inhiben la expresión de CTGF inducida por TGF-β y AngII [45-48].

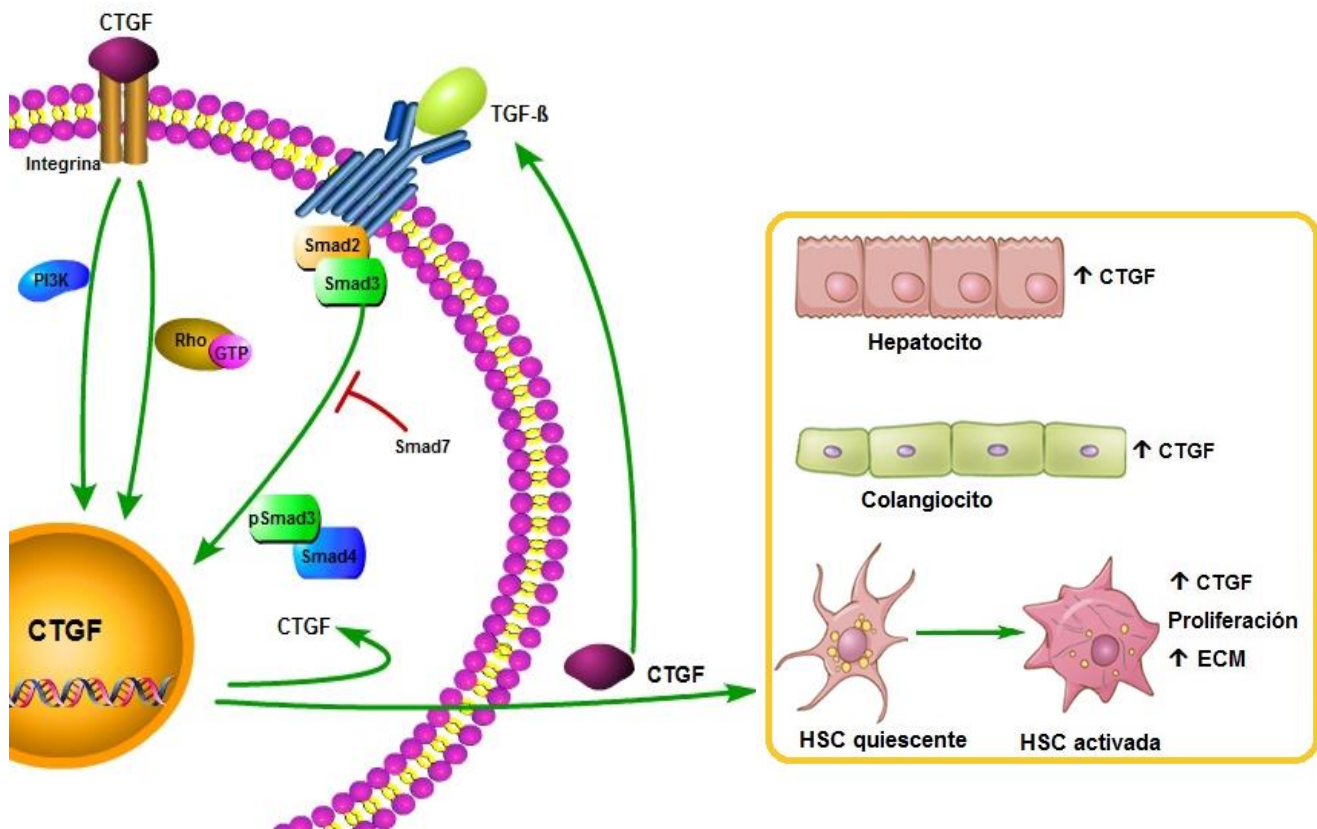


Figura 5. Mecanismo de acción de CTGF durante la fibrosis hepática. La capacidad de CTGF de internalizarse es dependiente de diversas integrinas, ya dentro de la célula es almacenada cerca del núcleo y se transloca al citoplasma, donde es fosforilada. TGF-β, la citocina fibrogénica maestra, puede inducir la expresión de CTGF que a su vez puede potenciar la acción de esta citocina. CTGF se produce en hepatocitos, HSC y en colangiocitos y puede generar diversas respuestas en diferentes tipos celulares en el hígado. *CTGF*, Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo; *TGF-β*, Factor de Crecimiento Transformante β; *HSC* Célula Estelar Hepática; *ECM* Matriz Extracelular.

2.4.4 Funciones.

CTGF tiene un papel crucial durante la condrogénesis y la angiogénesis y la esqueletogénesis y por lo tanto es clave en el desarrollo embrionario, como se puede evidenciar en ratones que carecen del gen de CTGF (CTGF^{-/-}), mueren poco después de nacer debido a defectos en el sistema óseo [49, 50], y los

fibroblastos derivados de estos ratones tienen menor expresión de los genes que se relacionan con la adhesión, la inflamación y la angiogénesis [51].

Se ha descrito que CTGF tiene actividades biológicas similares a PDGF [25], y funciones como síntesis de componentes de la ECM [52], modulación de TGF- β , síntesis de DNA, proliferación celular, quimiotaxis [53], migración celular [54], apoptosis, diferenciación y transdiferenciación celular, y adhesión en fibroblastos [32].

En condiciones patológicas se ha encontrado sobreexpresado en lesiones fibróticas, fibrogénesis, en cicatrización, en la angiogénesis y en la transición epitelio-mesenquimal [55]. Evidenciando que CTGF es un regulador central de la ECM en cartílago y hueso además de ser importante en la formación de capilares en el desarrollo embrionario y tiene una distribución muy extendida en los órganos adultos [32].

2.4.5 CTGF en fibrosis.

CTGF se ha visto implicado en la fibrosis de varios órganos como es el caso de riñón, piel y pulmón; y se ha documentado su sobreexpresión en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática [56].

Como hemos visto, en el hígado hay varias fuentes de CTGF (HSCs, hepatocitos y colangiocitos), siendo las HSCs las que producen CTGF de forma paracrina y autocrina, a través de su interacción con otras moléculas [57], CTGF puede promover la proliferación, migración, adhesión y producción de ECM de las HSC activadas, promoviendo vías profibrogénicas en el hígado [58]. Es bien conocido que CTGF actúa río abajo de TGF- β en HSCs, bloqueando a CTGF, inhibe la activación y proliferación de las HSCs y disminuyendo la colágena tipo I [57].

En pacientes con hepatitis B, CTGF se encontró elevado en sueros de pacientes con una fibrosis avanzada, atribuyéndole un papel como probable marcador de fibrosis [59].

Independiente de la etiología de la fibrosis hepática, tanto en pacientes (alcohol, atresia biliar, hepatitis B) como modelos murinos se ha demostrado un aumento de CTGF a comparación de controles [60, 61].

2.4.6 CTGF en la regeneración.

Cuando el hígado cursa procesos de regeneración hepática, como lo son las reacciones ductulares, el CTGF es capaz de unirse a integrinas de superficie de células ovas, y con ello promueven su diferenciación y proliferación [62]. En los nichos de proliferación de estas células ovas se encuentra sobreexpresado CTGF en comparación con el tejido adyacente [62]. En estudios *in vitro*, la sobreexpresión o el CTGF exógeno favorecen la diferenciación de células progenitoras hepáticas a hepatocitos [63, 64]. En modelos *in vivo* donde se induce fibrosis de origen biliar, el CTGF es capaz de diferenciar células ovas en colangiocitos [62]. Siendo que el CTGF es necesario para promover las reacciones ductulares y regenerar tejido hepático [63].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF) es una proteína profibrogénica, la cual se ha relacionado con la generación de fibrosis en el hígado; esta proteína se ha vinculado con la diferenciación de hepatocitos a partir de células progenitoras mediante la inducción de reacciones ductulares. Debido a estas características, este trabajo propone la participación de CTGF con un papel fundamental en la generación y progresión de la fibrosis hepática y en la reversión de la misma.

4. HIPÓTESIS.

La expresión y el contenido en el hígado y en suero de CTGF aumentarán conforme avanza la gravedad de la fibrosis hepática. Además que CTGF también

se encontrará aumentado séricamente y en el tejido hepático cuando se encuentre en un proceso de reversión de la fibrosis.

5. OBJETIVOS.

Estudiar la expresión a nivel de mRNA y proteína de CTGF durante el desarrollo de la fibrosis hepática inducida por CCl₄ en un modelo murino y durante el proceso de reversión de la fibrosis.

5.1 Objetivos particulares.

- Estudiar la expresión génica de CTGF en el hígado durante el espectro de la fibrosis hepática y en la reversión.
- Cuantificar en el tejido hepático CTGF durante el desarrollo y la reversión de la fibrosis hepática.
- Determinar a CTGF sérico en la fibrosis hepática y su reversión.
- Cuantificar a IL-6 como marcador de generación de reacciones ductulares.

6. METODOLOGÍA.

6.1 Modelo murino.

36 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) con peso de 250±20 g y de 3 meses de edad fueron mantenidos en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM. 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.

6.2 Inducción de fibrosis hepática por CCl₄.

Para el desarrollo del modelo de fibrosis hepática, se administraron por vía intraperitoneal, 250 µL de una solución de CCl₄ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) 33% v/v en aceite de oliva, dos veces por semana como se muestra en la

Tabla 1. Los grupos fueron nombrados de acuerdo a la escala METAVIR con base en la fibrosis generada.

Grupo	Descripción	No. de administraciones de CCl₄	Tiempo de recuperación (semanas)
F0	Control, sin daño hepático	0	-
F1	Fibrosis portal	8	-
F2	Fibrosis portal	12	-
F3	Fibrosis septal	20	-
F4	Cirrosis	40	-
F3+R	Reversión	20	4

Tabla 1. Esquema de administración de CCl₄.

Al término del esquema anterior, los animales se eutanizaron tres días después de la última dosis utilizando una guillotina. Se recolectaron muestras del lóbulo izquierdo del hígado, 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; Na₂HPO₄ 8.1 mM; KH₂PO₄ 1.5 mM, pH 7.4) para su análisis histológico; además se colectó sangre total de la cual se separó el suero mediante centrifugación (3000 rpm, 10 minutos) y se almacenó a -70°C.

6.3 Histología.

Para observar la microestructura del hígado, la presencia de las reacciones ductulares y la etapa de fibrosis (según escala METAVIR, Figura 3), se realizaron tinciones histológicas con el hígado que se conservó en formaldehído al 37%, se incluyó en parafina y se realizaron cortes seriados de 5 µm. Los cortes histológicos se tiñeron con 3 diferentes técnicas: con hematoxilina y eosina (H&E), con tinción tricrómica de Masson y con rojo de Sirio; estas dos últimas

para evidenciar la presencia de fibras de colágena. Se observaron y se fotodocumentaron con el microscopio NIKON MICROPHOT-FXA con la cámara digital NIKON DXM1200F y es software *ACT-1* de NIKON a los aumentos de 80X, 200X y 400X con técnicas de iluminación de luz polarizada y de campo claro.

6.4 Extracción de RNA total.

Del tejido hepático obtenido se homogenizó usando un Polytron PT 1300D (Kinematica AG) con 1 mL del reactivo TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se le agregaron 200 µL de cloroformo y se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C, después de obtener el sobrenadante, se agregaron 500 µL de alcohol isopropílico, se almacenó una noche a -20°C para precipitar el RNA total y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el botón obtenido se lavó con 1 mL de etanol 75% v/v en agua libre de RNAsas, se centrifugó 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 -70 °C.

6.5 Cuantificación de RNA total.

Se realizaron diluciones 1:100 de RNA total en agua con dietilpirocarbonato (Sigma, St Louis MO, USA) para cada muestra y se leyeron en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, modelo: DU-800) a 260 y 280 nm. En caso de ser necesario, la muestra se diluía 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 alícuotas de cada muestra con una concentración de RNA total de 10µg/µL.

6.6 Diseño de oligonucleótidos de CTGF y 18S.

Para el diseño de los oligonucleótidos a utilizar en la amplificación de los genes de interés, se llevó a cabo una búsqueda de las secuencias correspondientes a CTGF y el control endógeno 18S de rata en la base de datos del National Center

for Biotechnology Information (NCBI) y posteriormente se utilizó el programa Primer 3 versión 0.4.0 [65, 66] para la obtención de las secuencias de los oligonucleótidos. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 2.

Gen	Cadena	Secuencia	Tamaño del Producto
CTGF	Forward	5'-CTGTGAGGAGTGGGTGTGTG-3'	323 pb
	Reverse	5'-CCGGTAGGTCTTCACACTGG-3'	
18S	Reverse	5'-CTCAGACAGTTGCCGGAGAG-3'	270 pb
	Forward	5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3'	

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos de CTGF empleados.

6.7 RT.

Para obtener los DNA complementarios (cDNA) a partir del RNA total aislado se realizó una RT-PCR usando el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Por muestra se agregaron 5 µL de buffer 5X (250 mM Tris-HCl; 375 mM KCl; 15 mM de MgCl₂ y 0.1 M de DTT), 10 µg de muestra de RNA, 1 µL de oligodT (500 µg/mL), 1.25 µL de mix 10 mM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1 µL de la enzima M-MLV (200 unidades) y se agrega agua hasta obtener 25 µL de volumen total de reacción.

