



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**

TESIS

**EFFECTO DE LOS α/β ADRENOBLOQUEADORES, DOXAZOSINA Y
CARVEDILOL EN LA REVERSIÓN DE LA CIRROSIS HEPÁTICA EN
HÁMSTERES INDUCIDOS CON CCL₄**

PRESENTA

Ing. Sandra Alejandra Serna Salas

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE
TOXICOLOGÍA**

TUTOR (ES)

Dr. Martin Humberto Muñoz Ortega

Dr. Javier Ventura Juárez

Asesor (a)

M. en C. Sandra Luz Martínez Hernández.

Aguascalientes, Ags., 10 de noviembre del 2016



DATOS GENERALES

Título del proyecto

Efecto de los α/β adreno-bloqueadores doxazosina y carvedilol en la reversión de la cirrosis hepática en hámsteres inducidos con CCl₄.

Datos del alumno

Ing. Sandra Alejandra Serna Salas ID 98613

Correo: iq.alesa@gmail.com

Comité tutorial

- ✓ Tutor Dr. Martin Humberto Muñoz Ortega
- ✓ Cotutor: Dr. Javier Ventura Juárez
- ✓ Asesor: M. en C. Sandra Luz Mtz. Hdz.

DESCRIPCIÓN BREVE

En este trabajo se muestra el efecto de los medicamentos alfa/beta adrenobloqueadores, doxazosina y carvedilol sobre la reversión de la cirrosis hepática en hámsteres inducida con tetracloruro de carbono.





AUTORIZACIONES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutores designados de la estudiante **SANDRA ALEJANDRA SERNA SALAS** con ID **98613** quien realizó la tesis titulada: **EFEECTO DE LOS α/β ADRENOBLOQUEADORES, DOXAZOSINA Y CARVEDILOL EN LA REVERSIÓN DE LA CIRROSIS HEPÁTICA EN HÁMSTERES INDUCIDOS CON CCL4**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 20 de octubre de 2016.

Martin Humberto Muñoz Ortega

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega
Tutor de tesis

Dr. Javier Ventura Juárez
Cotutor de tesis

M. en C. Sandra Luz Martínez Hernández
Asesora de tesis

c.c.p.- I.Q. Sandra Alejandra Serna Salas
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejero Académico Dr. Martín Gerardo Rodríguez
c.c.p.- Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch - Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

SANDRA ALEJANDRA SERNA SALAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA TOXICOLOGÍA
PRESENTE.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“Efecto de los α/β Adrenobloqueadores, Doxazosina y Carvedilol con reversión de la cirrosis hepática en hámsteres inducidos con CCL4”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 24 de octubre de 2016

“Se lumen proferre”

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



cc.p.- Archivo.



AGRADECIMIENTOS

Principalmente al Doctor Martín Muñoz Ortega y al Doctor Javier Ventura Juárez, por haber confiado en mí y siempre estar al pendiente, también por otorgarme un poco de su experiencia y conocimientos lo cual aprecio mucho, sin ellos hubiera sido difícil seguir un buen camino, su participación fue lo más valioso que pude tener a lo largo de esta experiencia pues gracias a ustedes logre comprender y tener una visión muchísimo más amplia de lo que significa la investigación y la satisfacción que deja el hacerlo, con toda sinceridad y aprecio les agradezco que hayan aceptado ser mis tutores y haberme llevado por un buen camino.

A mi asesora la M. en C. Sandra Martínez, por su apoyo y consejos.

A la Doctora Liseth Rubí Aldaba Muruato por su apoyo, enseñanzas y consejos.

Agradezco también a CONACYT por darme la oportunidad de realizar mis estudios en la Universidad Autónoma de Aguascalientes con el apoyo otorgado a través de la beca 389553 y poder realizar el proyecto 134487 de CONACYT con el apoyo incondicional de mis tutores, también a la UAA pues me concedió ser parte de este posgrado.

Finalmente, para los que sin saberlo, aportaron su granito de arena a lo largo de la realización de mi proyecto (compañeros de laboratorio, amigos y familia).

La ciencia es más que solo conocimiento. Es una manera de pensar, una manera de interrogar escépticamente al universo

Carl Edward Sagan

(1934-1996). Astrónomo, astrofísico y cosmólogo



DEDICATORIAS

Esta tesis me la dedico principalmente a mí por el esfuerzo que tuve, nunca me di por vencida incluso cuando iba entrar a la maestría, pues sabía que no sería fácil pero con perseverancia y esfuerzo lo logre, sé que la lucha aún no termina, todavía falta el último esfuerzo, también por que logre encontrar en la investigación una pasión que no sabía que tenía pues aún me asombran muchos fenómenos y cada que leo algo nuevo me llena de sorpresa y ganas de querer saber más.

Se la dedico a mis papas en especial a mi mamá pues ella siempre confió en mí.

A mi novio pues siempre me empujo para seguir adelante y no dejarme caer por las adversidades que se presentaron en mi camino.

A mi bebe porque siempre estuvo al lado mío sin decir nada pero acompañándome en mis desveladas y preocupaciones (Flak).

Finalmente a todos mis amigos quienes siempre mostraron interés ante mis nuevos retos.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN (ESPAÑOL).....	11
RESUMEN (INGLÉS).....	12
...CAPÍTULO I INTRODUCCION y ANTECEDENTES...	13
1.1 Cirrosis Hepática	14
1.1.1 Hígado.....	14
1.1.1.1 Histología del hígado.....	14
1.1.1.2 Heterogeneidad celular del hígado.....	17
1.1.1.3 Fisiología del hígado.....	20
1.1.2 Daño hepático.....	20
1.1.2.1 Fibrosis hepática.....	21
1.1.2.2 Cirrosis hepática.....	21
1.1.2.3 Células implicadas en el daño hepático.....	22
1.2 Hepatotoxicidad	29
1.2.1 Tetracloruro de carbono (CCl ₄).....	29
1.2.1.1 Toxicidad del tetracloruro de carbono.....	30
1.2.1.2 Mecanismo de acción del CCl ₄	31
1.3 Reversión de cirrosis	34
...CAPÍTULO II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA...	37
2.1 Pregunta de investigación	38
2.2 Objetivo general	39
2.2.1 Objetivos particulares.....	39
2.3 Justificación	40
2.4 Hipótesis	41
2.5 Metas	41
...CAPÍTULO III METODOLOGÍA...	42
3.1 Diseño Experimental	43
3.2 Modelo de cirrosis hepática en hámsteres	44
3.3 Tratamientos con doxazosina y carvedilol	45
3.4 Sacrificio de los animales	45
3.4 Procesamiento de muestras biológicas	45



3.5 Procesamiento de tejidos	46
3.5.1 Procesamiento de tejidos en parafina	46
3.5.2 Técnicas histológicas	46
3.5.2.1 Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).....	46
3.5.2.2 Tinción Rojo Sirio y su análisis con microscopia de polarización	46
3.5.2.3 Localización de antígenos: inmunohistoquímica para detección de células estelares hepáticas activadas.....	47
3.7 Técnicas moleculares	47
3.7.1 Western blot	47
3.7.2 Extracción de ARN.....	48
3.7.2 Retrotranscripción de ARN.....	48
3.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	48
3.8 Análisis estadístico	49
...CAPITULO VI RESULTADOS...	50
4.1 Cirrosis hepática en hámsteres inducidos con tetracloruro de carbono y eficiencia de los alfa/beta adrenobloqueadores en el tratamiento contra cirrosis hepática.	51
4.1.1 Porcentaje de mortalidad en hámsteres tratados con CCl ₄	51
4.1.2 Cambios físicos en hámsteres tratados con CCl ₄	51
4.1.3 Descripción morfológica de la arquitectura hepática. Cambios físicos del hígado cirrótico del hámster	52
4.1.4 Pruebas de función hepática en grupos experimentales.	53
4.1.5 Alteraciones morfológicas en tejido hepático de grupo cirrótico y recuperación histológica endógena y con los alfa/beta adrenobloqueadores.	55
4.1.6 Determinación de colágeno tipo I en cirrosis hepática en hámsteres y durante el tratamiento con doxazosina y carvedilol.....	57
4.2 Identificación y cuantificación de células estelares activadas	61
4.2 Identificación y cuantificación de marcadores de fibrosis hepática en grupos experimentales	64
4.2.1 Determinación del Factor de crecimiento transformante beta (TGF- beta).....	64
4.2.2 Determinación de la metaloproteinasa 13 (MMP-13).....	65
4.2.2 Determinación del inhibidor Tisular de Metaloproteinasa 2 (TIMP-2).....	66

...CAPITULO VII DISCUSIÓN.....	68
...CAPITULO VIII CONCLUSIÓN.....	75
...CAPITULO IX REFERENCIAS.....	77
Apéndice.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación estructural del hígado.....	15
Figura 2. Aporte sanguíneo y conducto biliar del hígado.....	15
Figura 3. Fotomicrografía de la arquitectura microscópica básica, descripción microanatómica del hígado.....	16
Figura 4. Estructura de los hepatocitos y triada portal.....	19
Figura 5. Distribución de los hepatocitos por las zonas acinares.....	20
Figura 6. Organización celular en el hígado.....	24
Figura 7. Hígado fibrótico.....	24
Figura 8. Proceso de activación de las células estelares hepáticas y su respuesta a diversas citocinas.....	25
Figura 9. Molécula del tetracloruro de carbono.....	30
Figura 10. Reacción de bioactivación del tetracloruro de carbono por la isoforma CYP2E1.....	31
Figura 11. Mecanismo de acción del CCl ₄	33
Figura 12. Micrografía electrónica que muestra la relación entre las CEHs y las terminaciones nerviosas en el hígado humano normal.....	35
Figura 13. Diseño Experimental.....	43
Figura 14. Cambios físicos en hámsteres, efecto del daño hepático.....	52
Figura 15. Hígado cirrótico e intacto de hámster.....	53
Figura 16. Estructura histológica de hígado cirrótico, tratados con alfa/beta adrenobloqueadores, placebo e intacto de hámster teñido con H-E.....	56
Figura 17. Fibras de colágeno tipo I y III distribuidas alrededor de vena porta y central en tejido de grupos experimentales, tinción Rojo Sirio microscopia con luz polarizada.....	59



Figura 18. Fibras de colágeno tipo I y III distribuidas en tejido de grupos experimentales, tinción Rojo Sirio con microscopia de luz polarizada.....	60
Figura 19. Identificación de α -SMA para células estelares hepáticas activadas	63
Figura 20. Expresión y cuantificación de α -SMA para células estelares hepáticas activadas y TGF- β	65
Figura 21. Expresión y cuantificación de la Metaloproteinasa 13 y TIMP-2 en grupos experimentales.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

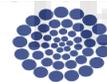
Tabla 1. Valores de pesos en hámsteres para tratamiento con CCl ₄ y la cantidad respectiva del tóxico a administrar.....	44
Tabla 2. Anticuerpos secundarios y primarios utilizados	47

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Porcentaje de mortalidad de animales tratados con tetracloruro de carbono.....	51
Grafica 2: Alteraciones de las transaminasas en suero.....	54
Grafica 3: Disminución de Albúmina en Grupo cirrótico control contra grupos tratados.....	55

ACRÓNIMOS

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido Ribonucleico	ARN
Alanino aminotransferasa	ALT
Alfa actina de músculo liso	α-SMA
Aspartato aminotransferasa	AST
Calcio	Ca
Carvedilol	CARVE
Células estelares hepáticas	CEHs
Células presentadores de antígenos	CPA
Centrolobulillar	CL
Citocromo P450	CYP
Doxazosina	DOXA
Colaboradores	Cols.
Espacio portal	PT
Especies reactivas de nitrógeno	NOX
Especies reactivas de oxígeno	ROX
Factor de crecimiento transformante β	TGF-β
Factor de necrosis tumoral α	TNF-α
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF
Hematoxilina-Eosina	H-E
Inmunoglobulina G	IgG
Matriz extracelular	MEC
Metaloproteinasa 13	MMP-13
Metaloproteinasa 9	MMP-9
Metaloproteinasas	MMPs
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Retículo endoplásmico	RE
Retículo endoplásmico rugoso	RER
Tetracloruro de carbono	CCL4
Vena central	CV
Zona media	MZ
Zona periportal	PP



RESUMEN (ESPAÑOL)

La cirrosis hepática es una enfermedad que afecta a una amplia población en el mundo y constituye la quinta causa de muerte.

Se estableció un modelo de cirrosis hepática en hámster utilizando tetracloruro de carbono como sustancia hepatotóxica, una vez desarrollada la enfermedad, se usaron adrenobloqueadores alfa y beta (Doxazosina y Carvedilol) para revertir el daño en tejido hepático.

Para comprobar la eficiencia de tales medicamentos en la reversión de cirrosis hepática, se analizó en suero a las transaminasas y albúmina conocidas por ser buenos marcadores de fusión hepática, también la recuperación histológica y la expresión de las células estelares hepáticas activadas conocidas por ser las principales responsables de la acumulación de colágeno en tejido cirrótico por medio de α -SMA y finalmente la expresión de MMP-13, TGF- β y el TIMP-2. Se demostró que el uso de los adreno bloqueadores (Doxazosina y Carvedilol), es efectivo para revertir el daño hepático durante la cirrosis hepática, los marcadores analizados alcanzaron valores similares al grupo de hámsteres intactos (sanos), todos estos resultados sugieren que los medicamentos son buenos candidatos para revertir la cirrosis hepática.

RESUMEN (INGLÉS)

Liver cirrhosis is a disease that affects large numbers of people, it is the fifth cause of death worldwide.

We made a liver cirrhosis model in hamster using carbon tetrachloride as a hepatotoxic substance, once developed the disease, we used adrenoblockers alpha and beta (doxazosin and carvedilol) to reverse the damage in the hepatic tissue.