6.8 PCR.

Para determinar las condiciones óptimas de las condiciones en las que se realizaría la PCR, se realizaron varios ensayos para cada gen; a partir de 10 µg de RNA hepático de las diversas muestras obtenidas se generó un concentrado de cDNA, se emplearon diferentes temperaturas de alineamiento, hasta obtener en los geles de electroforesis una sola banda que correspondiera al peso molecular del fragmento del gen que se estaba amplificando y diferentes números de ciclos para determinar el óptimo para la amplificación. Las

estandarizaciones se realizaron con muestras del grupo control. La técnica de PCR se realizó colocando en un tubo de 0.2 mL: 2.5 µL de buffer 10 X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl; 100 µg/mL gelatina, 1.5 mg/mL BSA; 1% Tritón 100 X); 2. 5µL de MgCl₂ (30 mM); 1 µL de Oligo Forward (20 mM); 1 µL Oligo Reverse (20 mM); 1 µL de dNTP Mix 10 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP); 1 µL de cDNA (10 µg/µL) y 0.4 µL de la enzima Amplificasa® (5 U/µL, Tecnologías Universitarias, México). Se agregó suficiente agua libre de RNAsas para obtener un volumen de reacción final de 25 µL. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Veriti® 96-Well (Applied Biosystems).

Gen	Cantidad de cDNA	Temperatura de alineamiento	Numero de Ciclos
CTGF	1 µL	60°C	35
18S	1 µL	60°C	30

Tabla 3. Condiciones óptimas para PCR de cada gen.

Con las condiciones óptimas estandarizadas mostradas en la Tabla 3, se realizó individualmente PCR de la forma previamente descrita.

6.9 Geles de agarosa.

Para separar los productos de PCR, se realizó electroforesis en geles de agarosa, para lo cual a cada reacción de PCR se le agregaron 5 µL de Buffer de Carga (20% de glicerol; 1 mg/mL de azul de bromofenol; 1 mg/mL de xilencianol). La mezcla fue homogenizada en un vórtex y 15 µL fueron cargados en un gel de Agarosa 1.2% en Buffer TBE (Tris Base 90 mM; ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM, pH 8.0) con bromuro de Etidio (1 mg/mL), la mezcla se corrió en una cámara de electroforesis con Buffer TBE a 90V.

6.10 Densitometría óptica.

Una vez las muestras se corrieron en el gel de agarosa; éste fue expuesto a luz UV (302 nm) para observar las bandas presentes en el gel mediante el uso de un transiluminador adaptado a una cámara digital (EDAS 290 Kodak, EUA). Las fotografías resultantes se analizaron con el software *Image J* (NIH, EUA); se realizó la densitometría óptica comparando la intensidad de las bandas que corresponden al fragmento de cDNA del gen CTGF con respecto a la intensidad de la banda correspondiente a 18S.

6.11 Extracción de proteínas.

Del tejido en congelación almacenado, se utilizaron 100 mg para el aislamiento de proteína total de hígado. Se colocaron en 1 mL de reactivo para extracción de proteínas (Tissue Protein Extraction Reagent®, Thermo Scientific; bicina 25 nM; NaCl 150 mM, pH 7.6) a 1% de inhibidor de proteasas (Merck Millipore, EUA), se homogenizó usando un Polytron PT 1300D (Kinematica AG) se homogenizó. Después se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recolectó para determinar CTGF e IL-6 en tejido hepático.

6.12 Cuantificación de proteínas totales.

Se trabajó con los sobrenadantes generados en la extracción de proteínas descrita previamente; se usó el kit DC Protein Assay (BioRad, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante; brevemente las muestras se diluyeron con PBS 1:10 previamente y se realizaron diluciones de albúmina que se usaron como curva estándar. En una placa de 96 pozos se colocaron 5 µL de muestra o estándar, posteriormente se le agregaron 25 µL del Reactivo A' (que se genera mezclando 20 µL de Reactivo S por cada mL de Reactivo A) y 200 µL del Reactivo B. Se incubaron por 15 minutos para su posterior lectura a 750 nm. Las absorbancias se determinaron con el lector de microplacas (µQuant de BIO-TEK, USA). El rango de lectura fue de 0.2-1.5 mg/mL. **(Figura 6).**

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

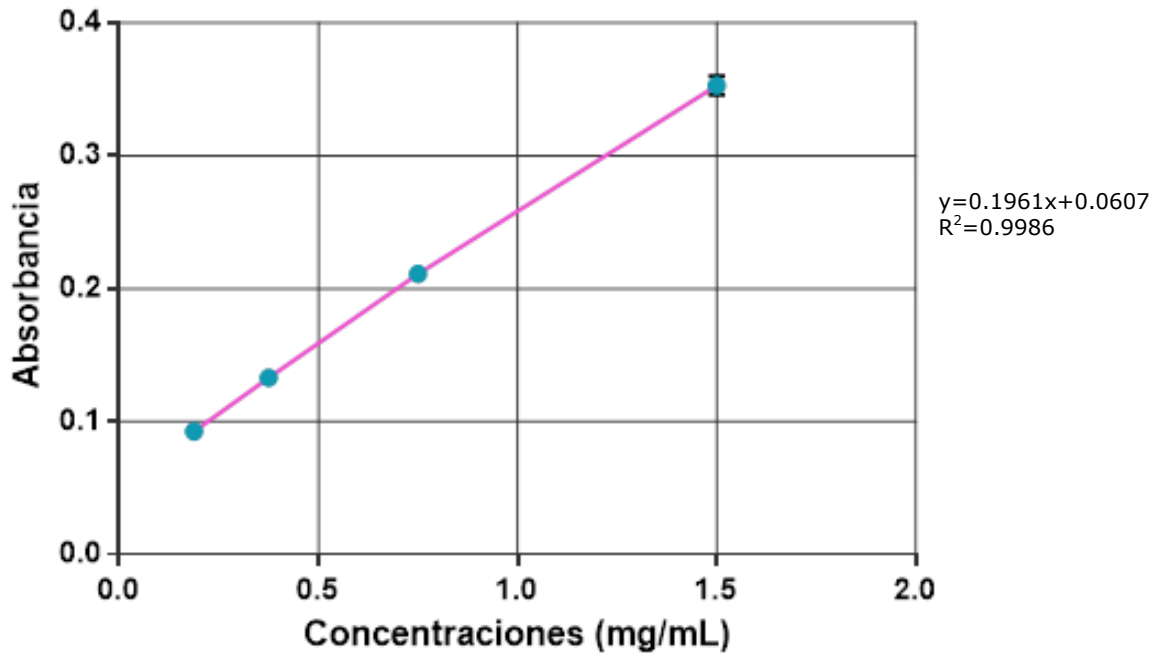


Figura 6. Curva estándar de albúmina para determinación de proteína total. Muestra la absorbancia de los diferentes estándares a concentraciones establecidas de albumina.

6.13 Preparación del suero.

Para poder cuantificar al CTGF sérico, se concentró el suero recolectado, para ello se tomaron 200 μ L y se concentraron (Concentrator 530, Eppendorf) a 100 μ L por medio de centrifugación y vacío a 30°C.

6.14 Cuantificación de CTGF e IL-6.

La cuantificación de CTGF e IL-6 en tejido y en suero se realizó usando el kit CTGF ABTS ELISA y el kit IL-6 ABTS ELISA (PeproTech, EUA). El procedimiento seguido fue agregar 100 μ L de anticuerpo de captura (1 μ g/ μ L) a cada pozo de una placa de 96 pozos y dejarlo incubar durante toda la noche, pasado este tiempo se aspiró el anticuerpo de captura y se lavó 4 veces con 300 μ L de Wash Buffer (PBS: NaCl 13.7 mM; KCl 0.27 mM; Na₂HPO₄ 0.1 mM; KH₂PO₄ 0.2 mM; 0.05% Tween-20). Después de haber aspirado el resto del último lavado se le

agregaron 300 μL de Block Buffer (PBS a 1% de BSA) y se dejó incubando 1 hr a temperatura ambiente. Se repitieron los 4 ciclos de lavado. Luego se agregaron 100 μL de los estándares o las muestras a los pozos correspondientes (el sobrenadante de la extracción de proteínas del hígado o el suero concentrado) y se dejó incubando por 2 hrs a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados y se agregó el anticuerpo de detección (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 100 μL por pozo, se incubó por 2 hrs a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se volvió a lavar con los 4 ciclos de lavado y se añadieron 100 μL de Avidina conjugada con HRP (Horse Radish Peroxidase -1:2000) dejando incubar por 30 minutos más. Luego se lavó 4 veces más y por último se agregaron 100 μL de la solución sustrato, dejando incubar a temperatura ambiente hasta el vire de color. Las absorbancias se determinaron con el lector de microplacas (μQuant de BIO-TEK, USA) a las longitudes de onda 405 y 650 nm. La cantidad de CTGF e IL-6 en tejido y suero se calcularon con base en la curva estándar. El rango para la determinación de CTGF fue de 63-4000 pg/mL y de IL-6 de 32-2000 pg/mL (**Figuras 7 y 8**).

6.15 Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba *post hoc* de Tukey para comparar diferencias entre los grupos y t-student para comparar dos grupos. El análisis estadístico se realizó con el programa *GraphPadPrism 6* (La Jolla, CA, USA). Se consideró $p < 0.05$ como significativo.

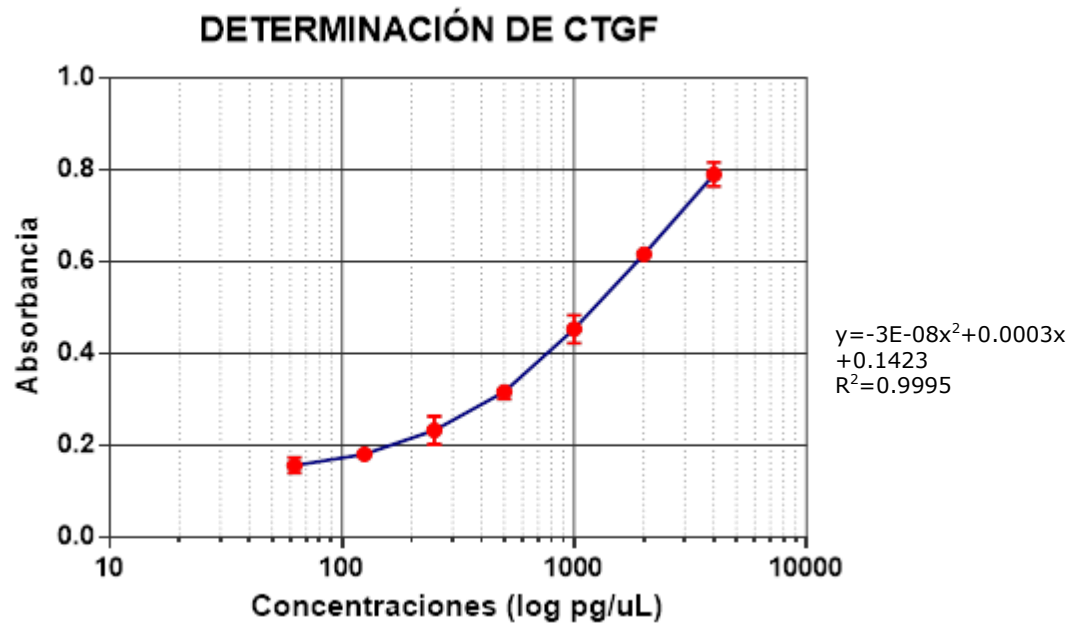


Figura 7. Curva estándar de la ELISA de CTGF. Muestra la absorbancia de los diferentes estándares a concentraciones establecidas de CTGF.

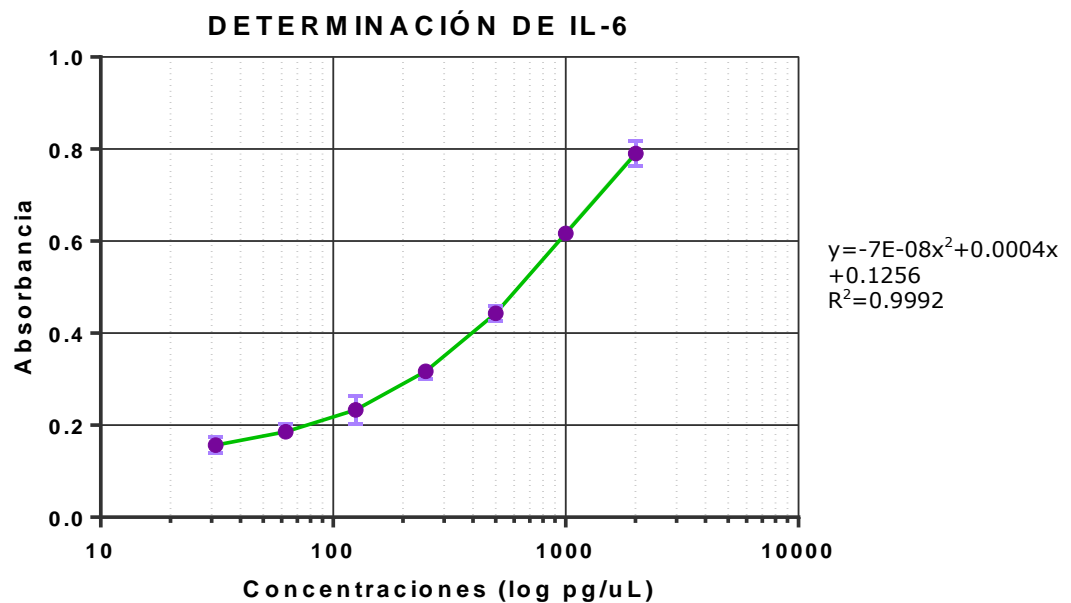


Figura 8. Curva estándar de la ELISA de IL-6. Muestra la absorbancia de los diferentes estándares a concentraciones establecidas de IL-6.

7. RESULTADOS.

7.1 Inducción de la fibrosis.

Como primer etapa del trabajo, se necesitó inducir diferentes grados de fibrosis mediante la administración de CCl_4 , un agente hepatotóxico. Al término de cada esquema de administración, macroscópicamente se puede observar el cambio en el tejido hepático, en comparación con el hígado sano que posee características como el color rojo vino y superficie uniforme y lisa (**Figura 9A**); cuando el hígado cursa con fibrosis severa, correspondiente a la etapa F3, se puede ver que el color rojo brillante característico se pierde, siendo de color marrón, de bordes más redondeados y la superficie rugosa (**Figura 9B**).

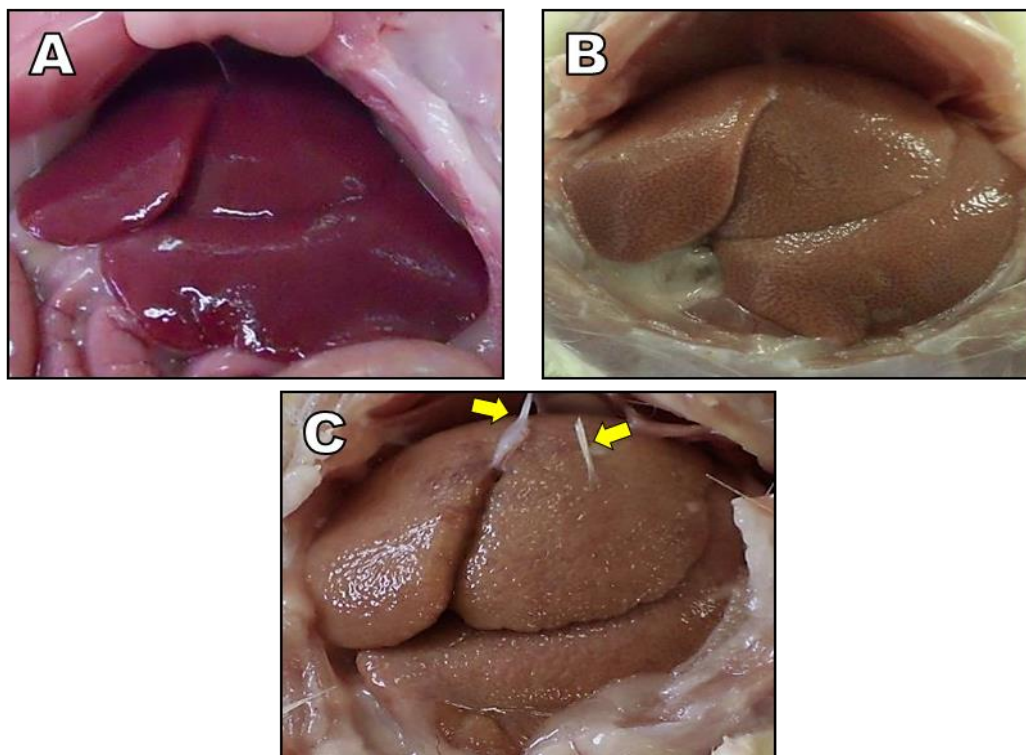


Figura 9. Imágenes del hígado en diferentes etapas del esquema de administración. Hígados al momento de la toma de muestra. **A.** Hígado control, ninguna dosis de CCl_4 . **B.** Hígado con fibrosis severa (F3), con 20 administraciones de CCl_4 . **C.** Hígado cirrótico (F4), con 40 dosis de CCl_4 presenta adherencias (flechas amarillas).

En la etapa de cirrosis (F4) el hígado de vuelve aún más rugoso además de la presencia de adherencias (flechas amarillas), que es tejido conectivo unido al hígado y a la cavidad abdominal (**Figura 9C**).

7.2 Clasificación histológica de la fibrosis hepática.

Para poder confirmar y clasificar las etapas de la fibrosis hepática generada por el hepatotóxico CCl_4 , se realizaron diferentes tinciones histológicas. La primera tinción, Rojo de Sirio, es una tinción selectiva en que mediante técnicas de iluminación con campo claro la colágena es de color rojo más intenso que el fondo y con luz polarizada, la colágena se evidencia de color rojo en un fondo negro (**Figura 10**). Otra tinción selectiva que se realizó fue la tinción Tricrómica de Masson, que tiñe de color azul las fibras de colágena en un fondo rosa (**Figura 11**). Estas dos técnicas nos permitieron confirmar la relación de las dosis de CCl_4 con las etapas de la fibrosis según la clasificación METAVIR.

Además de clasificar y confirmar la etapas de la fibrosis se realizó la tinción Hematoxilina y Eosina (**Figura 12**) la cual tiñe núcleos morados y citoplasma rosa, esto se realizó para poder apreciar la microestructura del hígado, donde se observó que la arquitectura típica del hígado se va desordenando conforme avanza la fibrosis, y existe presencia de gotas de grasa (esteatosis) apreciada como círculos blancos.

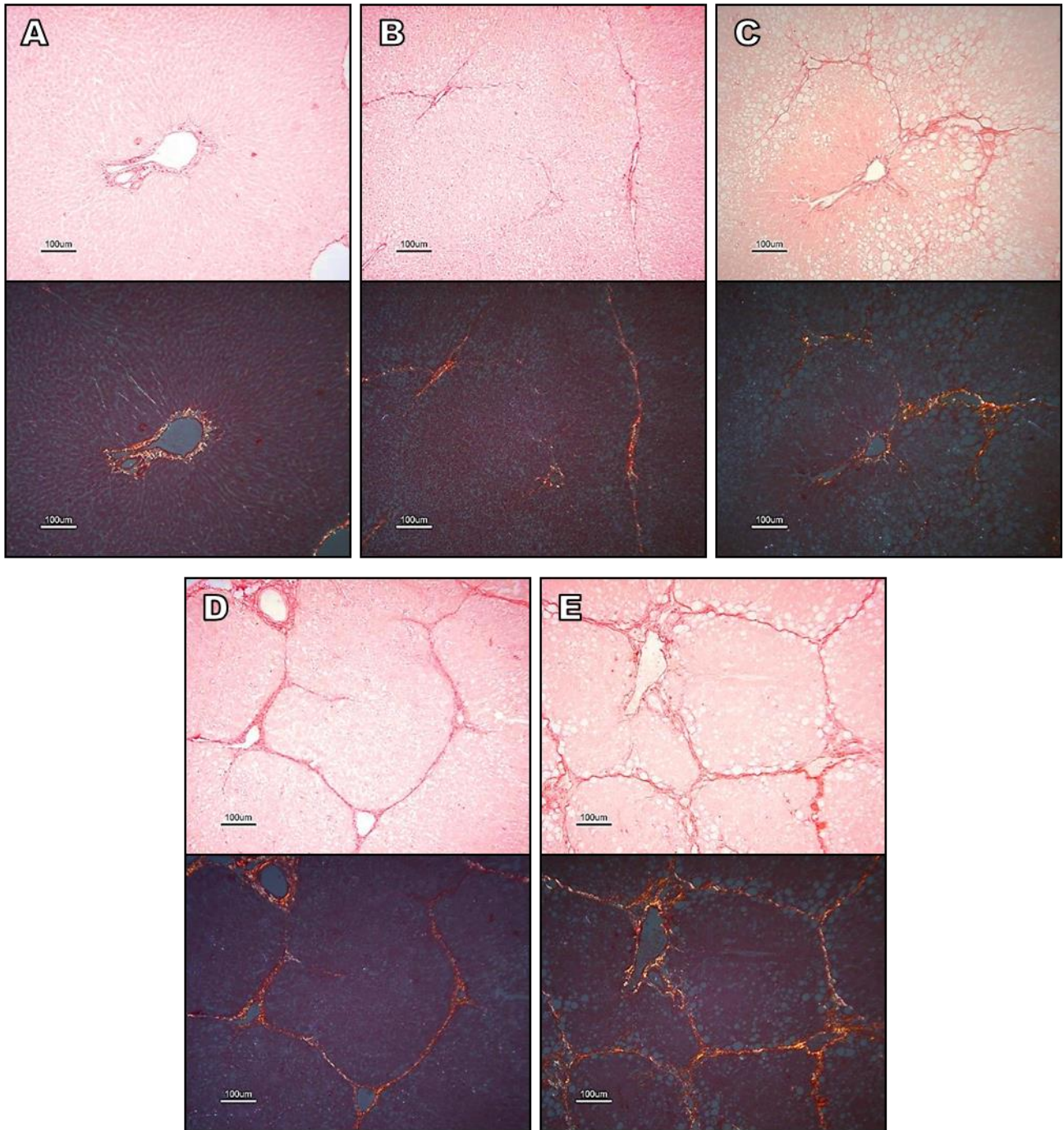


Figura 10. Fotomicrografía de las histologías con tinción Rojo de Sirio. Imágenes representativas de los diferentes estadios de la fibrosis hepática. Panel superior técnica de campo claro, panel inferior técnica de iluminación con luz polarizada. **A.** Hígado control (F0). **B.** 8 dosis de CCl_4 (F1) fibrosis temprana. **C.** 12 administraciones de CCl_4 (F2) fibrosis moderada. **D.** 20 dosis de CCl_4 (F3) fibrosis severa. **E.** 40 dosis de CCl_4 (F4), cirrosis. Imágenes tomadas a 100X.

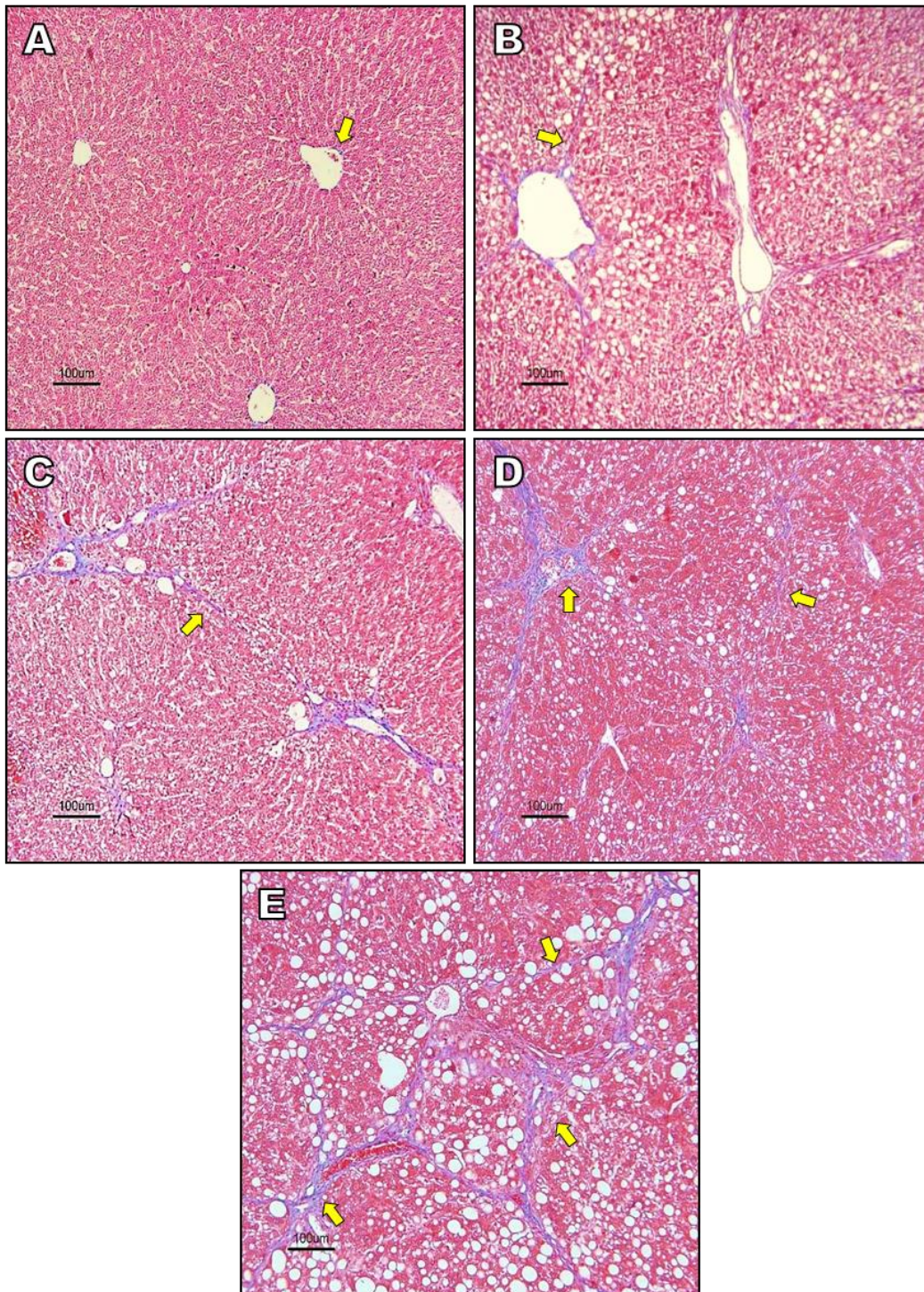


Figura 11. Fotomicrografía de las histologías con tinción Tricrómica de Masson. Colágena de color azul. **A.** F0, Hígado control. **B.** F1, fibrosis inicial. **C.** F2, fibrosis moderada. **D.** F3, fibrosis severa. **E.** F4, cirrosis. Fibras de colágena señalada con flechas amarillas. Imágenes tomadas a 100X.