To prove the efficiency of such drugs in reversing liver cirrhosis, we analyzed the transaminases and albumin in serum, both known to be good markers of liver function, also histological recovery and expression of hepatic stellate cells activated known to be primarily responsible for the accumulation of collagen in cirrhotic tissue through α -SMA, finally the expression of MMP-13, TGF- β and TIMP-2. It showed that the use of adrenoblockers alpha and beta was effective to reverse the lesions in liver during hepatic cirrhosis, the analyzed markers got values very similar to intact group (healthy), this results suggest that this drugs are good candidates to reverse hepatic cirrhosis.



...CAPÍTULO I INTRODUCCION y ANTECEDENTES...

1. Introducción

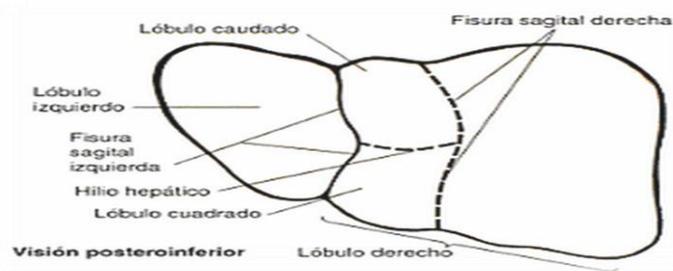
1.1 Cirrosis Hepática

1.1.1 Hígado

El hígado es uno de los órganos más importantes de los mamíferos, tiene a su cargo diversas funciones necesarias para el buen funcionamiento del organismo, es el encargado de mantener la homeostasis (ambiente interno en equilibrio), lográndolo con el metabolismo de sustancias exógenas o endógenas; El metabolismo y desintoxicación del organismo, es un punto clave en el daño al hígado, al estar en constante contacto con sustancias nocivas puede llegar a sufrir lesiones importantes e irreparables, se ha analizado el comportamiento del hígado durante tales lesiones, encontrando características específicas que han dado origen a posibles estrategias terapéuticas.

1.1.1.1 *Histología del hígado*

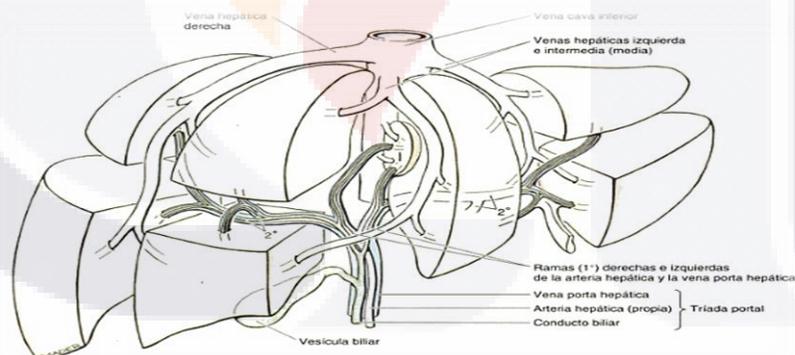
El hígado humano representa del 2 al 3 % del peso corporal total, alrededor de 1.5 kg para un adulto (Guyton, 2001), consume del 25 al 30% de oxígeno (Koolman y Röhm, 2004) y se localiza en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal, justo debajo del diafragma, se subdivide en cuatro lóbulos (derecho, izquierdo, cuadrado y caudado), de los que el derecho y el izquierdo constituyen su mayor parte (Figura. 1) (Gartner y Hiatt, 2002).



(Moore y Dalley, 2007)

Figura. 1. Representación estructural del hígado

El hígado recibe sangre oxigenada de la arteria hepática izquierda y arteria hepática derecha (25% del volumen), y el 75 % restante, de sangre rica en nutrientes a través de la vena porta (Gartner y Hiatt, 2002), la sangre sale por la superficie posterior del órgano a través de las venas suprahepáticas que vierten su contenido en la vena cava inferior, la bilis sale del hígado, a través de los conductos hepáticos derecho e izquierdo, por los que se libera a la vesícula biliar para su concentración y almacenamiento (Figura 2 y 4) (Gartner y Hiatt, 2002).



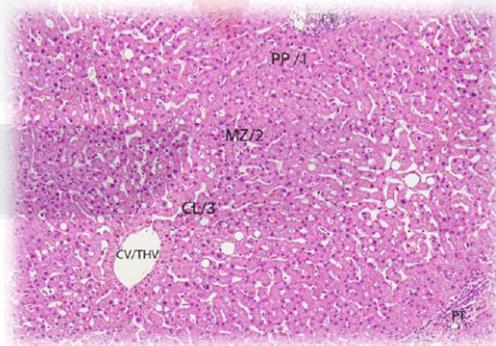
(Moore y Dalley, 2007)

Figura 2. Aporte sanguíneo y conducto biliar del hígado.

La unidad funcional del hígado es el acino hepático descrito por Rappaport en el año 1958 (Figura 3 y 5) (Herrerías y cols., 1996), esta delineado por tres zonas (1, 2 y 3), y centrado por un eje, la vena terminal portal, la zona 1 es la

más próxima, las células encontradas ahí reciben la mayor carga de sustancias y nutrientes generando un gradiente de concentración por lo que en la zona 3 que es la más alejada de la vena porta, la sangre será de menor calidad. Esta forma de concebir el hígado y las diferencias en el gradiente de actividad metabólica en relación con la irrigación, ayudan a explicar el proceso de regeneración, de desarrollo de cirrosis así como esclarecer diferentes aspectos histológicos de la distribución de la bilis en diversas afecciones hepáticas (Herrerías y cols., 1996).

La división del acino hepático se caracteriza por las diferencias encontradas en los hepatocitos, indicando que las funciones del hígado, se realizarán en mayor o menor cantidad según la zona acinar (Figura 5). El glucógeno almacenado así como el glutatión (tripeptido conocido por su alta capacidad antioxidante), son encontrados principalmente en la zona 1, en la zona 3 hay más degradación de glucosa y es la que contiene mayor cantidad de Citocromo P 450, complejo enzimático que participa en diversas reacciones de biotransformación o bioactivación de sustancias, también la zona 3 es rica en retículo endoplásmico liso, en el cual se encuentran enzimas encargadas de la detoxificación de sustancias como el alcohol, todo esto indica que el posible daño inicial se observaría en la zona 3 (Gumucio y Miller, 1981).



(Krishna, 2013)

Figura 3. Fotomicrografía de la arquitectura microscópica básica, descripción microanatómica del hígado. División de los cordones hepatocelulares, zona 1, 2 y 3 del acino, y zona periportal (PP), media (MZ), y centrilobular (CL) del lóbulo. La sangre fluye desde el espacio portal (PT) hasta la vena central, también denominada vénula hepática terminal (CV/THV) (tinción con hematoxilina-eosina, amplificación x100)



1.1.1.2 Heterogeneidad celular del hígado

Dentro del hígado existen diferentes tipos de células que interactúan entre ellas para lograr su buen funcionamiento, el hígado también se compone de matriz extracelular (MEC), su papel es regular la interacción entre las células; está compuesta por diferentes proteínas colágenas y no colágenas como laminina, fibronectina y glucoproteínas extracelulares, las células estelares hepáticas son las encargadas de mantener el equilibrio de este componente en el hígado.

Los canales que conducen la sangre a las venas hepáticas centrolobulillares y que nutre por ambos lados a los hepatocitos son los llamados sinusoides hepáticos rodeados por células endoteliales y células de kupffer, las células estelares hepáticas son células perisinusoidales (Jaramillo y cols., 2006).

a) Hepatocito

Los hepatocitos suelen aparecer organizados en forma de cordones de una o dos células de grosor, separados por sinusoides. Su núcleo es redondo u ovalado y puede contener glucógeno, la membrana celular, está parcialmente expuesta a los sinusoides (superficie baso lateral), forma los canalículos biliares con el hepatocito adyacente (superficie canalicular) y presenta una porción adyacente al canalículo que se une al hepatocito vecino mediante uniones especializadas (superficie lateral), el citoplasma contiene abundante retículo endoplasmático y glucógeno

Los hepatocitos constituyen del 60% al 80% del total de la población celular (Jaramillo y cols., 2006) y son las que realizan las funciones más importantes del hígado (Figura 4) (Krishna, 2013).

b) Células de Kupffer

Las células de Kupffer constituyen uno de los tipos celulares hepáticos en términos de metabolismo y función, más activos, son macrófagos residentes

del hígado y contribuyen a la síntesis de citocinas, factores de crecimiento y mediadores biológicamente activos. Entre las funciones principales de estas células se encuentran la eliminación de sustancias extrañas y la regulación de la respuesta inflamatoria e inmune (Clária y Titos, 2004).

c) Células estelares hepáticas

Las células estelares están ubicadas a lo largo de los sinusoides en el espacio perisinusoidal de Disse (Figura 6), aunque también pueden observarse entre las células parenquimatosas. Clásicamente el espacio de Disse se define como la zona limitada por los hepatocitos y la pared sinusoidal formada por las células endoteliales sinusoidales. Normalmente este espacio contiene fibras nerviosas y algunos componentes de la matriz extracelular (MEC) como, por ejemplo, fibras colágenas de tipos I y III y componentes de la membrana basal (Geerts y cols., 1990).

Dentro del total de células pertenecientes al hígado, en condiciones normales las células estelares representan del 5 al 8 %, se caracterizan por la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas que contienen vitamina A, un retículo endoplasmático rugoso (RER) poco desarrollado y un pequeño aparato de Golgi (Reynaert y cols., 2002), también poseen vesículas sinápticas y se encuentran inervadas por fibras autonómicas, lo que indica que producen neurotransmisores (Oben y cols., 2004).

El origen de las células estelares hepáticas aún no ha sido esclarecido, pues en varios estudios se ha demostrado que expresan proteínas representantes de células mesenquimales como desmina y alfa actina de músculo liso, así como proteína glial fibrilar ácida, característica de células nerviosas, este descubrimiento puso en duda su origen.

Observaciones sugieren que tienen similitudes morfológicas con astrocitos pues estas células según Niki y cols. (1999), se encargan de la reparación del sistema nervioso central (gliosis reactiva), mientras que las células estelares hepáticas juegan un papel clave en la reparación del tejido hepático después



de una lesión en el hígado siendo estas conocidas por ser las principales fibrogénicas al activarse, proceso que sufren tras un daño hepático.

La investigación desarrollada por Niki y cols. (1999), demostró que las células estelares hepáticas activadas expresan nestina, una proteína de filamentos intermedios de clase VI originalmente identificada como un marcador de células madre neurales. La expresión de nestina se estudió por primera vez durante la activación espontánea de las células estelares hepáticas en cultivo.

Un estudio realizado por Shah y cols. (1996), demostró en roedores que células de la cresta neural tienen el potencial de diferenciarse en células mesenquimales y que el TGF- β promueve esta diferenciación, estos investigadores sugirieron la posibilidad de que algunas células de la cresta neural también contribuyen en el desarrollo de las células mesenquimales de los vasos sanguíneos.

En concreto el origen de las células estelares hepáticas es incierto, sin embargo las características que presentan dan aportes significativos para encontrar terapias que inhiban su función una vez que se encuentran activadas.

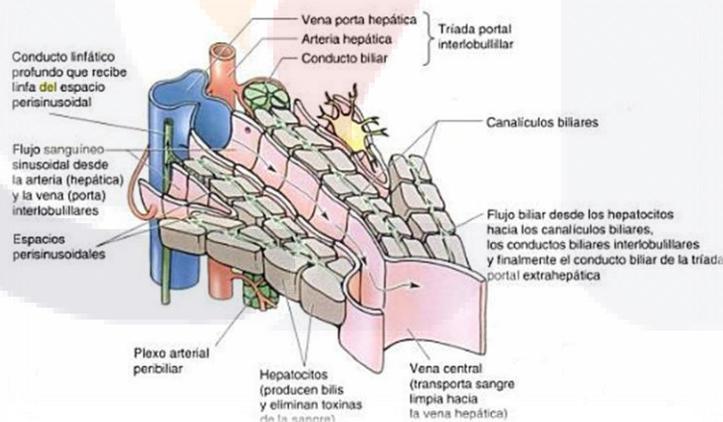


Figura 4. Estructura de los hepatocitos y triada portal, (Moore y Dalley, 2007).

1.1.1.3 Fisiología del hígado

Las principales funciones del hígado son la síntesis de proteínas, producción y almacenamiento de glucógeno, metabolismo y desintoxicación de sustancias nocivas provenientes del medio externo (xenobióticos) y las propias del desecho celular a través del proceso conocido como biotransformación y producción de bilis, sustancia que participa en la digestión de grasas y en la excreción de sustancias; Todas éstas son algunas de las actividades que realiza el hígado, sin embargo no son las únicas pues participa en más de 500 funciones en el organismo (Zakim y Boyer, 2006).

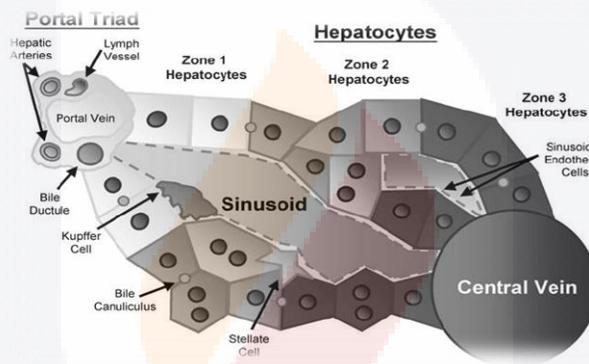
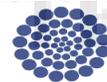


Figura 5. Distribución de los hepatocitos por las zonas acinares.

1.1.2 Daño hepático

El hígado al tener la capacidad de biotransformar tóxicos y sustancias de desecho celular, es vulnerable al daño, cuando este daño a superado la capacidad regenerativa del hígado, se puede ocasionar la muerte del organismo.

El daño hepático puede ser por sustancias químicas, virus, enfermedades biliares, metabólicas, hereditarias, entre otras, los factores son diversos y todos ellas van a conducir a la misma afección en el hígado: fibrosis, posteriormente cirrosis con la posibilidad de desarrollar hepatocarcinoma. Las etiologías más comunes son el alto consumo de alcohol, el hígado graso no



alcohólico y la hepatitis crónica vírica, siendo estas tres causas el 90 % de los casos en occidente (Buey y cols., 2012).

1.1.2.1 *Fibrosis hepática*

La fibrosis hepática es un proceso de lesión crónica generado por un daño constante en el hígado, se caracteriza por un contenido anormal de colágena y otras proteínas que forman la matriz extracelular.

La composición del tejido fibroso producido durante la fibrosis es similar independientemente de la etiología, ocurre en los sitios de mayor lesión y usualmente requiere que el estímulo nocivo persista durante muchos meses o años (Páramo-Hernández y cols., 2010).

El contenido exagerado de matriz extracelular (MEC) se genera como consecuencia a la proliferación y activación de fibroblastos y miofibroblastos, (Sgonc y cols., 2013), células especializadas en la reparación de tejidos, como un proceso de regeneración, síntesis y remodelación de la MEC, se producen diversas moléculas como colágenas, fibras elásticas, glicosaminoglicanos, tenascina y fibronectina, entre otras, tanto a nivel intersticial como en las membranas basales epiteliales y endoteliales (Ramos y cols., 2004).

1.1.2.2 *Cirrosis hepática*

La cirrosis es una alteración histopatológica difusa del hígado caracterizada por pérdida del parénquima hepático, formación de septos fibrosos y nódulos de regeneración estructuralmente anormales, dando lugar a una distorsión de la arquitectura hepática normal y una alteración de la anatomía de la vascularización hepática y microcirculación. Para definir cirrosis se consideran los siguientes datos morfológicos: a) que el proceso sea difuso para excluir lesiones locales o focales; b) que exista necrosis, con lo que queda excluida la fibrosis hepática congénita; c) debe existir regeneración nodular y fibrosis

difusa, quedando excluida la hiperplasia nodular regenerativa y d) debe haber distorsión del patrón arquitectural y alteración vascular (Buey y Cols., 2012).

La cirrosis aparece después de una fibrosis crónica y finalmente convertirse en hepatocarcinoma, este mismo patrón es el que se ha observado en ratas, sin embargo según Fuji y cols. (2010), en ratones se produce en primer lugar fibrosis seguido de hepatocarcinoma, estas evidencias son importantes al momento de establecer un modelo de daño hepático en animales de experimentación, ya que los resultados pueden variar según la especie.

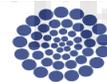
Actualmente se han desarrollado varios modelos experimentales de cirrosis hepática con la finalidad de encontrar estrategias terapéuticas para disminuir los casos de esta enfermedad, el tetracloruro de carbono (CCl_4), es un organoclorado altamente hepatotóxico y actualmente muy usado para inducir cirrosis en modelos de roedores.

1.1.2.3 Células implicadas en el daño hepático

Durante una lesión hepática, ya sea por sustancias tóxicas, por virus o algún otro factor que logre afectar el buen funcionamiento del hígado, se van a suscitar una serie de procesos que generaran un daño mayor al hígado en los cuales se encuentran implicadas poblaciones celulares residentes del hígado, las más importantes son las células de Kupffer, las células estelares hepáticas y los mismos hepatocitos, éstas trabajan con el objetivo de reparar el daño a través de la regeneración de tejido, sin embargo tal reparación agrava la lesión provocando más muerte celular.

I. Células de Kupffer en lesión hepática.

Las células de Kupffer desempeñan un papel fisiopatológico destacado en el daño hepático ocasionado por endotoxinas o alcohol y en la patogénesis de la inflamación y fibrosis hepática. Cuando existe un daño en el hepatocito, estas células se activan, se considera que los signos indicativos son el incremento de su actividad fagocítica, la mitosis, el aumento de la rugosidad de la membrana,



así como la liberación de numerosos compuestos con actividad biológica (Clária y Titos, 2004).

Las células de Kupffer activadas liberan una serie de agentes solubles, incluidas citocinas como el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β), el Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), además de especies reactivas de oxígeno y otros factores, estos tienen un efecto sobre las células estelares hepáticas, con lo que tendrán una participación en la fibrogénesis (Cubero y Nieto, 2006).

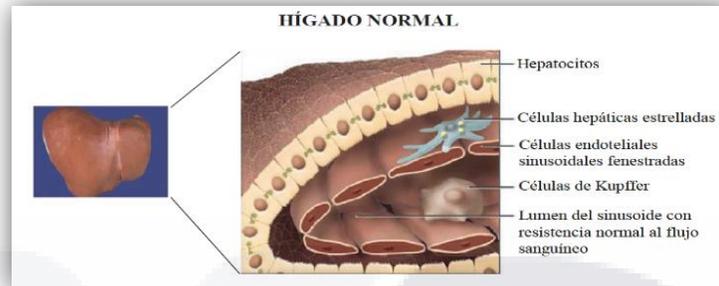
II. Células estelares hepáticas en lesión hepática.

Varias investigaciones han identificado que las células estelares hepáticas (CEHs) ante estímulos agresivos como virus, alcohol o cualquier xenobiótico, mediante el proceso de "activación", se transforman en otras totalmente distintas, morfológicamente conocidas como miofibroblastos con múltiples funciones adicionales como la producción de matriz extracelular, actualmente hay consenso en que la activación de las CEHs es el eje central de la fibrogénesis hepática, además de su capacidad para producir fibrosis, estas células también se comportan como células presentadores de antígenos (CPA) y células progenitoras capaces de diferenciarse en células endoteliales y en hepatocitos, lo cual destaca su gran funcionalidad y su importante papel en la regeneración del hígado (Páramo-Hernández y cols., 2010).

II.1 Activación de las células estelares hepáticas

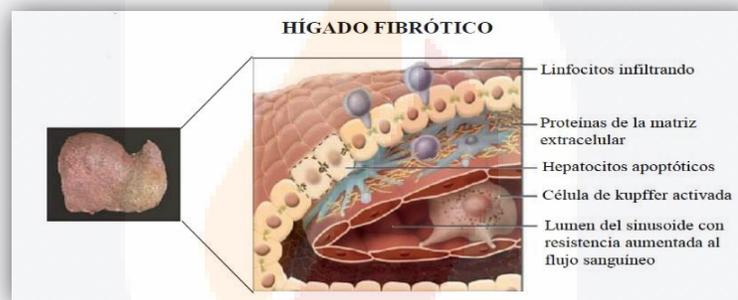
Según el modelo que propone Friedman (2008), la activación de las células estelares hepáticas, consta de dos etapas principales, la primera es la iniciación y perpetuación y la segunda de ellas es la resolución de la fibrosis,

en cada una de las etapas se observan diversas complicaciones que promueven el daño al hígado ocasionado por las CEHs, véase figura 7.



(Bataller y Brenner, 2005)

Figura 6. Organización celular en el hígado. CEHs quiescentes en hígado normal, se observa el contenido de retinol en su citoplasma.



(Bataller y Brenner, 2005)

Figura 7. Hígado fibrótico. CEHs tras su activación inducida por el daño a las células parenquimatosas. Producción desequilibrada de MEC por parte de la CEHs. Cambios en células de Kupffer en hígado fibrótico.

Iniciación

Las CEHs sufren un estímulo por la liberación de citocinas y factores de crecimiento como el TGF- β , PDGF, ET-1, entre otros, causado por otras células del hígado generando un cambio morfológico en ellas, Friedman (2008) menciona que las células implicadas en dicho estímulo son las endoteliales, las de Kupffer, los hepatocitos y las plaquetas.

Friedman indica que tras la apoptosis de los hepatocitos después que se ha dado la lesión, va a promover la activación de las células estelares, en cambio tras la necrosis de las células parenquimatosas la cual está asociada a la peroxidación lipídica se genera un estímulo inflamatorio seguido de

fibrogénesis. En un estudio se identificó que restos apoptóticos liberados por los hepatocitos, activan a las células de Kupffer y a su vez provocan la fibrogénesis de la cual son responsables las CEHs (Friedman, 2008).

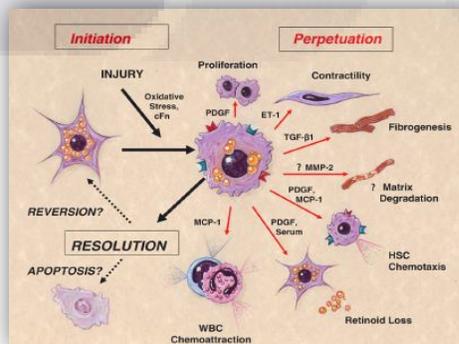
Una de las enzimas involucradas en la generación de especies reactivas de oxígeno, es el citocromo P450 el cual tiene una participación en la activación de las células estelares hepáticas tras la producción de especies reactivas de oxígeno (ROX) y especies reactivas de nitrógeno (NOX), induciendo la síntesis de MEC (Friedman, 2008).

Perpetuación

Citocinas como el TGF- β y el PDGF principalmente inducirán varias respuestas en las CEHs entre ellas, la síntesis de matriz extracelular, la proliferación, la contractilidad, la pérdida de retinol, etc. La figura 8 muestra tales respuestas hacia algunas de las citocinas liberadas tras una lesión (Friedman, 2008), en la perpetuación las CEHs se estarán activando de manera autocrina por las mismas CEHs ya activadas.

Resolución

En la resolución de la fibrosis según Friedman (2008), se observa la inactivación de las células estelares hepáticas lográndose a través de la reversión de su función a un fenotipo quiescente o un proceso apoptótico de las células estelares hepáticas (Figura 8).



(Friedman, 2008)

Figura 8. Proceso de activación de las células estelares hepáticas y su respuesta a diversas citocinas.

1. Marcadores moleculares de daño hepático

Los marcadores moleculares son biomoléculas que pueden estar relacionadas con algún rasgo genético, pueden ser proteínas o Acido desoxirribonucleico (ADN), la expresión va a permitir que su efecto sea cuantificable y observable, son por lo regular fáciles de detectar es por eso que son herramientas altamente utilizadas, pueden ayudar a reconocer algún tipo de patología pues en estadios normales pudiera ser que su presencia sea baja a diferencia de algunas enfermedades donde su expresión es elevada, se puede dar el caso contrario lo que a su vez indicaría que existe alguna patología.

Para la cirrosis hepática existen varios marcadores ya identificados por expresarse en mayor o menor cantidad que los valores normales de un hígado sano, su uso puede ser substancial para poder determinar la existencia de daño hepático.

Algunos de los marcadores de fibrosis son: colágeno tipo I alfa1, colágeno tipo III alfa1, TGF- β (Factor de crecimiento transformante β), TIMP-1 (Inhibidor tisular de las metaloproteinasas 1), TIMP-2 (Inhibidor tisular de las metaloproteinasas 2), MMP-9 (metaloproteinasa 9), MMP-13 (Metaloproteinasa 13) y PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas).

Este tipo de moléculas son sintetizadas por las células estelares hepáticas las cuales como ya se mencionó, son responsables de fibrosis, los factores de crecimiento pueden ser sintetizados por otras poblaciones celulares del hígado por ejemplo las células de Kupffer, los cuales van a generar un efecto en las células estelares provocando mayor producción de matriz extracelular.

I. Colágeno

El colágeno es una proteína fibrosa, forma parte de la matriz extracelular y tienen un papel importante en el soporte, mantenimiento, flexibilidad, resistencia y estructura de la arquitectura tisular, se encuentra en todos los tejidos y órganos (Devlin, 2004).



Durante una lesión hepática se observa una cantidad anormal de fibras de colágena, su síntesis es a causa de la reparación de tejido donde han quedado huecos por las células parenquimatosas muertas. En investigaciones experimentales en roedores se ha demostrado que existe mayor síntesis de colágeno tipo I y tipo III, las fibras fueron localizadas alrededor de la zona portal en mayor concentración, al parecer la síntesis de ambos tipos también es realizado por miofibroblastos, por otro lado, las células estelares hepáticas han expresado colágeno tipo I, esto indica que posiblemente los miofibroblastos durante una lesión hepática estén contribuyendo a la síntesis de colágeno tipo I y III mientras que las CEHs activadas a la producción del tipo I la cual se encuentra en gran concentración en los septos fibrosos (Poonkhum y cols., 2011).

II. Factor de crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas que participan en vías de señalización tanto en su regulación como su mediación, varias de las funciones que se han identificado son en el crecimiento, proliferación, diferenciación, así como el destino final de las células.

Los factores de crecimiento funcionan localmente en las células que los secretan y las células adyacentes, el TGF- β y PDGF son conocidos por inducir fibrosis en hígado; En procesos de regeneración de tejido se ha detectado que inducen la migración de fibroblastos al sitio donde se presenta el daño (Sundaram, 2009).

El TGF- β es conocido por ser uno de los más potentes mediadores profibrogénicos durante la lesión hepática y juega un papel importante en la regulación de la MEC. Se han identificado 3 isoformas en mamíferos (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), y en especial en el hígado, sin embargo, la de mayor relevancia es la 1 pues participa activamente en la fibrogénesis hepática. Estudios in vitro e in vivo demuestran que el TGF- β provoca en las CEHs activadas un aumento de la síntesis de las fibras colágenas, depositadas progresivamente en el espacio intercelular y en el espacio de Disse, lo que

altera la función y la homeostasis de las células hepáticas (Sarema y cols., 2006).