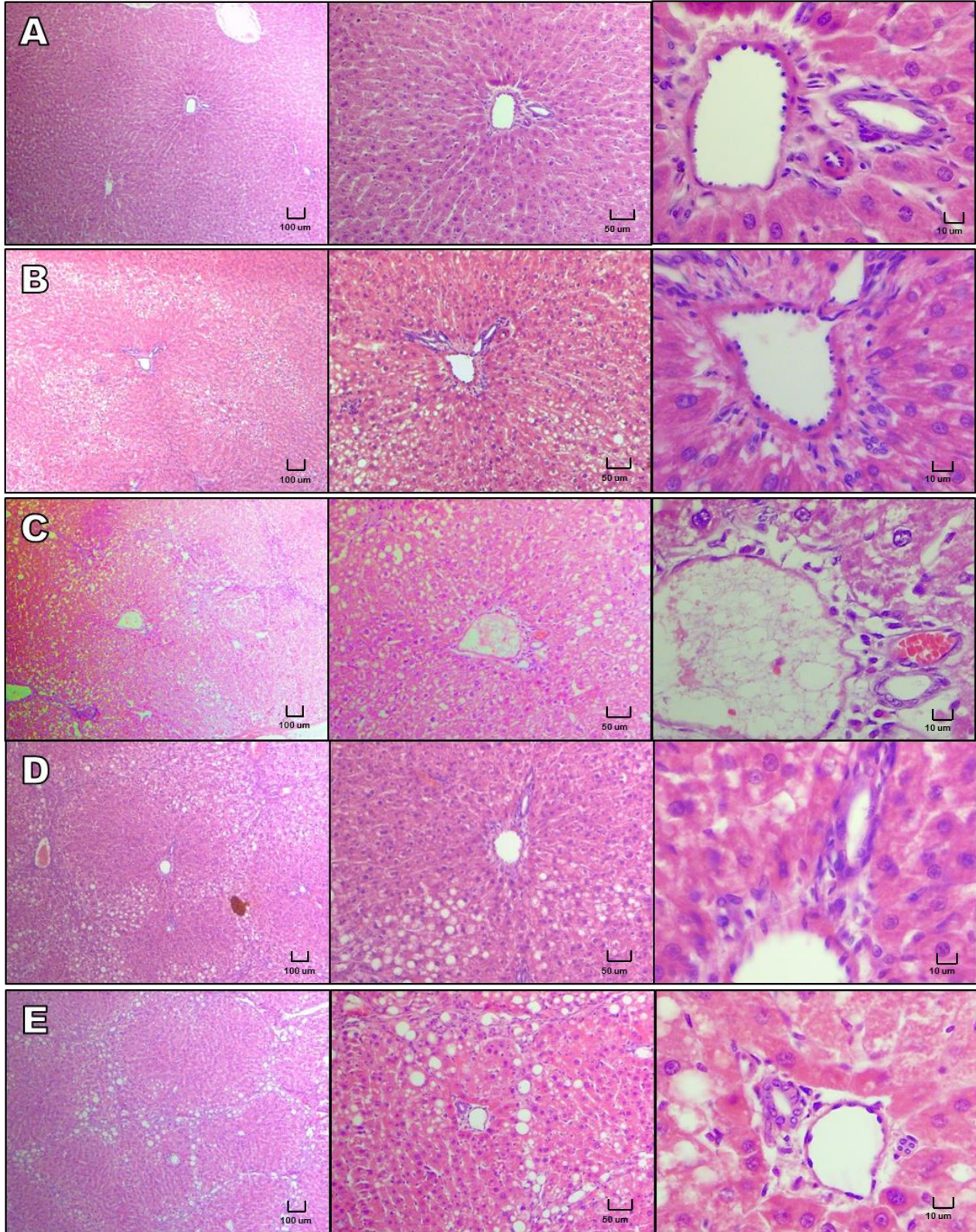


Figura 12. Fotomicrografía de las histologías con tinción Hematoxilina y Eosina (H&E).
A. Hígado control, F0. **B.** F1, fibrosis inicial. **C.** F2, fibrosis moderada. **D.** F3, fibrosis severa. **E.** F4, cirrosis. Imágenes a 40X, 100X y para apreciar las triadas portaes 400X.

7.3 Expresión de CTGF en el curso de la fibrosis hepática.

Se determinó la expresión del gen de CTGF, mediante PCR, y se normalizó con el gen constitutivo 18S (**Figura 13**), se puede apreciar con los resultados que la expresión de CTGF en el hígado normal, es muy escasa; cuando hay un daño considerable por CCl₄, desde la etapa de fibrosis moderada (F2), la expresión aumenta, teniendo la mayor expresión del gen CTGF en el estadio de cirrosis que también es significativamente mayor que en la etapa de fibrosis inicial.

También se cuantificó CTGF a nivel de proteína en el tejido hepático y en suero; en el tejido se aprecia un comportamiento totalmente contrario (**Figura 14**), siendo el nivel más alto el hígado sano (F0) seguido por F1, y teniendo los niveles más bajos a partir de fibrosis severa hasta cirrosis (F2-F4).

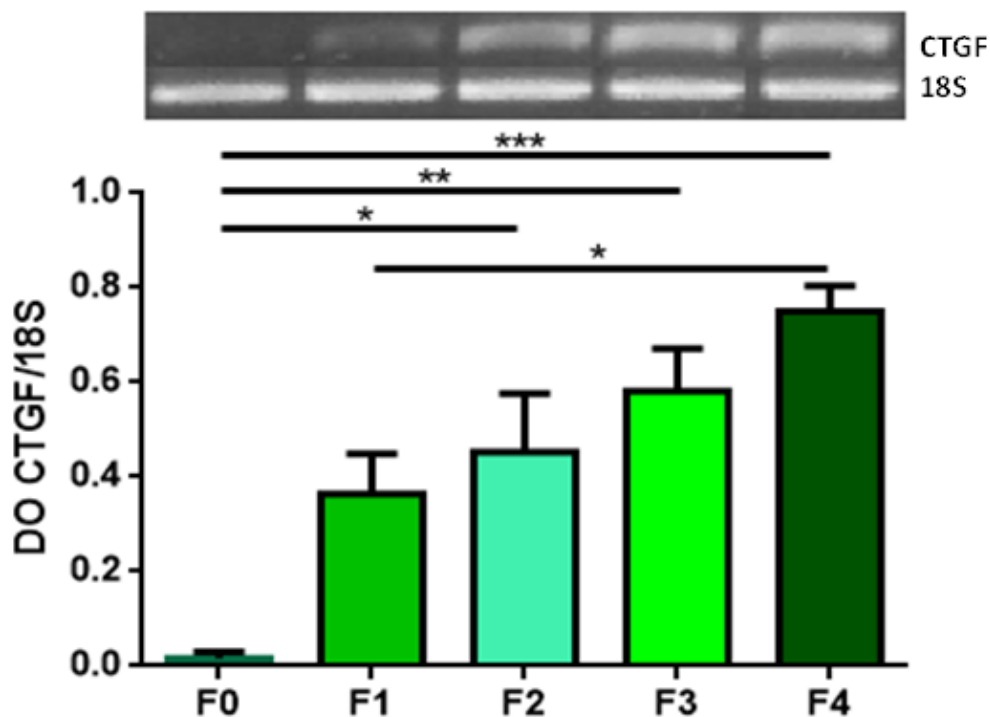


Figura 13. Expresión del gen CTGF durante la fibrosis hepática. Se muestra la expresión de CTGF durante los diferentes estadios de la fibrosis. Se normalizó con el gen 18S. Los resultados se muestran como Media±EE. Se realizó ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n=6. DO densidad óptica.

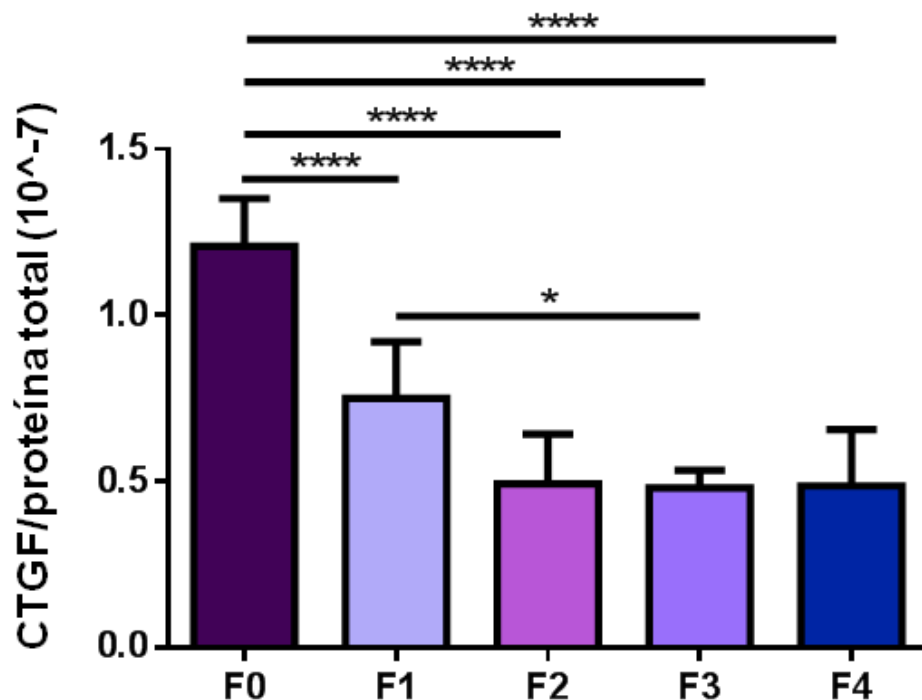


Figura 14. CTGF/proteína total en hígado durante la fibrosis hepática. Se muestran la relación de CTGF/proteína total durante los diferentes estadios de la fibrosis. Los resultados se muestran como Media±EE. Se realizó ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, $n = 6$.

En el caso del suero, las concentraciones de CTGF (**Figura 15**) no varían conforme avanza la fibrosis con respecto al hígado sano ni existe diferencia entre la cantidad de proteína en los diferentes estadios de la fibrosis.

7.4 Expresión de IL-6 en el curso de la fibrosis hepática.

Se cuantificó a IL-6 durante el curso de la fibrosis, en el tejido hepático (**Figura 16**) IL-6, disminuye a partir del inicio de la fibrosis, sin embargo, no es diferente en la etapa más severa (F4). Parecido a su comportamiento a nivel tisular, en el suero (**Figura 17**), IL-6 disminuye desde la primera etapa de la fibrosis hasta la cirrosis (F1-F4).

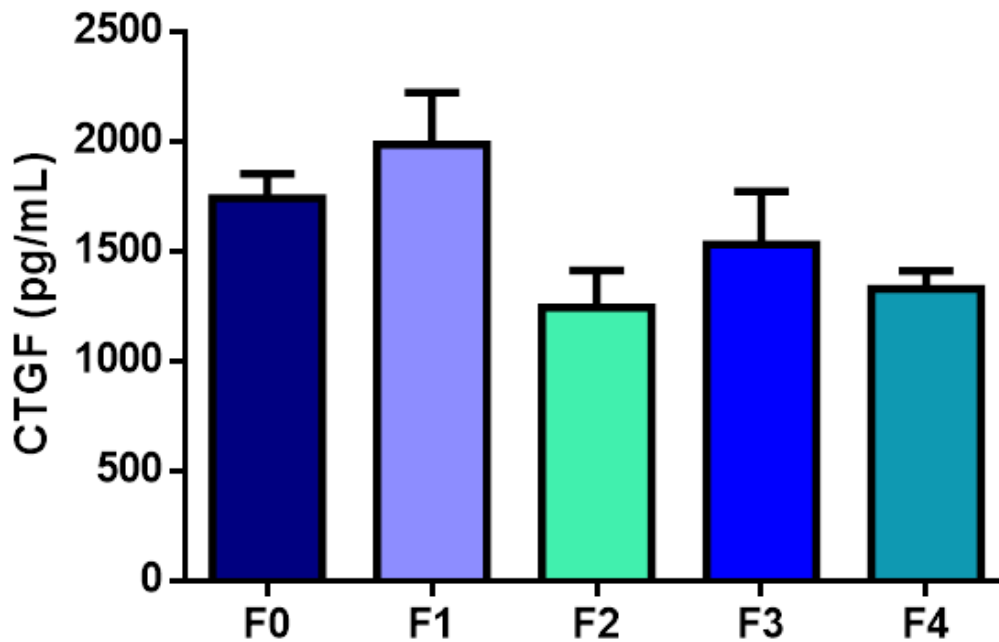


Figura 15. Concentraciones séricas de CTGF durante la fibrosis hepática. Se muestran las concentraciones peptídicas en el suero de CTGF durante los diferentes estadios de la fibrosis. Los resultados se muestran como Media±EE. Se realizó ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. n=6.