III. Metaloproteinasas (MMPs)

Las metaloproteinasas son una familia de proteínas específicamente proteasas, su función es degradar algunos componentes encontrados en la MEC, por lo que se encargan de mantener la homeostasis de este componente tisular (Coronato y cols., 2012), la importancia de la MEC radica en la interacción celular que se da a través de ella donde se desencadenan una serie de señalizaciones que promueven la diferenciación, migración y movilización celular, tales procesos son esenciales para mantener el equilibrio en el organismo (Cascales-Angosto y Álvarez-Gómez, 2010), es por ello que el contenido de esta sustancia debe ser controlado. De las diversas isoformas de MMPs se conocen 24 en el humano.

La MMP-13 es una colagenasa encargada de degradar colágeno intersticial tipo I, II, III, IV, X y XIV, la tenacina, la fibronectina y el agregán, generando colágeno desnaturalizado. En ratas y en ratones se encuentra solo esta isoforma compartiendo el 86 % de homología con la MMP-13 humana. (Knäuper y cols., 1997), la expresión de la MMP-13 se encuentra disminuida durante la Cirrosis hepática (Tsukamoto, 1999).

IV. TIMP

Para que exista un equilibrio en la degradación de la matriz extracelular, existen las proteínas conocidas como Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, su principal función es precisamente la inhibición de las Metaloproteinasas (MMPs), Actualmente se conocen cuatro isoformas (1-4), se diferencian en solubilidad, regulación y la interacción específica con la proenzima que estarán inhibiendo.

El TIMP 1 y 2 tienen la capacidad de inhibir todas las formas de las MMPs, la inhibición independientemente de la isoforma resulta de una unión no



covalente reversible. Se ha demostrado que los TIMP 1 y 2, tras una lesión hepática se sobre expresan en tejidos fibróticos humanos y en modelos con roedores, la células estelares hepáticas tras su activación sintetizan más de estos componentes, la existencia de mayor concentración de TIMPs, induce la inactivación de las metaloproteinasas, logrando que la degradación de matriz extracelular no exista o sea menor con respecto a la síntesis de la misma (Gutiérrez-Ruiz y Kershenobich, 2003).

La sobre expresión de estas proteínas tras una lesión hepática así como su función hace que sean buenos marcadores moleculares de fibrosis.

1.2 Hepatotoxicidad

La lesión que se presenta en el hígado, en su mayoría es causada por sustancias tóxicas como es el caso del alcohol o algunos medicamentos. La lesión se genera principalmente por la biotransformación de dichas sustancias la cual como ya se mencionó, es una de las funciones del hígado, ésta puede ser perjudicial pues se forman metabolitos más tóxicos que el compuesto inicial. Actualmente se conocen más de 900 sustancias identificadas por generar un daño en el hígado, muchos medicamentos se han retirado del mercado por esta razón (Risso, 2008).

El proceso que sufre el hígado tras ser afectado ya sea por sustancias tóxicas o algún otro factor ha sido estudiado en modelos experimentales con animales, uno de los compuestos más utilizados para inducir hepatotoxicidad es el tetracloruro de carbono (CCl_4), ya que esta sustancia química induce cirrosis, esto demostrado en ratas, siendo ésta patología similar a la cirrosis que se presenta en humanos (Basu, 2003).

1.2.1 Tetracloruro de carbono (CCl_4)

El tetracloruro de carbono es un hidrocarburo líquido transparente liposoluble, este compuesto puede evaporarse fácilmente por lo que el CCl_4 en el medio

ambiente se puede encontrar en forma de gas, es poco inflamable y tiene un olor ligeramente dulce. Este compuesto fue ampliamente utilizado como disolvente de aceites, grasas y ceras, era usado como producto de limpieza en seco, como extintor, plaguicida y en la producción de refrigerantes, su uso como desengrasante es muy poco frecuente y actualmente ya no es utilizado como extintor, plaguicida o en la producción de refrigerantes, por el alto porcentaje de toxicidad que presenta, la figura 10 muestra la estructura molecular del CCl_4 (ATSDR, 2005).



Figura 9. Molécula del tetracloruro de carbono

1.2.1.1 Toxicidad del tetracloruro de carbono

La hepatotoxicidad de CCl_4 según Reznagel y Cols. (1989) va depender en su mayoría, de una cascada de eventos secundarios iniciados por su metabolismo, este compuesto no solo va atacar al hígado, Zakim y Boyer (2006) identificaron efectos neurotóxicos, el CCl_4 suprime al sistema nervioso provocando alucinaciones.

El CCl_4 puede ser absorbido vía respiratoria, oral y dérmica, este se elimina a través de la orina o la exhalación. El Citocromo P450 (CYP) es la enzima que se encarga de su biotransformación, participa en diversos procesos desintoxicantes sin embargo para algunas sustancias la función de esta puede resultar perjudicial para el organismo.

En los mamíferos, el CYP se encuentra presente en la mitocondria y en diversos tipos de membranas celulares, siendo particularmente abundante en el retículo endoplásmico liso, la isoforma CYP2E1 es la que se encarga de metabolizar al CCl_4 , produciendo metabolitos aún más tóxicos, el triclorometilo y el cloro son los radicales que se generan tras su bioactivación, en este caso



el tetracloruro sufre una desalogenación (Véase Figura 10) (Orellana y Guajardo, 2004).

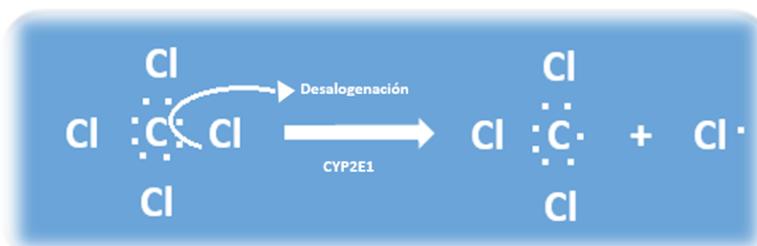


Figura 10. Reacción de bioactivación del tetracloruro de carbono por la isoforma CYP2E1

1.2.1.2 Mecanismo de acción del CCl₄

El CCl₄ produce acumulación de lípidos, este proceso es uno de los principales durante la intoxicación, se da una falla en el transporte de lipoproteínas de baja densidad ricas en triglicéridos hacia el plasma (Recnagel y cols., 1989), estudios realizados en modelos experimentales, han demostrado acumulación de triglicéridos en hepatocitos (Boll y cols., 2001).

El descenso de la síntesis de proteínas se produce rápidamente después de la intoxicación con CCl₄, hay una pérdida temprana de la capacidad secuestrante de calcio en vesículas microsomales y retículo endoplásmico (RE), la activación lisosomal se produce después de aproximadamente 6 hr, la pérdida en la permeabilidad de la membrana plasmática de la célula comienza después de las primeras 4 horas tras su intoxicación y existe un movimiento pasivo de Ca²⁺ en las células llegando a la muerte celular (Recnagel y cols., 1989).

I. Esteatosis por CCl₄

El tetracloruro de carbono por sí mismo va a promover la liberación de triglicéridos en tejidos periféricos produciendo depósitos de grasa, también induce la solvatación de lípidos de la membrana plasmática.

Los metabolitos (Triclorometilo) producidos por acción del citocromo P450 (Isoforma CYP2E1) también son capaces de producir esteatosis.

El triclorometilo va interferir en la síntesis de proteínas al peroxidar el retículo endoplásmico rugoso, al interferir en la síntesis no se producirán lipoproteínas (Este complejo macromolecular es el responsable del transporte de grasas a todo el organismo), lo que va ocasionar que los triglicéridos no puedan salir de las células, igualmente va a romper el enlace lípido-proteína de las lipoproteínas ya sintetizadas así como alterar la capacidad de los hepatocitos para ligar a éstas triglicéridos (Zakim y Boyer, 2006) (Véase figura 11).

II. Necrosis celular por CCl₄

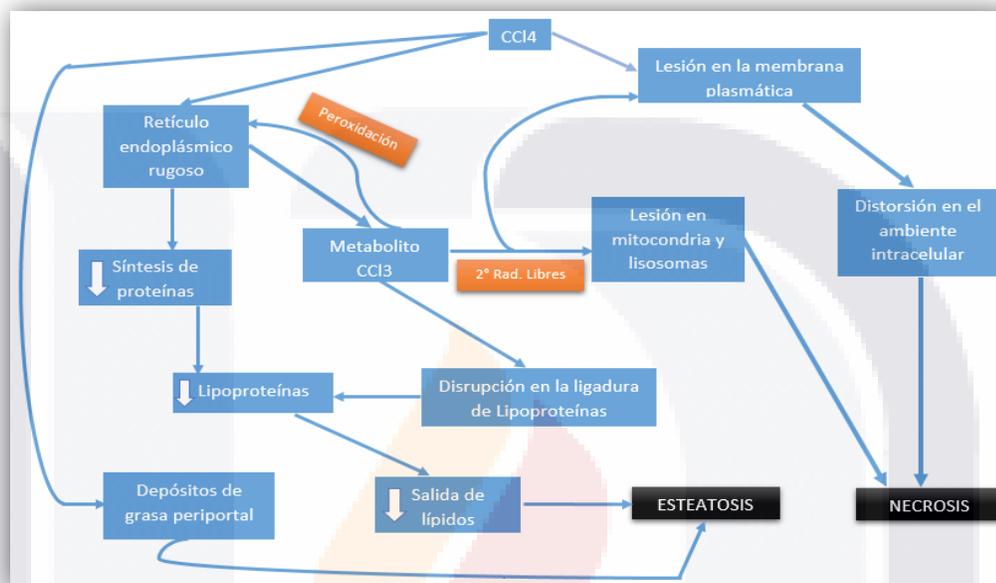
El tetracloruro de carbono va alterar la permeabilidad de iones ocasionando daño en la membrana plasmática y con ello modificación del ambiente intracelular provocando necrosis.

El triclorometilo (radical libre producido tras la bioactivación del CCl₄ por CYP2E1), va afectar a los lípidos de la membrana plasmática ocasionando modificaciones en el ambiente intracelular, al producir 2º radicales libres tras la peroxidación del retículo endoplásmico genera una alteración en el metabolismo del ciclo de Krebs y en la fosforilación oxidativa originando que no exista síntesis de ATP, igualmente estos 2º radicales van a dañar la membrana de los lisosomas originando la liberación de enzimas hidrolíticas y proteolíticas encargadas de la digestión celular (Zakim y Boyer, 2006) (Véase figura 12).

Otra de las causas importantes de muerte celular por necrosis, es el aumento de calcio²⁺ citosólico, al dañarse las membranas plasmáticas, se generan efectos en los canales de calcio provocando que el Ca²⁺ citosólico extracelular entre, de la misma manera el calcio no puede salir de la célula, también al lesionarse el RE, el calcio secuestrado por este organelo se libera, el aumento en la concentración de Ca²⁺ sistólico libre como segundo mensajero podrían iniciar una serie de cambios patológicos como activación de enzimas hidrolíticas y otras como la deshidrogenasa del ciclo de Krebs y la xantina deshidrogenasa que forma especies reactivas de oxígeno, el aumento de Ca²⁺ también va a provocar daño a microfilamentos con ello se forman vesículas en la superficie celular que predispone la ruptura de la membrana, el contenido de



Ca^{2+} en la mitocondria ocasiona un desacoplamiento reversible de la fosforilación oxidativa y con ello la disminución de las reservas energéticas. Esta serie de eventos a causa de la elevación en la concentración de Ca^{2+} citosólico son los responsables de la muerte celular (Recnagel y cols., 1989).



(Zakim y Boyer, 2006)

Figura 11. Mecanismo de acción del CCl_4

Otros efectos atribuidos a la exposición crónica a este tóxico son: dermatitis por destrucción de la grasa de la piel, polineuritis, déficit visual, parkinsonismo y depresión de médula ósea (Asqui-Lalón, 2012).

Antecedentes

1.3 Reversión de cirrosis

Las células estelares hepáticas, al ser responsables de la acumulación de fibras de colágeno, se han convertido en blanco terapéutico para la reversión de cirrosis. Investigaciones realizadas por Oben y cols. (2003), han demostrado que Inhibidores del Sistema Nervioso Simpático (SNS) reducen notablemente la cirrosis hepática inducida experimentalmente, demostraron que las CEHs proliferan y expresan ARNm de colágeno en respuesta a neurotransmisores del SNS.

Dado que HSC también expresan proteínas neurogliales estereotipadas, poseen vesículas sinápticas, y están inervados por fibras autonómicas (Cassiman y cols., 1999).

Oben y cols. (2004) estudiaron la posibilidad de que las CEHs produjeran neurotransmisores para autorregular su proliferación y activación.

Estudios microscópicos por Ueno y cols. (1997) han demostrado que las CEHs están en contacto con las fibras nerviosas en el hígado humano (véase figura 12)

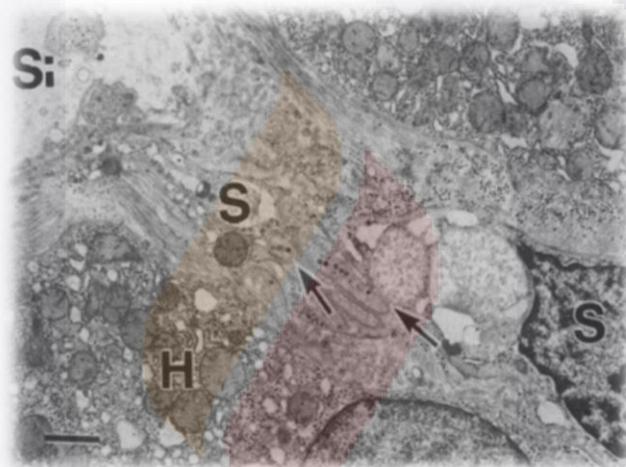
En una investigación se identificó que las CEHs expresan receptores Alfa/beta adrenérgicos funcionales cuya estimulación con noradrenalina provoca su activación (Oben y cols., 2004). Todas estas evidencias en cuanto a su localización, la cercanía que tienen con fibras nerviosas, los receptores a neurotransmisores que expresan y las similitudes que tienen con células nerviosas indican la posibilidad de que con el uso de alfa/beta bloqueadores adrenérgicos podría disminuir su actividad y con ello la producción de componentes de la MEC responsables del daño al hígado.

Oben y cols. (2004) en sus estudios demostraron que el prazosin (antagonista α adrenérgico) y propanolol (antagonista β -adrenérgico) al ser inducidos en cultivo de células estelares hepáticas de ratón y rata, disminuían de manera significativa su proliferación y activación.



El carvedilol medicamento alfa/beta bloqueador no selectivo, también ha sido probado en la reversión de la fibrosis hepática demostrando efectos antifibróticas en modelos de rata tratados con CCl_4 (Hamdy y El-Demerdash, 2012).

La reversión de cirrosis es y ha sido un tema que se ha investigado, las nuevas evidencias encontradas con respecto a las células estelares hepáticas, han generado la posibilidad de hacer uso de alfa/beta adreno bloqueadores como una nueva terapia a esta patología.



(Ueno y cols., 1997)

Figura 12. Micrografía electrónica que muestra la relación entre las CEHs y las terminaciones nerviosas en el hígado humano normal, las terminaciones nerviosas (flechas) se localizan cerca de las CEHs (S). Si: sinusoide, H: hepatocitos.

El carvedilol al igual que el propanolol y el prazosin es un fármaco con actividades α y β bloqueantes, además posee propiedades antioxidantes. Hamdy y El-Demerdash en el 2012, observaron que el uso de este fármaco utilizado en modelos experimentales de rata con lesión hepática disminuía los niveles de Alanino aminotransferasa y Aspartato deshidrogenasa, dos enzimas que se encuentran en hígado y que tras una lesión son liberadas a la sangre.

Es conocido que durante una lesión hepática los niveles de antioxidantes descienden, Hamdy y El-Demerdash (2012), demostraron que los niveles de glutatión (principal antioxidante del organismo), se reestablecían, todos estos acontecimientos ayudaron a la disminución de fibras de colágena por lo que estos investigadores atribuyeron funciones antifibróticas al carvedilol debido a sus efectos antioxidantes, sin embargo, es posible suponer que su efecto también se deba a su principal función, la cual es de adrenobloqueador, pues como ya se ha mencionado, las principales células fibrogénicas (CEHs), poseen adrenoreceptores los cuales al ser estimulados provocan la síntesis de MEC (Oben y cols., 2004).

La Doxazosina es un agente bloqueador de los receptores alfa 1 adrenérgicos capaz de reducir la resistencia vascular periférica sin influir en la frecuencia cardíaca ni en el gasto cardíaco (Carretero, 2002), este medicamento fue probado experimentalmente en ratas con fibrosis cardiaca, lo que se observó tras su administración la producción de fibras de colágena aortica disminuía notablemente indicando la posibilidad de que los adrenobloqueadores están involucrados en la inhibición de la síntesis de matriz extracelular (MEC), durante el estudio realizado por Perilini y cols. (2005), también fue usado propranolol un beta-bloqueador adrenérgico, el uso de ambos en tal estudio ayudo a que se reestablecieran los valores normales de la MEC.

La doxazosina se probó en un estudio realizado por Muñoz-Ortega y cols., (2015), observando un efecto benéfico contra cirrosis hepática, también se ha demostrado que en otros órganos como el corazón, ayuda a la disminución de matriz extracelular (Perilini y cols., 2005); el carvedilol, como se mencionó, ha sido usado experimentalmente en la reversión de cirrosis y es alfa 1 adrenobloqueador al igual que la doxazosina, por lo tanto, es importante generar más información acerca del efecto que tiene este medicamento contra la cirrosis hepática.



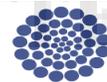
...CAPÍTULO II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA...

2. Planteamiento del problema.

Actualmente el índice de mortalidad ocasionado por enfermedades hepáticas como la cirrosis va en aumento por lo que es considerada como la quinta causa de muerte a nivel mundial, a pesar de los avances científicos no existe algún tratamiento para su cura por lo que el presente estudio tiene como objetivo identificar si los alfa/beta adrenobloqueadores (carvedilol y doxazosina) pueden ser posibles candidatos para inducir la reversión de cirrosis.

2.1 Pregunta de investigación

¿El uso de alfa/beta adrenobloqueadores (Doxazosina y carvedilol), podrán tener efectos benéficos en la reversión de cirrosis inducida con tetracloruro de carbono en hámsteres?



2.2 Objetivo general

Estudiar el efecto de los α/β adreno-bloqueadores doxazosina y carvedilol en la reversión de la cirrosis hepática en hámsteres inducidos con CCl_4 .

2.2.1 Objetivos particulares

- Establecer un modelo de cirrosis hepática y las condiciones para su reversión.
- Demostrar la eficiencia de los α/β bloqueadores (doxazosina y carvedilol) en la disminución de depósitos de colágena y posible recuperación de la estructura histológica hepática tras el daño.
- Cuantificar células estelares hepáticas activadas mediante la identificación de alfa-actina de músculo liso (α -SMA).
- Identificar la expresión de marcadores de fibrosis hepática.

2.3 Justificación.

El hígado es un órgano vital del cuerpo humano y de gran interés biológico debido a las funciones que realiza.

Actualmente existen varios factores implicados en el daño al hígado y que han llegado a provocar patologías como fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma.

La cirrosis hepática, es una enfermedad que cuenta con un alto índice de mortalidad a nivel mundial, posicionándola en el quinto lugar; en el año 2012 se conocía como la sexta causa de muerte en México y era la responsable de más de 28 mil decesos; el alcohol, hígado graso no alcohólico y virus de la hepatitis B y C representan las principales causas de este padecimiento según datos obtenidos por Gómez-Mena (2012).

A pesar de los avances científicos, no existe un tratamiento para esta afección, por lo que este proyecto propone establecer un modelo de cirrosis hepática en el hámster justamente por las semejanzas fisiológicas e histológicas que presenta con el ser humano haciendo uso de tetracloruro de carbono (sustancia altamente hepatotóxica), posteriormente comenzar la terapia con alfa/beta adrenobloqueadores (Doxazosina y Carvedilol) y así poder analizar los efectos benéficos que pudieran tener dichos medicamentos durante una lesión hepática.



2.4 Hipótesis

El uso de alfa/beta adrenobloqueadores (Carvedilol y doxazosina) en un modelo experimental de cirrosis hepática en hámster inducido por tetracloruro de carbono, reduce la cantidad de matriz extracelular y con ello, el daño hepático.

2.5 Metas

- Inducir cirrosis hepática en hámsteres (*Mesocricetus auratus*) con el uso de tetracloruro de carbono, demostrado a través de la determinación de proteínas en suero y cambios histológicos en tejido con el uso de técnicas de tinción (hematoxilina-eosina y Rojo sirio), generando así las condiciones idóneas para su posterior reversión.
- Demostrar la eficiencia de doxazosina y carvedilol después del tratamiento a hámsteres cirróticos con la identificación de marcadores de fibrosis, recuperación de la histología hepática y el restablecimiento de los valores enzimáticos y protéicos en suero.
- Cuantificar el número de células estelares hepáticas activadas a través de inmunohistoquímica con el uso de anticuerpos para alfa actina de músculo liso en los diferentes grupos experimentales, con el objetivo de entablar la relación existente en la producción de fibras de colágena tipo I identificada con rojo sirio.
- Identificar la expresión de marcadores de fibrosis (TIMP 2, TGF- β y metaloproteinasa 13) en los grupos experimentales para corroborar los efectos benéficos de doxazosina y carvedilol en la reversión de la cirrosis.



...CAPÍTULO III METODOLOGÍA...

1. Metodología

3.1 Diseño Experimental

Las pruebas experimentales se realizaron en 26 hámsteres (*Mesocricetus auratus*), figura 13, de los cuales, 23 tenían cirrosis hepática, estos últimos fueron seleccionados de una muestra de 70 hámsteres tratados con tetracloruro de carbono.

Fueron mantenidos en ciclos de luz/oscuridad (12h:12h), la dieta consistió en trozos de purina y agua (*ad libitum*).

Los animales fueron tratados de acuerdo con las reglas de la comisión de bioética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, acorde con la guía NHI para la investigación con animales (Guía para el cuidado y uso de animales del laboratorio). La selección de estos, fue por la similitud existente con humanos, ambos mamíferos cordados y vertebrados (Vallejo, 2012), una de ellas es el metabolismo lipoproteínico el cual es semejante al de los humanos (Navarro y cols., 2005).

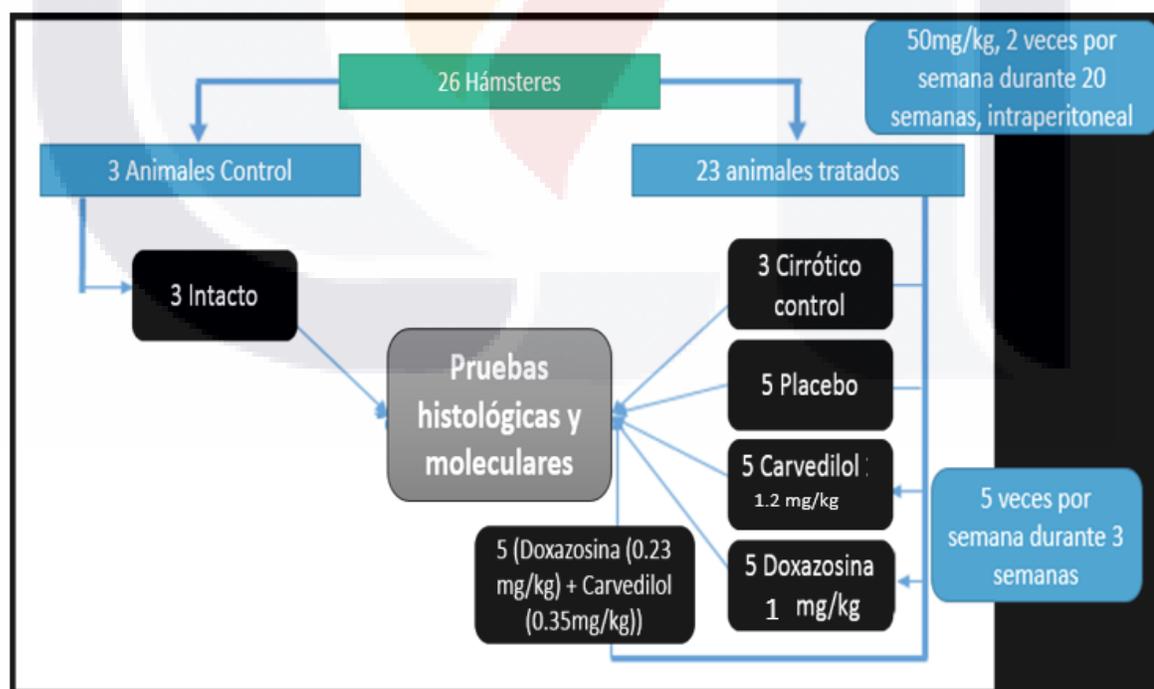


Figura 13: Diseño Experimental: la figura muestra cómo fueron distribuidos los hámsteres para el desarrollo del proyecto.

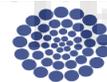
3.2 Modelo de cirrosis hepática en hámsteres

La inducción fue con tetracloruro de carbono a una dosis de 50mg/kg, se trataron un total de 70 hámsteres (*Mesocricetus auratus*), la tabla 1 muestra la cantidad suministrada de CCl₄ según el peso de los hámsteres, del total de animales tratados con tetracloruro de carbono (70 hámsteres), sobrevivieron 43, de éstos, 23 fueron seleccionados para este proyecto los cuales como ya se mencionó anteriormente, fueron manejados según se muestra en la figura 13.

Tabla 1. Valores de pesos en hámsteres para tratamiento con CCl₄ y la cantidad respectiva del tóxico a administrar.

Grupos hámsteres (n=14)	Rango de peso (grs.)	Promedio de peso (grs.)	Volumen a administrar (ml.)
1	109-120	114.5 = 115	0.15
2	130-145	135	0.18
3	150-160	155	0.2
4	160-170	175	0.25
5	170-180	175	0.25

La administración de CCl₄ fue por vía intraperitoneal 2 veces por semana durante 20 semanas, tiempo fundamental para lograr cirrosis hepática según Muñoz-Ortega y cols. (2015). Posteriormente a ello se sacrificaron 3 animales para corroborar que el grado de cirrosis correspondiera al estadio 4 según la escala metavir el cual ayudó como base para el tratamiento de reversión. Se utilizó pentobarbital para anestesiarse utilizando 20 unidades/animal con una concentración de 0.63 gr/ml, enseguida fue extraído el tejido hepático y posteriormente se dividió en secciones para llevar a cabo pruebas histológicas (hematoxilina y eosina, rojo sirio e inmunohistoquímica) y moleculares para la valorar la expresión de marcadores de fibrosis, también se extrajo sangre para



realizar pruebas de función hepática identificando transaminasas (AST y ALT) y albúmina en suero, aproximadamente 2 a 3ml de sangre.