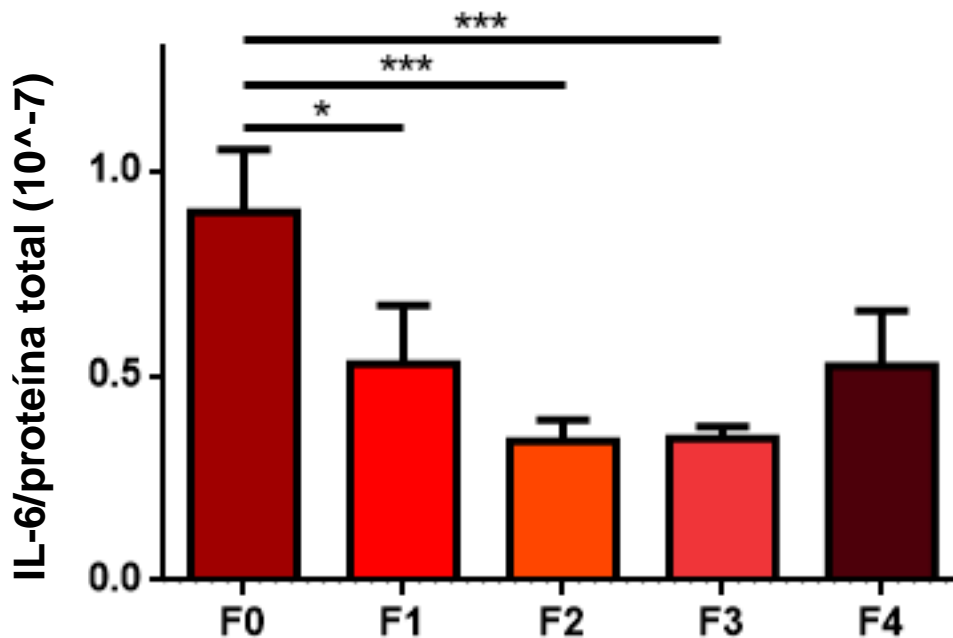


Figura 16. IL-6/proteína total en hígado durante la fibrosis hepática. Se muestran la relación IL-6/proteína total durante los diferentes estadios de la fibrosis. Los resultados se muestran como Media±EE. Se realizó ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05, ***p<0.001, n=6.

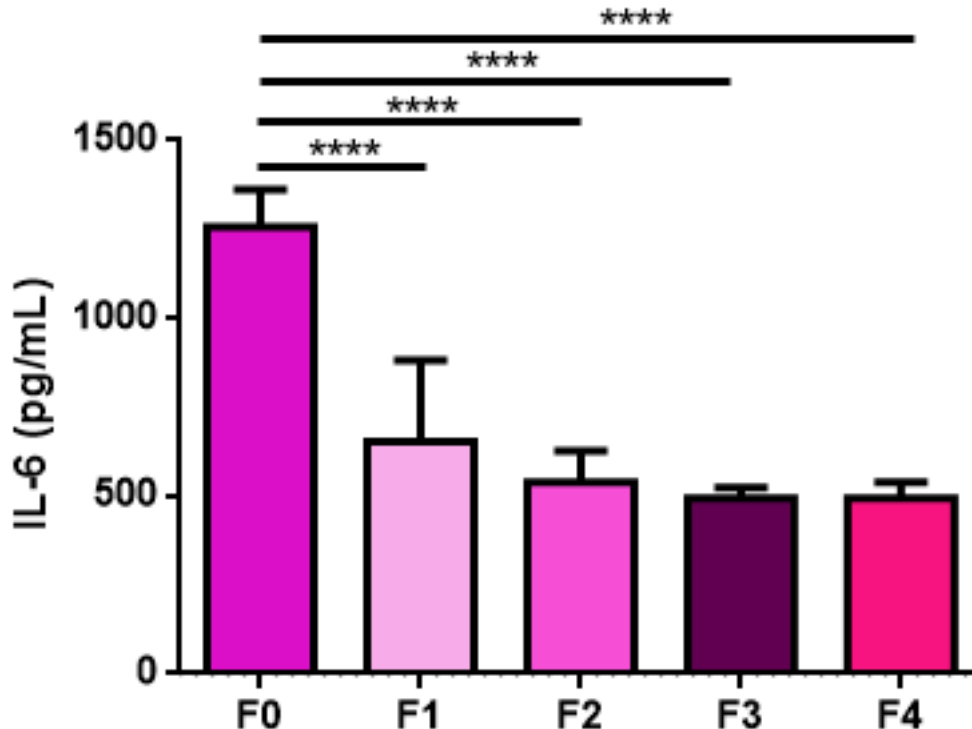


Figura 17. Concentraciones séricas de IL-6 durante la fibrosis hepática. Se muestran las concentraciones de IL-6 en el suero durante los diferentes estadios de la fibrosis. Los resultados se muestran como Media±EE. Se realizó ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. ****p<0.0001, n=6.

7.5 Modelo de reversión de la fibrosis.

El grupo de reversión de la fibrosis (F3+R) se obtuvo administrando CCl₄ hasta llegar a una fibrosis severa (F3) y después retirando el agente hepatotóxico por un mes, el hígado tiene capacidad de regenerarse, por lo que es un modelo de reversión de la fibrosis.

Al retirar el CCl₄, macroscópicamente se puede observar que el hígado del grupo de reversión (**Figura 18C**) presenta menor granularidad en la superficie que el hígado con las mismas dosis de CCl₄ (20 dosis) (**Figura 18B**), también se ve una tonalidad menos opaca y los bordes no redondeados, sin embargo, no puede compararse con un hígado sano (**Figura 18A**).

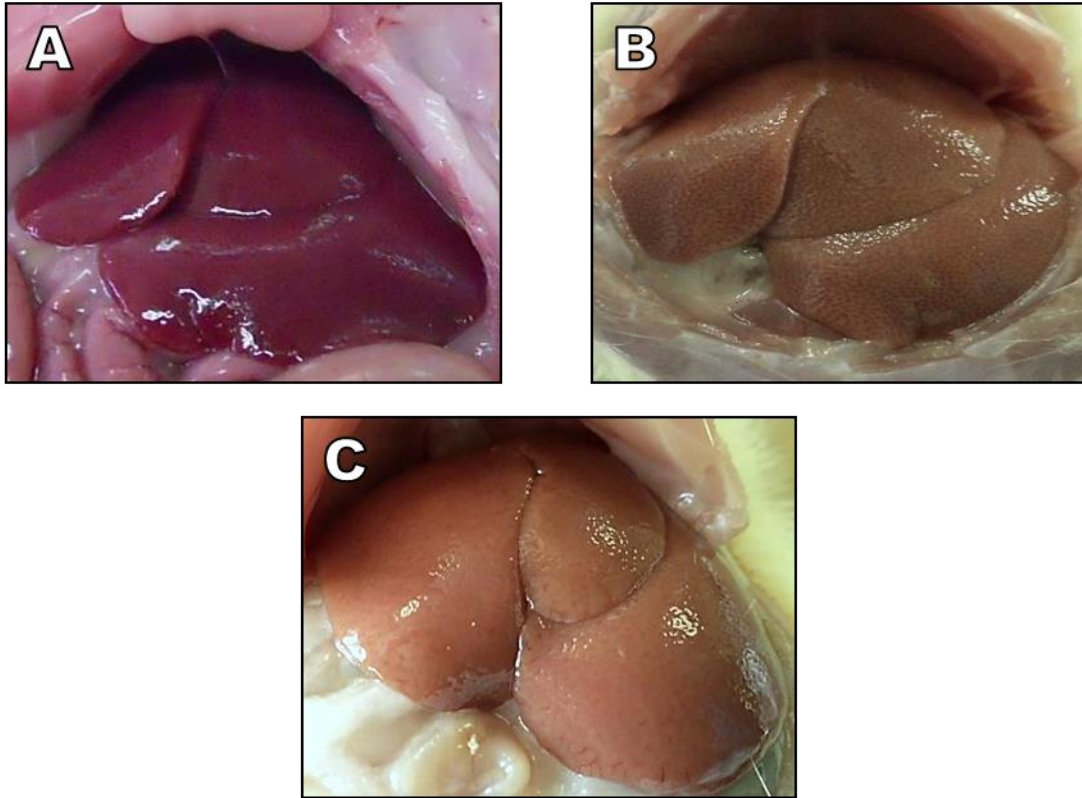


Figura 18. Imágenes del hígado sano, en fibrosis y en reversión. Tejido hepático al momento de la toma de muestra. **A.** Hígado control, F0. **B.** Hígado con fibrosis severa (F3), con 20 administraciones de CCl_4 . **C.** Hígado en modelo de reversión (F3+R).

7.6 Clasificación histológica de la resolución de la fibrosis hepática.

Para poder confirmar que la fibrosis se ha revertido y que el hígado presenta regeneración, se realizaron las tinciones correspondientes; para ver las fibras de colágeno se realizó la tinción Rojo de Sirio (**Figura 19**), en la cual se puede observar que en el grupo F3+R, hay menor cantidad de colágena respecto a F3, aunque sin llegar a ser como un hígado normal. Esto se confirma con la tinción Tricrómica de Masson (**Figura 20**).

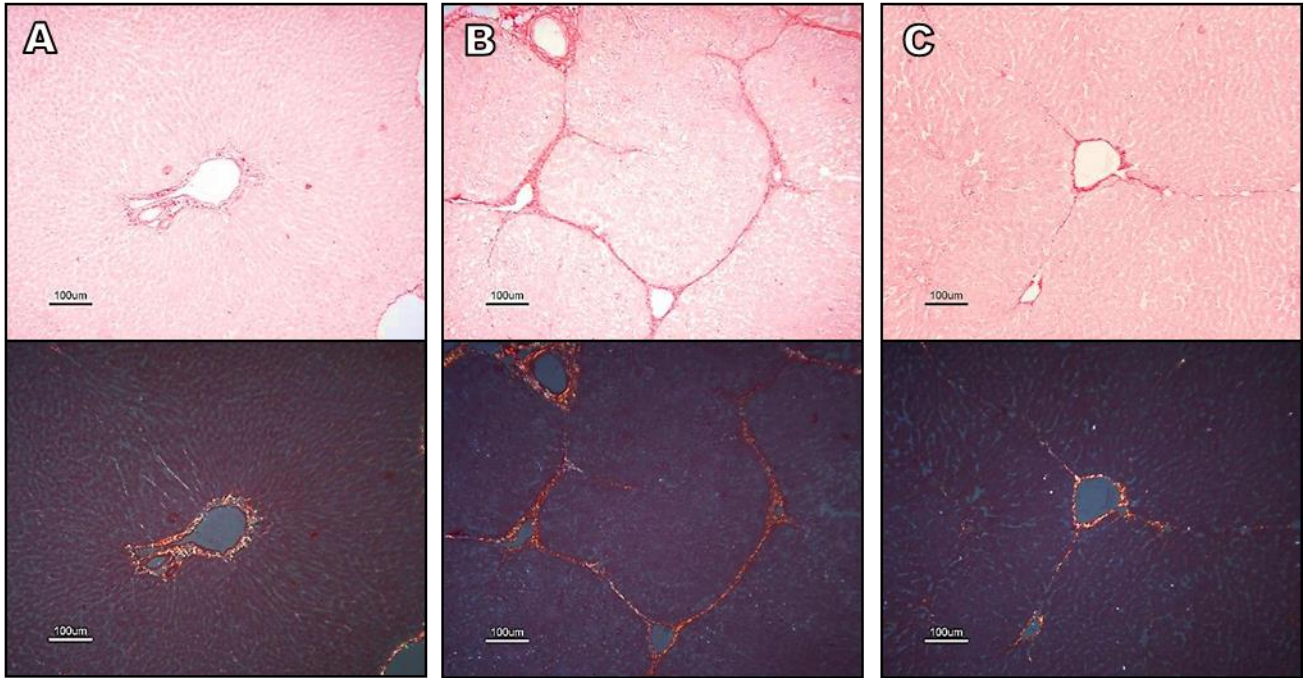


Figura 19. Fotomicrografía de las histologías con tinción Rojo de Sirio en la reversión de la fibrosis. Imágenes representativas de los diferentes grupos. Panel superior técnica de campo claro, panel inferior técnica de iluminación con luz polarizada. **A.** Hígado control (F0). **B.** 20 dosis de CCl_4 (F3) fibrosis severa. **C.** Modelo de reversión, 20 dosis de CCl_4 y un mes de recuperación. Imágenes tomadas a 100X.

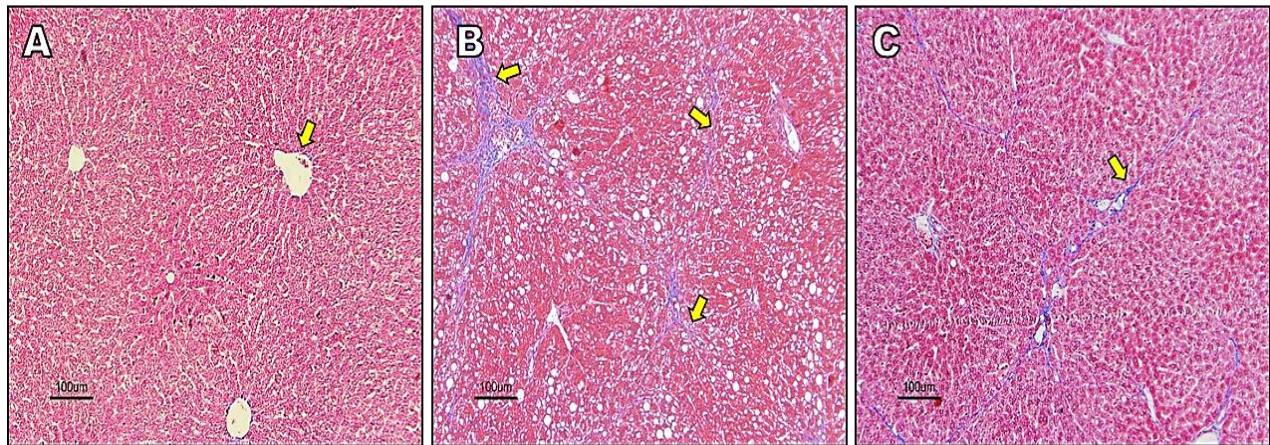


Figura 20. Fotomicrografía de las histologías con tinción Tricrómica de Masson en la reversión de la fibrosis. Colágena de color azul. **A.** F0, Hígado control. **B.** F3, fibrosis severa. **C.** F3+R, modelo de reversión. Fibras de colágena señalada con flechas amarillas. Imágenes tomadas a 100X.