3.3 Tratamientos con doxazosina y carvedilol

Una vez comprobado el daño (Cirrosis), se realizó la administración de doxazosina, carvedilol y la sinergia (carvedilol + doxazosina), se utilizó una dosis de 1mg/kg de doxazosina, 1.2 mg/kg de carvedilol y para la sinergia 0.23 mg/kg de doxazosina y 0.35 mg/kg de carvedilol, los tratamientos se suministraron por 3 semanas dejando descansar sábados y domingos, el suministro fue de manera oral de acuerdo a la propuesta para el modelo de reversión hepática.

3.4 Sacrificio de los animales

Los animales de cada uno de los grupos fueron sacrificados usando pentobarbital para anestesiarse, se utilizaron 20 unidades/animal con una concentración de 0.63 gr/ml, antes del sacrificio se tomaron 3 ml de sangre mediante punción cardíaca, una vez llevado a cabo esto, se procedió con el sacrificio y disección del hígado, las muestras obtenidas (tejido y sangre) se usaron para realizar pruebas histológicas, moleculares y de función hepática.

3.4 Procesamiento de muestras biológicas

Una vez que el hígado fue extraído de los diferentes grupos, se lavó con solución salina al 0.9%, aproximadamente 1.5 cm³ de tejido fue colocado en formalina neutra al 10% y 1.5 cm³ más en glutaraldehído al 2.5% para la realización de pruebas histológicas, aproximadamente 0.5 cm³ fue obtenido para extracción de RNA inmediatamente después del sacrificio, cabe mencionar que para esta técnica se almacenó otra porción de tejido de aproximadamente 1 cm³ en nitrógeno líquido, para posibles repeticiones. Por último, otro

conjunto de muestras, fueron almacenadas a -20° centígrados, las cuales se destinaron para extracción de proteína y western blot.

La sangre extraída de cada animal fue utilizada para llevar a cabo pruebas de función hepática.

3.5 Procesamiento de tejidos

3.5.1 Procesamiento de tejidos en parafina

Las muestras se deshidrataron e incluyeron en parafina utilizando el Histoquinet Thermo Scientific Microm modelo STP 120, posteriormente se incluyeron en bloques de parafina y realizaron cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo de rotación (Leica RM 2125RT).

3.5.2 Técnicas histológicas

3.5.2.1 *Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E)*

Para la tinción H-E de los tejidos se realizó la metodología según Luna (1968), con algunas modificaciones. Los cortes de tejido fueron hidratados para su tinción con hematoxilina y eosina, 10 y 1 minutos respectivamente, una vez que los tejidos fueron teñidos, se deshidrataron para su montaje en Entellan® y su posterior observación al microscopio.

3.5.2.2 *Tinción Rojo Sirio y su análisis con microscopia de polarización*

La tinción rojo sirio es una técnica con la cual se pueden identificar fibras de colágena, con ella se examinó el contenido de colágena en los diferentes grupos experimentales y posteriormente se cuantificó colágena tipo I por ser esta la responsable de formar tabiques fibróticos; cortes de tejido de 5 micras se hidrataron para teñirse con hematoxilina de weigert por 10 minutos y posteriormente se incubaron con rojo sirio picro por una hora, finalmente se



deshidrataron y montaron en Entellan[®] para poder observarse en el microscopio de luz polarizada (Luna, 1968).

3.5.2.3 Localización de antígenos: inmunohistoquímica para detección de células estelares hepáticas activadas

Se realizó la técnica inmunohistoquímica según Ventura-Juárez y cols., (2002), para la identificación de células estelares hepáticas activadas, como primer anticuerpo se utilizó α -actina de musculo liso (α -SMA), dilución 1:500, y se dejó incubar durante 24 horas en cámara húmeda a 4°C, después se utilizó un dual anti conejo y anti ratón como anticuerpo secundario de Dako Envision marcado con peroxidasa, para el revelado se utilizó 3,3'-diaminobencidina (Sigma Aldrich D-8001) diluido 1:10 en buffer de sustrato de peroxidasa 1X (Pierce 1.855.910), en la tabla 2 se encuentran las características de los anticuerpos primarios y secundarios.

Tabla 2. Anticuerpos Primarios y Secundarios utilizados

Anticuerpo	Host	Catálogo	Lote	Marca	Dilución
TGF-β	Ratón anti-humano	H2614	1003KS088	PreProTech	1:1000
α-SMA	Conejo	ab5694	GR192555-1	AbCam	1:1000
β-Actina	Conejo	ab69512	103M4826V	AbCam	1:2000
IgG	Cabra anti-Conejo	ab6722	026M4782V	AbCam	1:500
IgG	Cabra anti-Ratón	a3688	050M6017	Sigma	1:500
Dual Dako Envision	Dual anti conejo y ratón	K4061	10068287	Dako	1:1

3.7 Técnicas moleculares

3.7.1 Western blot

La técnica Western blot fue realizada para obtener la expresión del factor de crecimiento transformante beta, alfa actina de musculo liso y beta actina, utilizando anticuerpos para TGF- β (dilución 1:1000), α -SMA (dilución 1:1000) y

β -Actina (dilución 1:2000), y anticuerpo secundario IgG fosfatado (dilución 1:500), revelado con fosfatasa alcalina (Sigma B5655) Véase tabla 2 para anticuerpos primarios y secundarios. Se realizó primeramente una extracción de proteínas tomando aproximadamente 100 mg de tejido congelado a -20 °C para luego realizar su cuantificación por el método de Bradford, midiendo su absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro y finalmente se realizó el Western blot según Towbin y cols., 1979 con algunas modificaciones. Para la cuantificación de la expresión de dichas proteínas, se utilizó el programa ImageJ realizando un análisis densitométrico.

3.7.2 Extracción de ARN

La extracción se realizó posterior al sacrificio de animales a partir del tejido hepático del cual se tomaron aproximadamente 300 mg de muestra, la extracción se realizó con el kit SV Total RNA Isolation System numero Z3100 de Promega, siguiendo el protocolo del fabricante, el RNA obtenido fue cuantificado y almacenado a - 81°C hasta la realización de la retro transcripción.

3.7.2 Retrotranscripción de ARN

La transcripción inversa se realizó usando el kit Go Script Transcription System RFF A500 de Promega, siguiendo la metodología del fabricante con algunas modificaciones, se tomó 1 μ g por reacción de ARN y se colocaron en el termociclador Techne Genius para la conversión del ARN a cADN.

3.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para medir la expresión de TIMP-2 y MMP-13 se realizó una PCR utilizando el kit PCR reaction mix de Sigma (R2523) siguiendo la metodología del fabricante, se tomó 1 μ g de cDNA por reacción para obtener la expresión utilizando el termociclador Techne Genius, la cuantificación fue realizada por medio de un análisis densitométrico utilizando el programa ImageJ.



Las metodologías de los diversos procesos realizados se encuentran explicadas detalladamente en Apéndice.

3.8 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico tomando como referencia muestras de 5 animales por grupo experimental, los resultados fueron analizados mediante ANOVA y prueba Tukey usando el programa Graph Pad Prism versión 5, los datos fueron expresados en términos de media \pm SEM de 4 experimentos diferentes con una $n=3$, se tomó una $p \leq 0.05$ con una diferencia significativa.



...CAPITULO VI RESULTADOS...

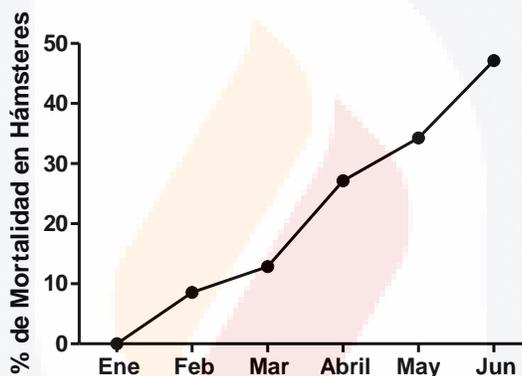


4. Resultados

4.1 Cirrosis hepática en hámsteres inducidos con tetracloruro de carbono y eficiencia de los alfa/beta adrenobloqueadores en el tratamiento contra cirrosis hepática.

4.1.1 Porcentaje de mortalidad en hámsteres tratados con CCl_4 .

Se observó una disminución del peso corporal de los hámsteres tratados con CCl_4 , el índice de mortalidad durante el modelo de cirrosis establecido, fue muy alto aproximadamente del 40% (gráfica 1), lo que puede indicar fallas hepáticas agudas.



Gráfica 1: Porcentaje de mortalidad de animales tratados con tetracloruro de carbono. El porcentaje de mortalidad tiende a aumentar conforme va pasando el tratamiento con CCl_4 .

4.1.2 Cambios físicos en hámsteres tratados con CCl_4 .

Durante el experimento se observó que los hámsteres sometidos con el tetracloruro de carbono, mostraron cambios físicos como un aumento en volumen de testículos y abdomen indicando acumulación de agua, característica clínica importante de la cirrosis hepática conocida como ascitis (Figura 14).

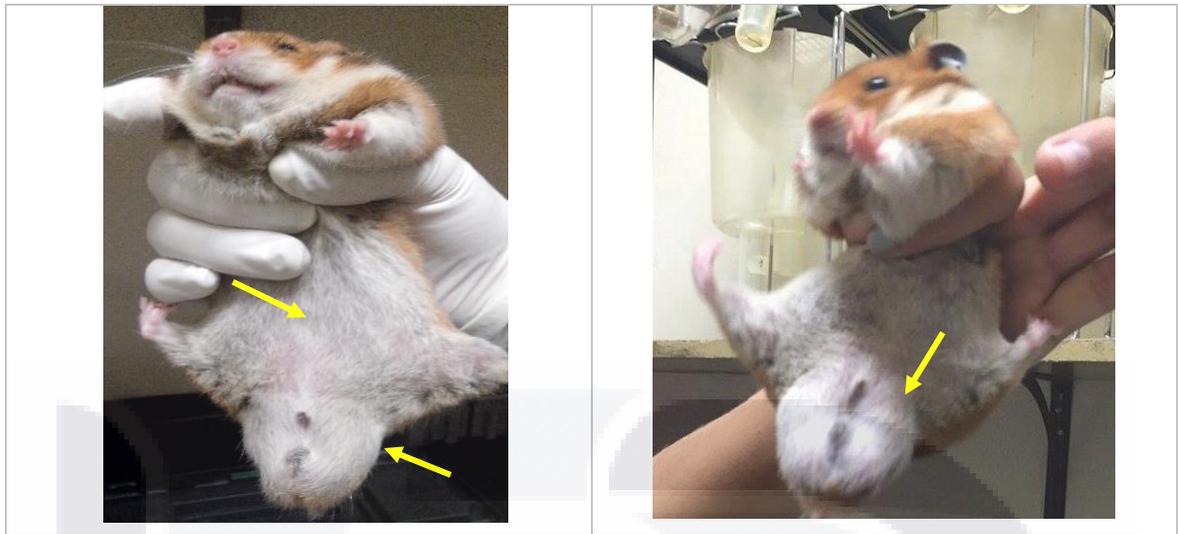


Figura 14: Cambios físicos en hámsteres, efecto del daño hepático. Aumento del volumen en abdomen y testículos en Hámster tratado con CCl_4 (Flecha amarilla).

La ascitis se define como la acumulación patológica de líquido en la cavidad peritoneal. La causa principal de ascitis es la cirrosis hepática (Bellota y Cols., 2012).

4.1.3 Descripción morfológica de la arquitectura hepática. Cambios físicos del hígado cirrótico del hámster

El hígado cirrótico control obtenido del hámster tratado con CCl_4 sufrió diversas transformaciones características de la cirrosis hepática; se observó disminución de tamaño, cambios de coloración, alteraciones en su estructura e identificación de nódulos de regeneración en su superficie (figura 15 (b)), por el contrario, el hígado obtenido del hámster intacto mostró una coloración rojiza prueba del correcto funcionamiento del flujo sanguíneo, el tamaño y la estructura no presentaron deformaciones aparentes indicando el buen funcionamiento del hígado (figura 15 (a)).