Para observar la arquitectura hepática, se realizó la tinción de H&E (**Figura 21**), con lo que observamos, que en el grupo de reversión (F3+R) ya no existe esteatosis (gotas de grasa), además se aprecia una mejor organización de los cordones de hepatocitos, aunque todavía se ve un ensanchamiento de los sinusoides. Es de resaltar que en este grupo de reversión se aprecia, además de la disminución de la fibrosis, la presencia de reacciones ductulares (flechas negras), que son ductos formados en el área de la triada portal.

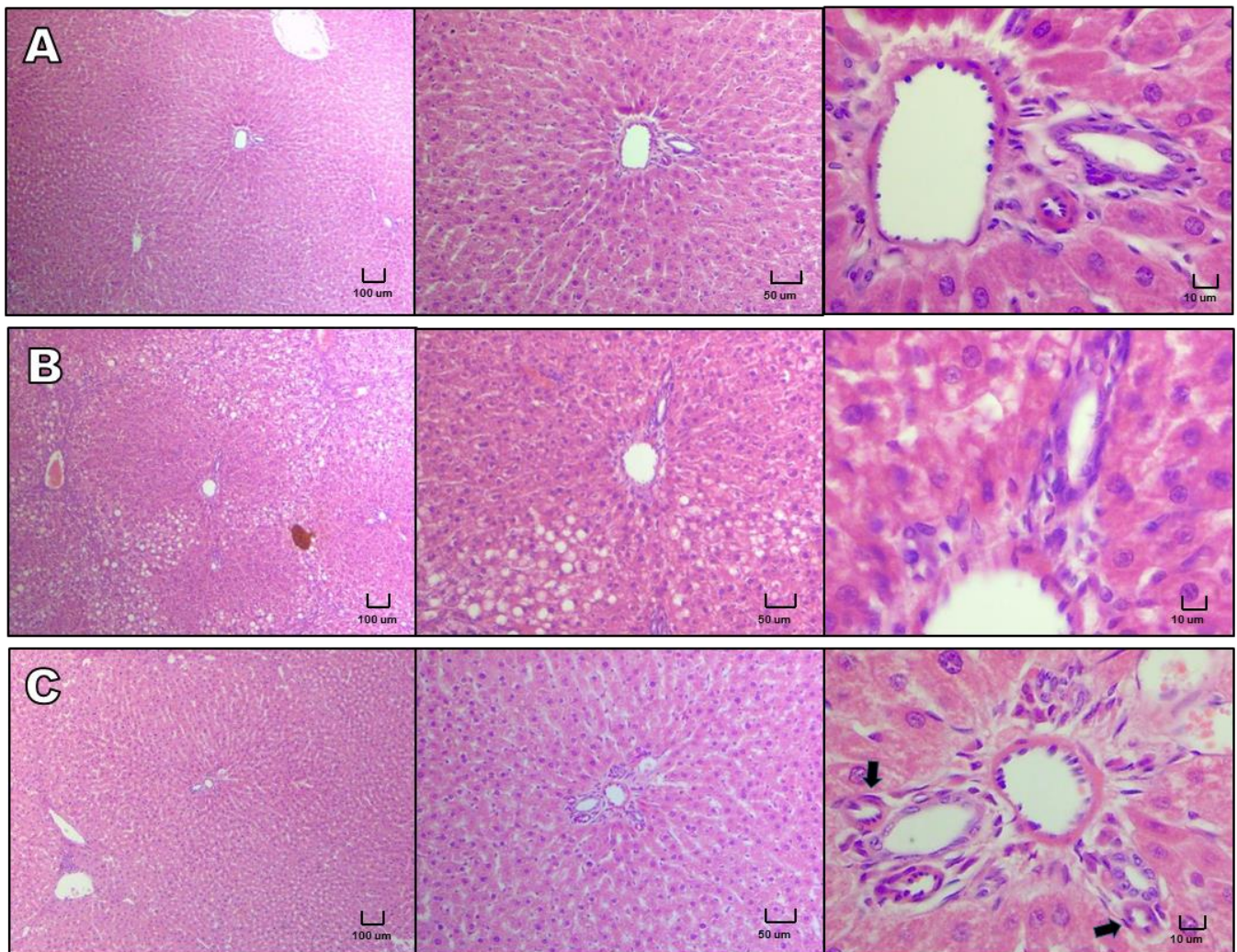


Figura 21. Fotomicrografía de las histologías con tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) en la resolución de la fibrosis. A. Hígado control, F0. B. F3, fibrosis severa. C. Grupo de reversión F3+R. Reacciones ductulares señaladas con flechas negras. Imágenes a 40X, 100X y 400X.

7.7 Expresión de CTGF en la reversión de la fibrosis.

Se determinó la expresión del gen de CTGF, mediante PCR, y se normalizó con el gen constitutivo 18S (**Figura 22**), se puede apreciar con los resultados que la expresión es más alta en fibrosis severa (F3), que en el hígado sano (F0) y en el hígado en proceso de reversión (F3+R).

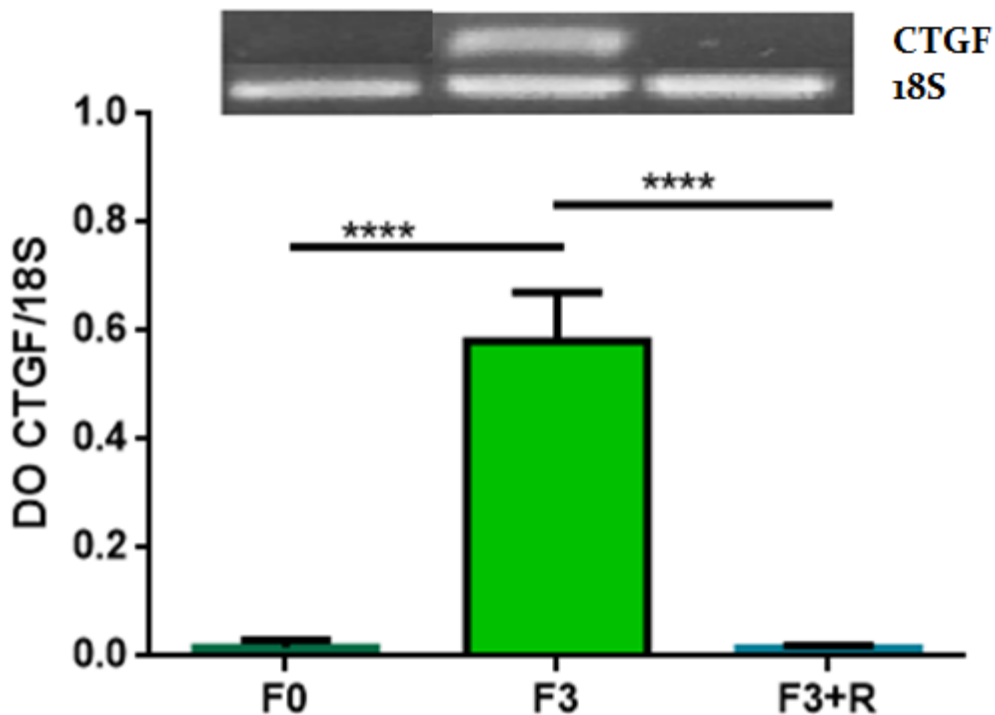


Figura 22. Expresión del gen CTGF durante la reversión de la fibrosis. Se muestra la expresión de CTGF en hígado sano F0, fibrosis severa F3, y en proceso de reversión F3+R. Se normalizó con el gen 18S. Los resultados se muestran como Media±EE. Se realizó ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. **** $p < 0.0001$, $n = 6$. DO densidad óptica.

También se determinó la cantidad de péptido de CTGF en hígado (**Figura 23**) y en suero (**Figura 24**), donde, una vez más el comportamiento es contrario a la expresión, siendo más CTGF en los controles y en el proceso de reversión que en la etapa F3, sin embargo, en la reversión no llegan a ser igual que el control, siendo significativamente menores; y en el caso de las concentraciones séricas, no varía la cantidad de CTGF en ningún grupo.

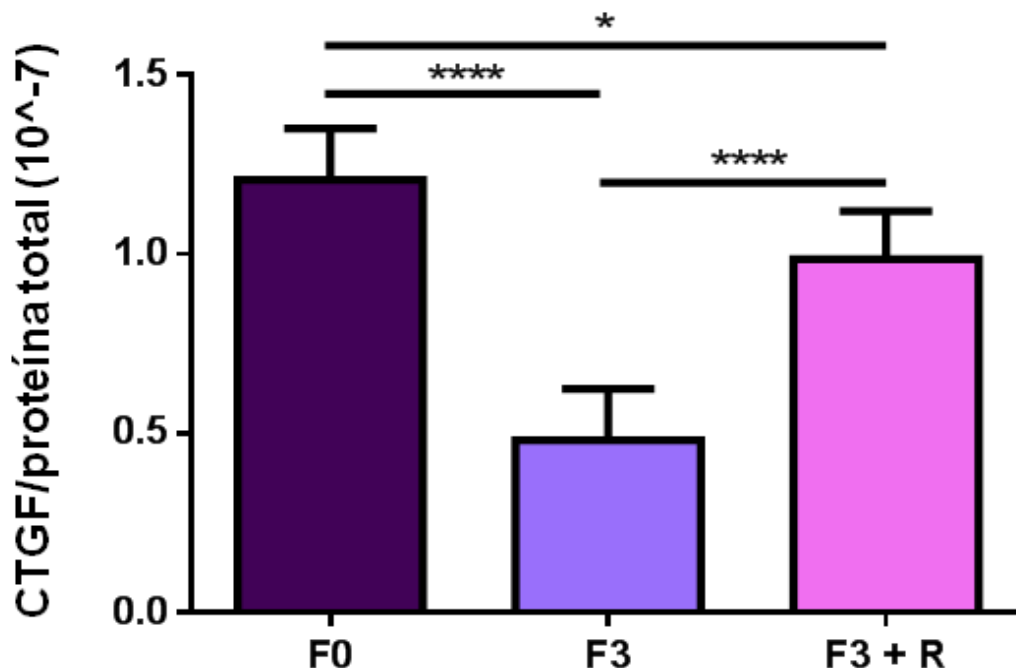


Figura 23. Relación CTGF/proteína total en el hígado durante la reversión de la fibrosis. Se muestra la relación entre CTGF/proteína total en el hígado sano (F0), fibrótico (F3) y en proceso de reversión de la fibrosis (F3+R). Los resultados se muestran como Media±EE. Se realizó ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, $n = 6$.

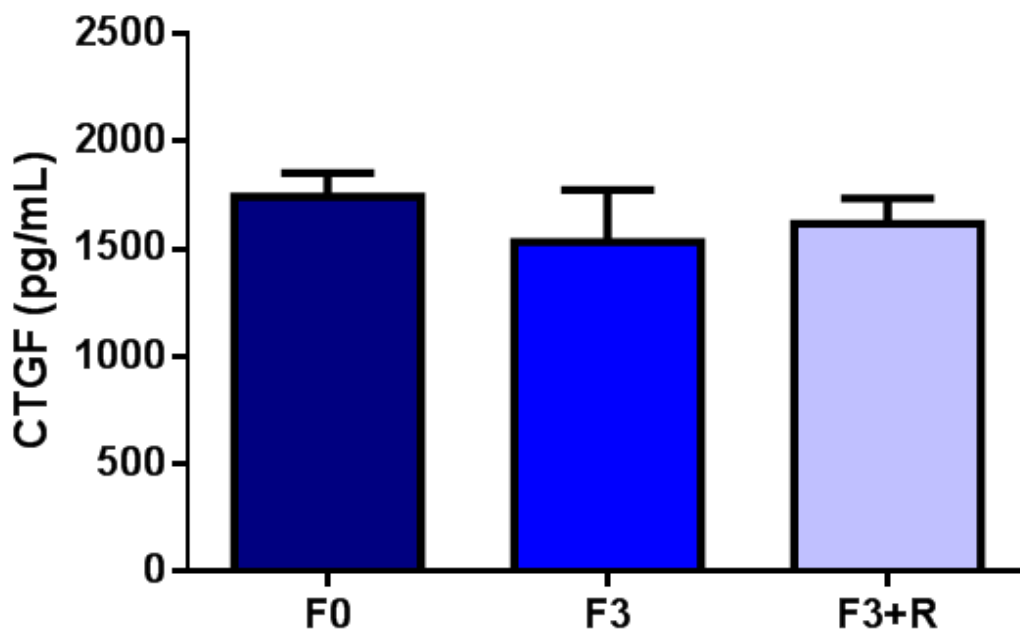


Figura 23. Concentraciones séricas de CTGF durante la reversión de la fibrosis hepática. Se muestran las concentraciones de CTGF en suero en etapa sana (F0), fibrótica (F3) y en proceso de reversión de la fibrosis (F3+R). Los resultados se muestran como Media±EE. Se realizó ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. $n = 6$.

7.8 Expresión de IL-6 en la reversión de la fibrosis.

Además de cuantificar al CTGF, se determinó también a IL-6, ya que se ha visto implicada en la regeneración hepática favoreciendo las reacciones ductulares principalmente. En la **Figura 25**, se puede observar que cuando el hígado cursa un proceso de reversión de la fibrosis, IL-6 se incrementa comparándola con el hígado sano y con el hígado en fibrosis avanzada.