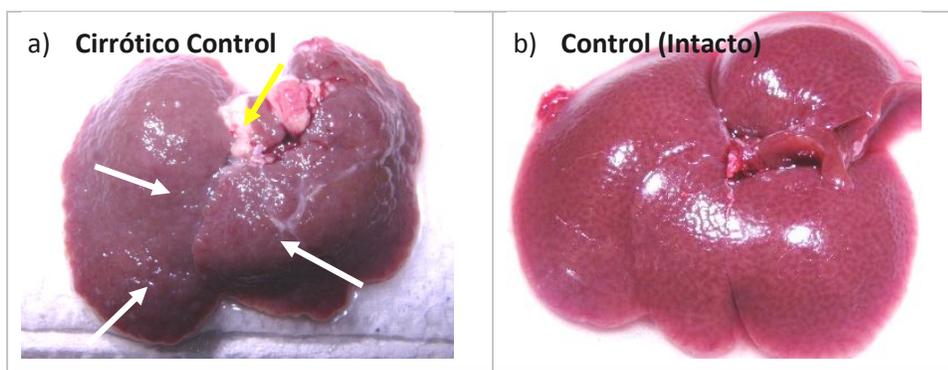
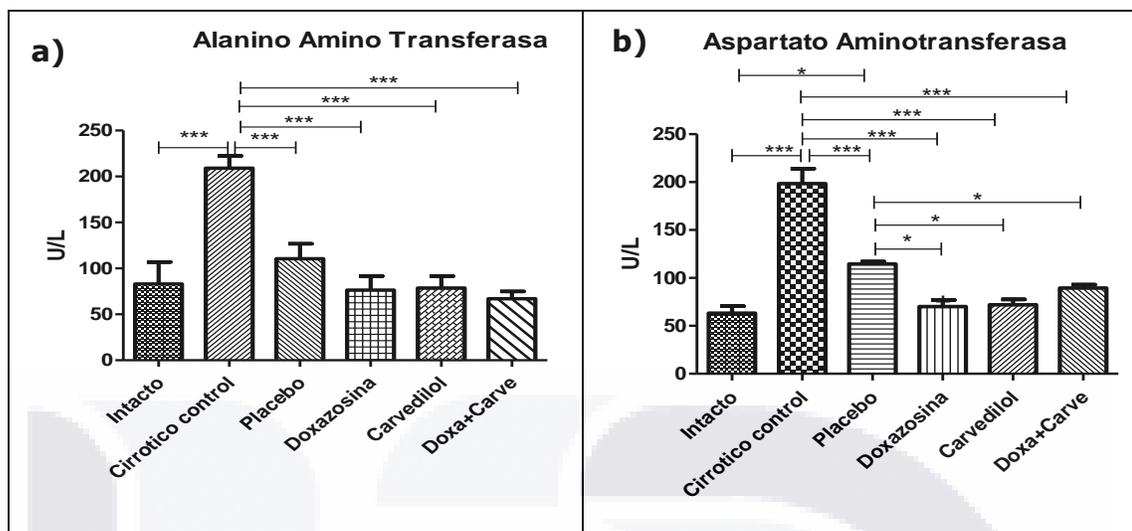


Figura 15: Estructura morfológica en hígado cirrótico e intacto del hámster. a) Cambio en coloración y estructura del hígado en hámster tratado con tetracloruro de carbono, nódulos de regeneración observados (flecha blanca) y grasa en algunas partes del hígado (flecha amarilla). **b)** Coloración rojiza en hígado, indicador de buena circulación sanguínea, estructura adecuada sin cambios morfológicos aparentes.

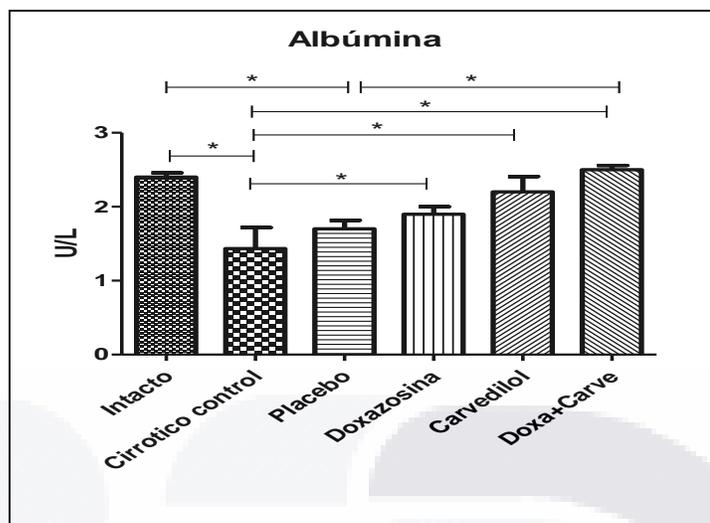
4.1.4 Pruebas de función hepática en grupos experimentales.

En este trabajo se determinó la expresión de las transaminasas ALT y AST, ambas enzimas citoplasmáticas de los hepatocitos, las cuales tras una lesión en el hígado son vertidas en sangre provocando que aumenten en suero (Martin y Molina, 2010). Nuestros resultados mostraron que los animales tratados con CCl_4 presentaron un aumento en las transaminasas respecto a todos los grupos tratados incluyendo el intacto (gráfica 2), los grupos doxazosina, carvedilol y doxa+carve reestablecieron sus valores respecto al intacto, indicio importante de la mejora en la función hepática, el grupo placebo también mejoró sus valores sin embargo los grupos tratados con los alfa/beta adrenobloqueadores mostraron una mayor eficiencia.



Grafica 2: Alteraciones de las transaminasas en suero. a) Alanino amino tranferasa (ALT), se observa un aumento considerable en el grupo cirrótico control respecto a todos los grupos experimentales, el grupo placebo no presenta diferencia significativa respecto al intacto, sin embargo es posible observar una ligera diferencia respecto a los grupos tratados (Doxazosina, carvedilol y Doxa+carve), existe recuperación endógena sin embargo los medicamentos aceleran esta recuperación. **b)** Aumento sérico importante de Aspartato amino Transferasa en grupo cirrótico control respecto al intacto y a los grupos tratados. Las barras representan la media de cada grupo experimental \pm desviación estandar (n=3, * p<0.05).

La albúmina es una proteína sintetizada en el hígado, al existir una lesión hepática, sus valores normales en suero se ven disminuidos, es por ello que se le conoce como un marcador de daño hepático, la gráfica 3 muestra los valores normales de esta proteína obtenidos de hámsteres intactos, en el grupo cirrótico control, la albúmina disminuye y no tiene diferencia significativa con el grupo placebo lo que indica que la regeneración endógena no ha sido eficiente, los grupos tratados con los adrenobloqueadores doxazosina y carvedilol, si mejoraron la síntesis de esta proteína de forma muy similar al intacto principalmente el grupo tratado con la sinergia de los medicamentos pues los resultados de este grupo son casi iguales al intacto, esto comprueba la efectividad de los adrenobloqueadores en la restitución de la función hepática.



Grafica 3: Disminución de Albúmina en Grupo cirrótico control contra grupos tratados. Decremento importante de los valores séricos de albúmina en grupo cirrótico control respecto al intacto y grupos tratados. Representación de la media de cada grupo experimental \pm desviación estándar (n=3, * p<0.05).

4.1.5 Alteraciones morfológicas en tejido hepático de grupo cirrótico y recuperación histológica endógena y con los alfa/beta adrenobloqueadores.

El tetracloruro de carbono provocó lesiones en el tejido hepático del hámster causando muerte celular, la tinción realizada con Hematoxilina-Eosina (H-E) muestra en el grupo cirrótico control, disminución de hepatocitos, distorsión en tejido, infiltrado celular y algunas formaciones de fibras de colágena distinguidas por un cambio en la coloración (figura 16 (b)), el grupo intacto tiene una estructura microscópica de tejido adecuada con formación de cordones de hepatocitos intactos sin algún aparente daño celular (Figura 16 (a)), se puede observar la diferencia existente entre el grupo cirrótico control y el intacto donde se aprecia claramente un daño importante en el cirrótico. En el grupo placebo se percibe infiltrado celular lo que indica procesos inflamatorios presentes, hay células posiblemente con esteatosis afectando su funcionamiento, en este grupo aún existe daño en el tejido, no tan grave como en el cirrótico control, sin embargo, no ha logrado revertir por completo el daño ocasionado por el CCl_4 (Figura 16 (c)), el tratamiento con alfa beta adreno bloqueadores ayudó a mejorar la estructura del tejido hepático; en los

diferentes grupos tratados con doxazosina y/o carvedilol, el grupo tratado con carvedilol muestra una mejoría en su histología, se distinguen unos pocos cordones de hepatocitos, aún existe contenido de fibrosis, sin embargo es menor al observado en el placebo, se distinguen células inflamatorias pero la cantidad es menor (figura 16 (e)), el grupo doxazosina, aparentemente tuvo una mejoría mayor al carvedilol pues la organización celular presente es muy similar al intacto, la fibrosis ya no es tan prominente y con poco infiltrado inflamatorio, se distingue una formación adecuada de hepatocitos (figura 16 (d)), finalmente el grupo doxa+carve perteneciente a la sinergia, mostró las mejores características histológicas pues este regeneró casi por completo el tejido hepático expresando características semejantes al intacto (figura 16 (f)),

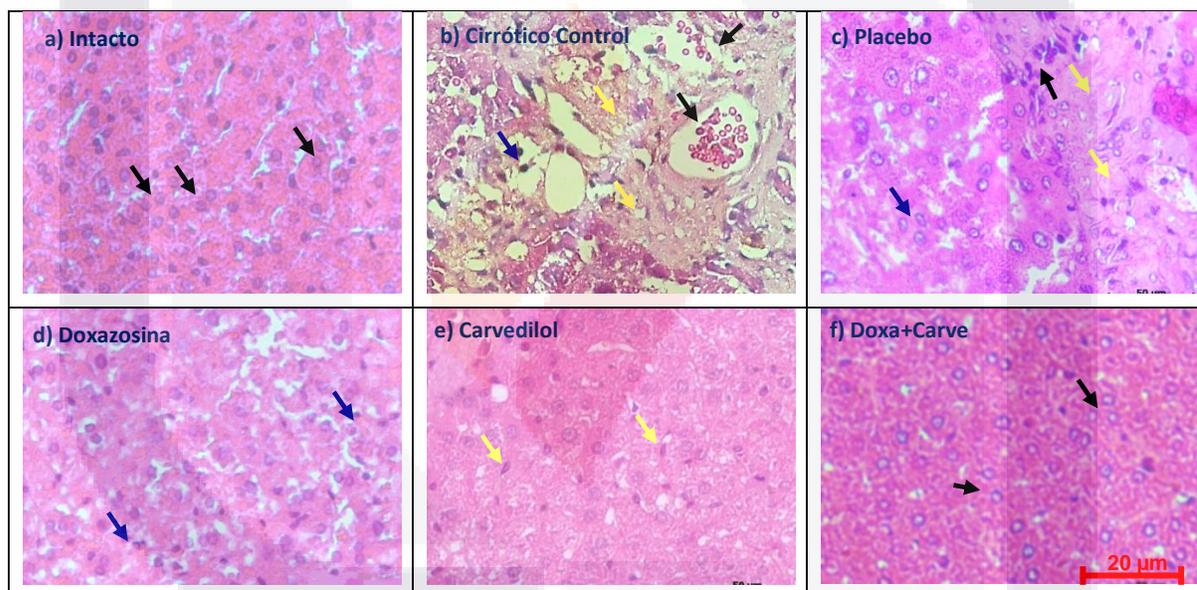
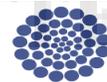


Figura 16: Estructura histológica de hígado cirrótico, tratados con alfa/beta adrenobloqueadores, placebo e intacto de hámster teñido con H-E. a) Intacto. Estructura adecuada de tejido hepático, codones de hepatocitos intactos (flecha negra). **b)** Grupo cirrótico control con daño importante en hígado, infiltrado inflamatorio (punta de flecha azul), tabiques de fibrosis (flecha amarilla), acumulación de eritrocitos por un posible aumento de presión de la vena porta (flecha negra). **c)** Placebo. Espacios fibróticos (Flecha amarilla), contenido moderado de células inflamatorias (flecha negra), formación de cordones de hepatocitos (flecha azul). **d)** Doxazosina. Pocas células inflamatorias (flecha azul) **e)** Carvedilol. Células inflamatorias (flecha amarilla), cordones de hepatocitos presentes. **f)** Doxa+Carve, Cordones de hepatocitos (flecha negra).



4.1.6 Determinación de colágeno tipo I en cirrosis hepática en hámsteres y durante el tratamiento con doxazosina y carvedilol

Las proteínas colágenas, son los principales elementos estructurales de la matriz extracelular, proporcionan la forma, fuerza y flexibilidad de los tejidos, en el hígado vamos a encontrar principalmente colágeno tipo I y III, al existir una lesión hepática, la colágena tipo I se sobreproducirá y esto provocará que se forme fibrosis hepática (Poonkhum y cols., 2001); la colágena tipo I es uno de los marcadores más importantes de cirrosis hepática

La producción de colágeno es claramente apreciada en la figura 17 con tinción rojo sirio y observada a través de microscopia de luz polarizada

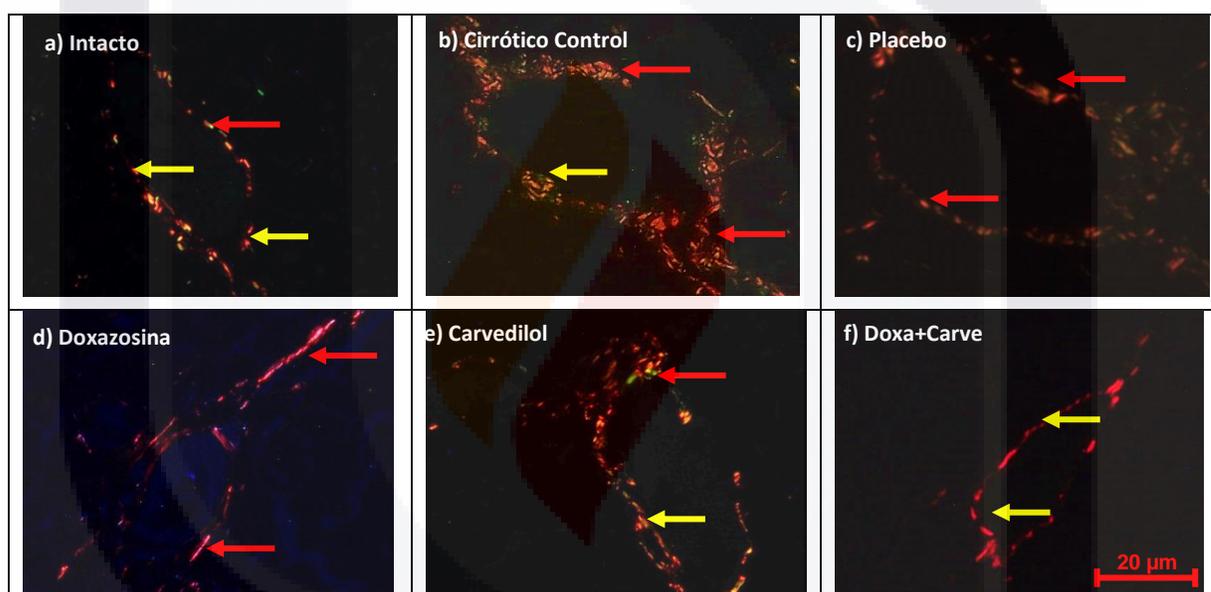
El tipo de colágeno encontrado en mayor concentración para todos los grupos experimentales es tipo I (Fig. 17).