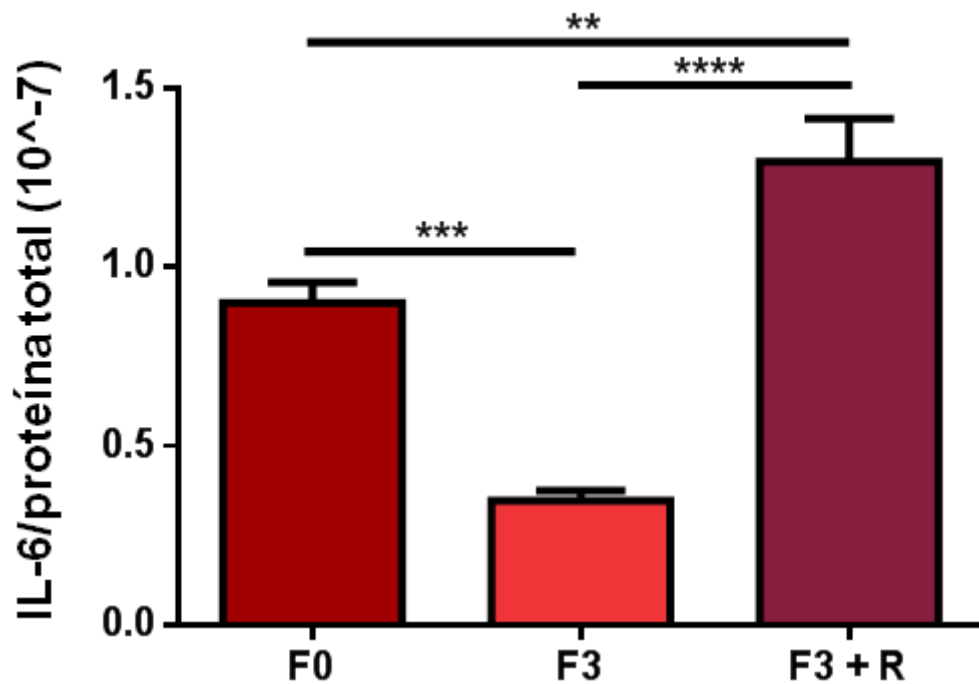


Figura 25. Relación IL-6/proteína total en el hígado durante la reversión de la fibrosis.

Se muestran la relación de IL-6/proteína total en el hígado sano (F0), fibrótico (F3) y en proceso de reversión de la fibrosis (F3+R). Los resultados se muestran como Media±EE. Se realizó ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. ** $p < 0.01$, *** $p < .001$, **** $p < 0.0001$, $n = 6$.

Se ha descrito que IL-6 promueve la regeneración hepática, los resultados obtenidos en el suero muestran que durante el proceso de reversión, hay un incremento de más de cinco veces respecto al control y de más de trece veces que en el hígado fibrótico (**Figura 26**).

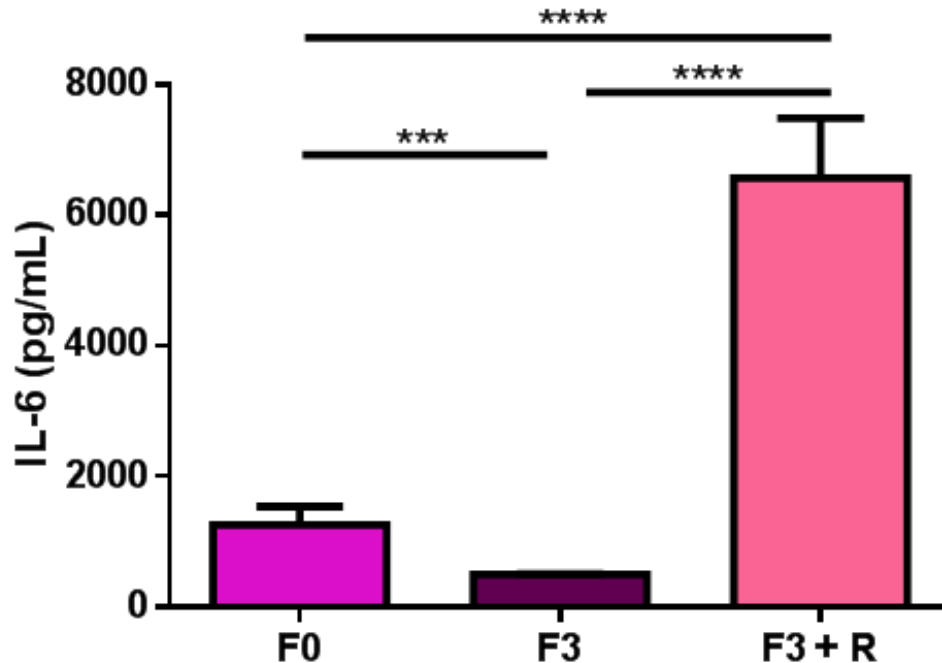


Figura 26. Concentraciones séricas de IL-6 durante la reversión de la fibrosis hepática. Se muestran las concentraciones de CTGF en suero en etapa sana (F0), fibrótica (F3) y en proceso de reversión de la fibrosis (F3+R). Los resultados se muestran como Media±EE. Se realizó ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey y una t-student. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $n = 6$.

8. DISCUSIÓN.

El Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF), es una proteína que se ha descrito implicada en enfermedades que cursan con fibrosis en diferentes órganos (pulmón, piel, ojo e hígado), sin embargo, a lo que respecta con el espectro de la fibrosis hepática no se había estudiado su papel en los diferentes estadios desde una fibrosis inicial hasta la cirrosis. Los resultados de este trabajo muestran que la expresión de CTGF aumenta conforme avanza la fibrosis, hasta ser mayor en la cirrosis, sin embargo, la proteína en el hígado refleja un valor contrario, siendo el hígado control (sin fibrosis) el que contiene más cantidad de esta proteína, y desde que inicia la fibrosis su cantidad disminuye. En el modelo de reversión CTGF se comporta de manera similar al modelo de fibrosis, siendo

que la cantidad de proteína del CTGF es más alta en el hígado en proceso de reversión a pesar de que los niveles de expresión génica sean más bajos (Figura 23). CTGF no varía en el suero, no se encontraron diferencias en el hígado control en comparación con un hígado con fibrosis ni en las diferentes etapas de la fibrosis hepática ni tampoco hallamos diferencia sérica en el modelo de reversión en el suero (Figura 24).

Una posible explicación a la diferencia entre el transcrito y el péptido detectados en el hígado es la proteólisis del último ya que CTGF es susceptible a este tipo de degradación. Se han detectado fragmentos de CTGF en el sobrenadante de cultivos de varios tipos celulares (fibroblastos) así como en fluido corporal y en suero de pacientes que cursan algún tipo de enfermedad fibrótica [67]. Existen estudios que indican que las Metaloproteinasas de Matriz (MMPs), que se encuentran aumentadas en la fibrosis hepática y que degradan a componentes de la ECM, tienen la capacidad de degradar a CTGF sin afectar su actividad biológica [68, 69].

Hashimoto en 2002, demostró que diferentes MMPs (MMP-1,-3,-7 y -13) escinden a CTGF en la región que une a los dominios factor von Willebrand tipo C y el dominio trombospondina-1, y los fragmentos resultantes seguían teniendo actividad biológica [68]; el anticuerpo primario usado en la determinación de CTGF en el hígado y en el suero se une a esta región, por lo que es posible que las determinaciones realizadas no detecten las fracciones generadas por la proteólisis por MMPs y sea la explicación de la discrepancia entre el comportamiento de la expresión génica y la cantidad de proteína de CTGF.

Actualmente existen estudios que vinculan la sobreexpresión de CTGF sérico en pacientes que cursan fibrosis hepática avanzada por infección crónica con virus

de hepatitis B y C [59, 70] por lo que resalta el papel de CTGF en la fibrosis avanzada, sin embargo, los paneles para la detección así como sus kits no son públicos ya que esperan patente, por lo que podría ser que el anticuerpo se una a otra región de la proteína la cual detecte tanto la forma completa, así como las fracciones generadas.

CTGF es un blanco terapéutico con mucho potencial, en este 2016, Li y colaboradores [72], desarrollaron un anticuerpo anti-CTGF, siendo probado en ratones a los que luego se les indujo fibrosis severa con CCl_4 , demostrando que bloqueando a CTGF la fibrosis es inhibida casi por completo, además de inhibir la expresión de otras proteínas fibrogénicas como el PDGF y el $\text{TGF-}\beta$ [71,72]; confirmando que cada vez hay más evidencia del papel fundamental de CTGF en el desarrollo de la fibrosis hepática.

El presente trabajo, demuestra que la expresión de CTGF aumenta conforme avanza la severidad de la fibrosis y teniendo en cuenta que CTGF puede ser escindida sin perder su actividad biológica nos da como perspectiva evaluar en cada etapa del espectro de la fibrosis hepática a CTGF de forma completa y escindida, con anticuerpos que puedan reconocer los fragmentos generados.

La mayoría de los pacientes que presentan fibrosis hepática, cursan con algún grado de inflamación, y por ende una expresión aumentada de IL-6 [23], sin embargo, el modelo de fibrosis hepática por CCl_4 no genera una inflamación observable (Figura 12) [17]. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que IL-6 no tiene un papel, al menos en la generación de componentes de la ECM durante la fibrosis hepática, siendo que disminuye en el hígado y en suero desde la fibrosis inicial.

Es conocido que el único órgano interno con capacidad de regenerarse es el hígado, ya sea de una resección del dos tercios de tejido hepático o de una fibrosis severa (la regeneración del hígado cirrótico sigue en controversia) [20], en general esto se logra inhibiendo el agente causal, ya sea cambiando el estilo de vida, eliminando al virus o en nuestro caso el CCl₄, generando así un modelo de reversión de la fibrosis hepática, en donde observamos datos compatibles con la regeneración del tejido, dados por la presencia de reacciones ductulares (Figura 21) uno de los principales mecanismos implicados en la regeneración hepática [21]. Aunado a la presencia de estos hallazgos, se observó el aumento de IL-6 tanto en el hígado como en el suero. IL-6 es una citocina necesaria para la diferenciación de las células ovas en condiciones de regeneración hepática. A pesar de que no se observó aumento de la expresión génica de CTGF durante la reversión de la fibrosis, la cantidad de esta proteína detectada en el hígado se incrementó, posiblemente propiciando a la generación de reacciones ductulares para poder regenerar el parénquima hepático, evitando la proteólisis por las MMPS, sin embargo, este es un resultado que hay que tomar con cautela pues como se discutió con anterioridad, sólo pudimos cuantificar al CTGF de forma completa y es fundamental determinarlo de forma escindida ya que no pierde función biológica y podría ser que los niveles de CTGF sean aún mayores de lo que pudimos cuantificar. Siendo capaces de completar la historia de CTGF, se podría sugerir como posible tratamiento antifibrótico que lo empleara como blanco terapéutico.

Queda como perspectiva de este trabajo, evaluar a las formas escindidas de CTGF tanto en el curso de la fibrosis hepática y en la resolución de la misma, para así entender el papel de CTGF tanto de forma completa y fragmentada.

9. CONCLUSIÓN.

La expresión génica del Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF), aumenta conforme aumenta la severidad de la fibrosis hepática, sin embargo, la proteína en el hígado disminuye desde la fibrosis inicial y a nivel sérico no se observan cambios, por lo que a pesar de estar involucrado en la fibrosis en otros tejidos, el péptido CTGF no puede diferenciar etapas de la fibrosis hepática, sin embargo, se necesitan más estudios para aclarar su papel en la enfermedad hepática.

Se pudo relacionar concentraciones altas de CTGF con la regeneración del hígado mediante la generación de las reacciones ductulares, a pesar de que existe menor expresión génica, las concentraciones de CTGF en el hígado aumentan en el proceso de reversión aunque no se pueda observar algún cambio en sus concentraciones en suero, sin embargo recordar que por detalles técnicos sólo vemos la forma completa de CTGF, y la fracciones escindidas siguen siendo desconocidas.

10. REFERENCIAS

1. Abdel-Misih, S.R. and M. Bloomston, *Liver anatomy*. Surg Clin North Am, 2010. **90**(4): p. 643-53.
2. Tzanakakis, E.S., et al., *Extracorporeal tissue engineered liver-assist devices*. Annu Rev Biomed Eng, 2000. **2**: p. 607-32.
3. Senoo, H., *Structure and function of hepatic stellate cells*. Med Electron Microsc, 2004. **37**(1): p. 3-15.
4. Hernandez-Gea, V. and S.L. Friedman, *Pathogenesis of liver fibrosis*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 425-56.
5. Susan E. Mulroney, A.K.M., *Netter. Fundamentos de Fisiología*, Masson, Editor 2011. p. 283-290.
6. Mulroney, S.E., A.K. Myers, and F.H. Netter, *Netter's essential physiology*. Second edition. ed. xvi, 402 pages.
7. Mokdad, A.A., et al., *Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis*. BMC Med, 2014. **12**: p. 145.
8. Ramos-Lopez, O., et al., *Genetic, metabolic and environmental factors involved in the development of liver cirrhosis in Mexico*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(41): p. 11552-66.
9. Schuppan, D. and N.H. Afdhal, *Liver cirrhosis*. Lancet, 2008. **371**(9615): p. 838-51.
10. Zarrilli, F., et al., *An update on laboratory diagnosis of liver inherited diseases*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 697940.
11. Lee, Y.A., M.C. Wallace, and S.L. Friedman, *Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story*. Gut, 2015. **64**(5): p. 830-41.

12. Asahina, K., *Hepatic stellate cell progenitor cells*. J Gastroenterol Hepatol, 2012. **27 Suppl 2**: p. 80-4.
13. Jeong, W.I., O. Park, and B. Gao, *Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis*. Gastroenterology, 2008. **134**(1): p. 248-58.
14. Knodell, R.G., et al., *Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis*. Hepatology, 1981. **1**(5): p. 431-5.
15. Bedossa, P. and T. Poynard, *An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group*. Hepatology, 1996. **24**(2): p. 289-93.
16. Thampanitchawong, P. and T. Piratvisuth, *Liver biopsy: complications and risk factors*. World J Gastroenterol, 1999. **5**(4): p. 301-304.
17. Domitrovic, R., et al., *Liver fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride and its reversion by luteolin*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **241**(3): p. 311-21.
18. Suarez-Cuenca, J.A., et al., *Partial hepatectomy-induced regeneration accelerates reversion of liver fibrosis involving participation of hepatic stellate cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(7): p. 827-39.
19. Kong, D., et al., *Clearance of activated stellate cells for hepatic fibrosis regression: molecular basis and translational potential*. Biomed Pharmacother, 2013. **67**(3): p. 246-50.
20. Taub, R., *Liver regeneration: from myth to mechanism*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 836-47.
21. Williams, M.J., A.D. Clouston, and S.J. Forbes, *Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion*. Gastroenterology, 2014. **146**(2): p. 349-56.
22. Kaur, S., H. Siddiqui, and M.H. Bhat, *Hepatic Progenitor Cells in Action: Liver Regeneration or Fibrosis?* Am J Pathol, 2015. **185**(9): p. 2342-50.
23. Clavien, P.A., *IL-6, a key cytokine in liver regeneration*. Hepatology, 1997. **25**(5): p. 1294-6.
24. Ji, T., et al., *Distinct role of interleukin-6 and tumor necrosis factor receptor-1 in oval cell-mediated liver regeneration and inflammation-associated hepatocarcinogenesis*. Oncotarget, 2016.
25. Bradham, D.M., et al., *Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10*. J Cell Biol, 1991. **114**(6): p. 1285-94.
26. Kim, H.S., et al., *Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 12981-6.
27. Dziadzio, M., et al., *N-terminal connective tissue growth factor is a marker of the fibrotic phenotype in scleroderma*. QJM, 2005. **98**(7): p. 485-92.
28. Sato, S., et al., *Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis*. J Rheumatol, 2000. **27**(1): p. 149-54.
29. Riser, B.L., et al., *Urinary CCN2 (CTGF) as a possible predictor of diabetic nephropathy: preliminary report*. Kidney Int, 2003. **64**(2): p. 451-8.
30. Kubota, S., et al., *Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets*. J Biochem, 2004. **136**(3): p. 279-82.
31. Weiskirchen, R., *CCN proteins in normal and injured liver*. Frontiers in Bioscience, 2011. **16**: p. 1939-1961.
32. Gressner, O.A. and A.M. Gressner, *Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases*. Liver Int, 2008. **28**(8): p. 1065-79.
33. Gupta, S., et al., *Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis*. Kidney Int, 2000. **58**(4): p. 1389-99.
34. Lau, L.F. and S.C. Lam, *The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection*. Exp Cell Res, 1999. **248**(1): p. 44-57.

35. Bork, P., *The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor*. FEBS Lett, 1993. **327**(2): p. 125-30.
36. Albiston, A.L. and A.C. Herington, *Cloning and characterization of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3) in the rat*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **166**(2): p. 892-7.
37. Brinkman, A., et al., *Isolation and characterization of a cDNA encoding the low molecular weight insulin-like growth factor binding protein (IBP-1)*. EMBO J, 1988. **7**(8): p. 2417-23.
38. Mancuso, D.J., et al., *Structure of the gene for human von Willebrand factor*. J Biol Chem, 1989. **264**(33): p. 19514-27.
39. Holt, G.D., M.K. Pangburn, and V. Ginsburg, *Properdin binds to sulfatide [Gal(3-SO₄)beta 1-1 Cer] and has a sequence homology with other proteins that bind sulfated glycoconjugates*. J Biol Chem, 1990. **265**(5): p. 2852-5.
40. Hoshijima, M., et al., *CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin alpha5beta1*. FEBS Lett, 2006. **580**(5): p. 1376-82.
41. Nishida, T., et al., *Demonstration of receptors specific for connective tissue growth factor on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8)*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(3): p. 905-9.
42. Wahab, N.A., H. Brinkman, and R.M. Mason, *Uptake and intracellular transport of the connective tissue growth factor: a potential mode of action*. Biochem J, 2001. **359**(Pt 1): p. 89-97.
43. Tagawa, T., et al., *The cell cycle-dependent nuclear import of v-Jun is regulated by phosphorylation of a serine adjacent to the nuclear localization signal*. J Cell Biol, 1995. **130**(2): p. 255-63.
44. Winkler, J.L., et al., *Inhibition of connective tissue growth factor by small interfering ribonucleic acid prevents increase in extracellular matrix molecules in a rodent model of diabetic retinopathy*. Mol Vis, 2012. **18**: p. 874-86.
45. Abraham, D.J., et al., *Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15220-5.
46. Duncan, M.R., et al., *Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP*. FASEB J, 1999. **13**(13): p. 1774-86.
47. Wang, Q., et al., *Cooperative interaction of CTGF and TGF-beta in animal models of fibrotic disease*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2011. **4**(1): p. 4.
48. Fu, M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 45888-94.
49. Ivkovic, S., et al., *Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development*. Development, 2003. **130**(12): p. 2779-91.
50. Murawaki, Y., et al., *Clinical significance of serum hyaluronan in patients with chronic viral liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 1996. **11**(5): p. 459-65.
51. Kennedy, L., et al., *CCN2 is necessary for the function of mouse embryonic fibroblasts*. Exp Cell Res, 2007. **313**(5): p. 952-64.
52. Song, J.J., et al., *Connective tissue growth factor (CTGF) acts as a downstream mediator of TGF-beta1 to induce mesenchymal cell condensation*. J Cell Physiol, 2007. **210**(2): p. 398-410.
53. Kothapalli, D., N. Hayashi, and G.R. Grotendorst, *Inhibition of TGF-beta-stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle*. FASEB J, 1998. **12**(12): p. 1151-61.

54. Gao, R. and D.R. Brigstock, *A novel integrin alpha5beta1 binding domain in module 4 of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes adhesion and migration of activated pancreatic stellate cells*. Gut, 2006. **55**(6): p. 856-62.
55. Wahab, N.A. and R.M. Mason, *A critical look at growth factors and epithelial-to-mesenchymal transition in the adult kidney. Interrelationships between growth factors that regulate EMT in the adult kidney*. Nephron Exp Nephrol, 2006. **104**(4): p. e129-34.
56. Allen, J.T., et al., *Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (Connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **21**(6): p. 693-700.
57. Paradis, V., et al., *Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells*. Lab Invest, 2002. **82**(6): p. 767-74.
58. Huang, G. and D.R. Brigstock, *Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor*. Front Biosci (Landmark Ed), 2012. **17**: p. 2495-507.
59. Gressner, O.A., et al., *Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in serum is an indicator of fibrogenic progression and malignant transformation in patients with chronic hepatitis B infection*. Clin Chim Acta, 2013. **421**: p. 126-31.
60. Gressner, O.A., et al., *Differential effects of TGF-beta on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes*. J Hepatol, 2007. **47**(5): p. 699-710.
61. Park, H.J., et al., *Comparison of TGF-beta, PDGF, and CTGF in hepatic fibrosis models using DMN, CCl₄, and TAA*. Drug Chem Toxicol, 2015: p. 1-8.
62. Pi, L., et al., *Connective tissue growth factor and integrin alphavbeta6: a new pair of regulators critical for ductular reaction and biliary fibrosis in mice*. Hepatology, 2015. **61**(2): p. 678-91.
63. Yang, A.T., et al., *Connective tissue growth factor induces hepatic progenitor cells to differentiate into hepatocytes*. Int J Mol Med, 2013. **32**(1): p. 35-42.
64. Ding, Z.Y., et al., *Transforming growth factor beta induces expression of connective tissue growth factor in hepatic progenitor cells through Smad independent signaling*. Cell Signal, 2013. **25**(10): p. 1981-92.
65. Untergasser, A., et al., *Primer3--new capabilities and interfaces*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(15): p. e115.
66. Koressaar, T. and M. Remm, *Enhancements and modifications of primer design program Primer3*. Bioinformatics, 2007. **23**(10): p. 1289-91.
67. Yang, D.H., et al., *Identification of glycosylated 38-kDa connective tissue growth factor (IGFBP-related protein 2) and proteolytic fragments in human biological fluids, and up-regulation of IGFBP-rP2 expression by TGF-beta in Hs578T human breast cancer cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(7): p. 2593-6.
68. Hashimoto, G., et al., *Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36288-95.
69. Pi, L., et al., *A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motif 7: a new protease for connective tissue growth factor in hepatic progenitor/oval cell niche*. Am J Pathol, 2015. **185**(6): p. 1552-63.
70. Zoheiry, M.M., et al., *Serum Markers of Epithelial Mesenchymal Transition as Predictors of HCV-induced Liver Fibrosis, Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma*. Electron Physician, 2015. **7**(8): p. 1626-37.
71. Li, G., et al., *Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats*. J Gene Med, 2006. **8**(7): p. 889-900.
72. Li, S., et al., *A virus-like particle-based connective tissue growth factor vaccine suppresses carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32155.

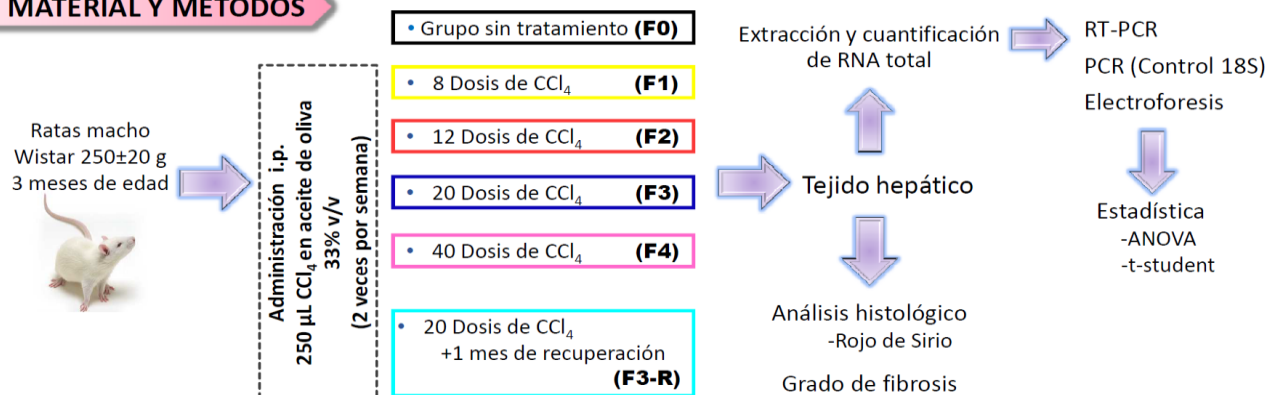
INTRODUCCIÓN

El Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CCN2/CTGF) es una proteína involucrada en la cicatrización. Se ha documentado una correlación entre CCN2/CTGF en suero y la fibrosis en pulmón, piel y riñón. En células estelares hepáticas, esta proteína es inducida por TGF- β 1 y se ha sugerido como un amplificador río abajo de la función de esta citocina. CCN2/CTGF se encuentra incrementada en pacientes con enfermedad hepática crónica, además se ha propuesto como un biomarcador del avance de la fibrosis en sujetos con infección con Virus de Hepatitis B. Sin embargo no se conoce la dinámica de su expresión durante el transcurso de la fibrosis en el tejido hepático.

OBJETIVO

Estudiar la expresión de CCN2/CTGF en el transcurso de la fibrosis hepática en un modelo murino.

MATERIAL Y MÉTODOS



RESULTADOS

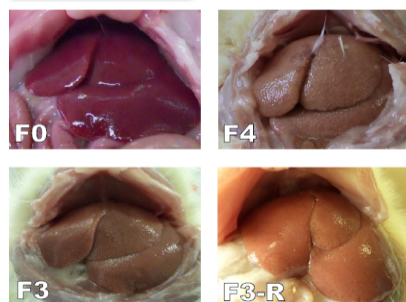


Figura 1. Imágenes de los hígados en diferentes etapas de fibrosis.

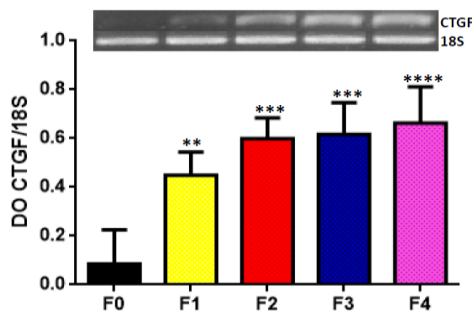


Figura 2. Expresión de CTGF/CCN2 en el progreso de la fibrosis. Los resultados se muestran como Media \pm EE. n=6. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs. F0.

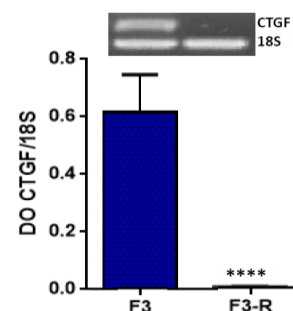


Figura 3. Comparación de la expresión de CTGF/CCN2 entre los grupos F3 y F3-R. Los resultados se muestran como Media \pm EE. n=6. ****p<0.0001.

CONCLUSIONES

CCN2/CTGF se sobreexpresa en la fibrosis hepática inducida por CCl₄, independientemente de su grado de avance. La expresión de este gen disminuye durante la reversión de la fibrosis.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por "Estímulo Antonio Ariza Cañadilla para la Investigación en Hepatología 2014", Fundación Mexicana para la Salud Hepática y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CB-2013-221137 (México).