El grupo cirrótico control mostró un contenido de colágeno tipo I y III importante (figura 17 (b)); la producción exagerada de estas proteínas principalmente colágeno tipo I, generó un daño mayor a las células hepáticas. Con la tinción rojo sirio se pudo confirmar la lesión ocasionada por CCl₄.

Al comparar el grupo intacto con el cirrótico (figura 17 (a)), se observó que la producción de estos componentes es normal, sin embargo, durante la lesión, se demostró que ambos tipos de colágeno son sobre producidos, según la recuperación endógena presentada en la figura 17 (c), existió una disminución en la cantidad de colágeno I y III sintetizada en comparación con el cirrótico control, sin embargo, se logró apreciar que la concentración aun es elevada al compararse con el intacto, los grupos tratados con los alfa/beta adreno bloqueadores (figura 17 (d) y 17 (e)) también disminuyeron la cantidad de colágeno I y III, el grupo de doxazosina mostró aparentemente menor proporción respecto al grupo tratado con carvedilol, lo que pudiera indicar que la doxazosina inhibe a las células estelares hepáticas activadas, la figura 17 (f) representante del grupo Doxa+carve, mostró una concentración de colágeno tipo I similar al grupo intacto.

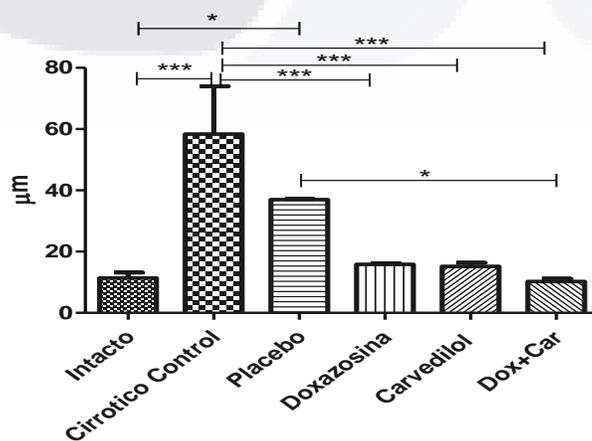
La figura 17 (g) presenta la cuantificación del grosor de colágeno tipo I distribuida alrededor de vena porta o vena central, el grupo intacto tubo una

cantidad menor a todos los grupos experimentales, principalmente al cirrótico control y placebo; el grupo placebo no presentó diferencia significativa respecto al cirrótico control, esto indicó que este grupo no regeneró de forma efectiva el tejido hepático, este resultado se confirma con la diferencia significativa que presentó con los grupos tratados con doxazosina y/o carvedilol. Los grupos tratados con los alfa/beta adrenobloqueadores no presentaron diferencias significativas con el intacto indicio importante de la reversión del daño en tejido hepático; la sinergia con los medicamentos, fue la que logró los mejores valores en cuanto a la cuantificación de colágeno tipo I, pues restituyó los valores de esta proteína casi igual al intacto.



g)

Grosor de colágeno tipo I en vasos sanguíneos



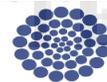


Figura 17: Fibras de colágeno distribuidas alrededor de vena porta y central en tejido de grupos experimentales, tinción Rojo Sirio microscopía de luz polarizada. a) Intacto, Colágena tipo I (flecha roja) y colágena tipo III (flecha Amarilla) organizada alrededor de vena central, 40x. **b) Cirrótico control**, Acumulación de colágena alrededor de vena central (VC), mayor concentración de colágena tipo I (flecha roja) y poca concentración de colágena tipo III (flecha amarilla), grosor de fibras de colágena mayor al grupo intacto, 40x. **c) Placebo**, disminución del grosor y la cantidad de colágena encontrada en tejido, el tipo de colágena representativo es I (flecha roja). **d) Doxazosina**, Contenido de colágena tipo I (punta de flecha azul) similar al presente en intacto, 40x. **e) Carvedilol**, contenido de colágena abundante tipo I (flecha amarilla) y III (flecha roja), pero menor al grupo placebo, 40x. **f) Doxa+Carve**, Colágena tipo I encontrada en grupo tratado con sinergia de alfa/beta adreno bloqueadores (flecha amarilla), proporción similar al grupo intacto, 40x. **h) Grosor de colágeno tipo I en vaso**, valores encontrados en grupos experimentales del grosor encontrado alrededor de vena central y portal, disminución importante de colágena en grupos tratados respecto al cirrótico control sin diferencia significativa respecto al intacto, el placebo muestra diferencias significativa con intacto y doxa+carve. Representación de la media de cada grupo experimental \pm desviación estandar (n=3 muestras de tejido por grupo experimental, * $p < 0.05$).

El grosor de las fibras de colágeno principalmente tipo I encontrado en parénquima, se aprecia en la figura 18, el grupo intacto mostró pocas zonas con contenido de colágeno tipo I y III (figura 18(a)), el cirrótico control cuenta con un grosor considerable respecto a todos los grupos experimentales, indicando el daño que ha sufrido el tejido hepático (figura 18(b)), el grupo placebo disminuyó el grosor de colágeno tipo I, sin embargo, aún sigue siendo una cantidad considerable respecto al intacto, en los animales tratados con los medicamentos alfa-beta adrenobloqueadores también se ha disminuido el grosor de las fibras de colágeno tipo I, la sinergia (Doxa+Carve) casi logra restituir el tejido al contener aparentemente concentraciones de colágeno de similares al intacto (18 figura (d-e)), este patrón se observa con mayor claridad en la figura 18(g), donde vemos en la cuantificación como todos los grupos experimentales disminuyen el grosor de las fibras de colágeno tipo I encontrado en el tejido respecto al grupo cirrótico control. Los valores de la sinergia doxa+carve fueron muy similares al intacto por lo que este acontecimiento es una muestra de la efectividad que tienen ambos medicamentos cuando son suministrados a la par.

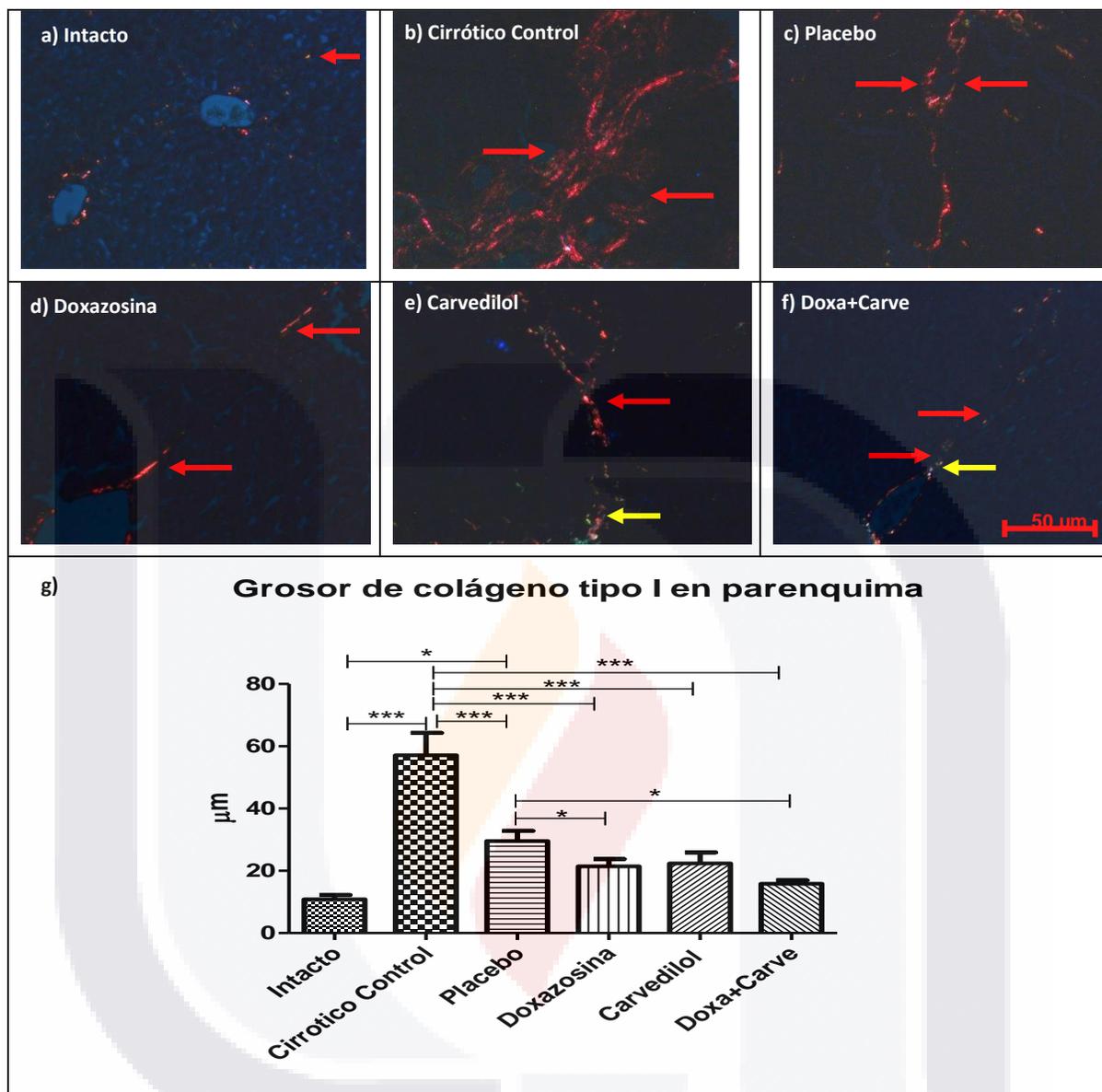


Figura 18: Fibras de colágeno distribuidas en tejido de grupos experimentales, tinción Rojo Sirio con microscopia de luz polarizada. a) Intacto, Colágena tipo I (flecha roja), poca concentración y grosor bajo, 20x. **b) Cirrótico control**, Grosor de colágena tipo I abundante, daño importante en tejido, 20x. **c) Placebo**, disminución del grosor y la cantidad de colágena encontrada en parénquima, el tipo de colágena representativo es I (flecha roja). **d) Doxazosina**, disminución del grosor de colágena tipo I (flecha roja), 20x. **e) Carvedilol**, grosor de colágeno tipo uno menor que grupo cirrótico y placebo (flecha roja), la flecha amarilla representa poco contenido de colágena tipo III, 20x. **f) Doxa+Carve**, Colágena tipo I (flecha roja) proporción similar al grupo intacto, 20x. **g) Grosor de colágena laminar**, comparación de grosor de colágena en parénquima identificado en todos los grupos, aumento de los valores en el grupo cirrótico, restablecimiento en grupos tratados y placebo sin diferencia significativa respecto al intacto, Representación de la media de cada grupo experimental \pm desviación estandar (n=3 muestras de tejido de cada grupo experimental, * $p < 0.05$).



El proceso de reversión de cirrosis se comprobó con la cuantificación del grosor de fibras de colágeno tipo I y lo observado en la figura 16, 17 y 18 donde claramente se identificó que los grupos tratados con alfa/beta adrenobloqueadores restituyen en gran medida el tejido hepático, todo esto sugiere la eficiencia que están presentando estos medicamentos en la reversión de cirrosis hepática en hámsteres.

4.2 Identificación y cuantificación de células estelares activadas

Las células estelares hepáticas activadas, son una población celular encontrada en tejidos hepáticos dañados, normalmente estas células se encuentran en estado quiescente en el hígado funcionando como almacenadoras de retinol y son conocidas como células estelares o células del ITO, cuando existe alguna lesión hepática, son estimuladas hacia una diferenciación parecida a miofibroblastos convirtiéndose en las principales productoras de colágeno tipo I; En nuestra investigación, las células estelares hepáticas activadas, se identificaron por medio del marcador α -sma (figura 19) a través de inmunohistoquímica donde observamos en el grupo intacto, placebo y tratados con alfa/beta adrenobloqueadores, una distribución muy similar, fueron localizadas principalmente alrededor de la vena central o portal, en estas zonas es donde se encontraron los depósitos de colágena, corroborando así, la actividad de las CEHs activadas. El grupo cirrótico muestra una expresión mayor pues su actividad se encuentra elevada por el daño hepático ocasionado por el CCl_4 (Figura 19(b)).

La expresión de α -SMA se realizó por Westernblot, se observó la diferencia encontrada en los grupos experimentales demostrado en la figura 20(a), la cuantificación fue realizada por densitometría óptica con el programa ImageJ, figura 20(b), de esta manera se dedujo la densidad de estas células fibrogénicas. Se pudo observar que el grupo cirrótico control tiene una alta expresión de α -SMA en comparación al grupo intacto, la sinergia de los medicamentos logró reestablecer casi por completo los valores de estas

proteínas en las células estelares hepáticas activadas, igualando los valores presentes en el grupo intacto; el grupo placebo, doxazosina y carvedilol también disminuyeron la expresión de α -SMA, estos resultados demuestran que los tratamientos con doxazosina y carvedilol inhiben la actividad de las células estelares hepáticas activadas.

Como lo indica la cuantificación, se observó que el grupo placebo tiene una disminución de la expresión de α -SMA en las CEHs activadas ligeramente mayor a los tratamientos en particular (figura 20(b)), sin embargo, la concentración de colágena encontrada fue mayor en el grupo placebo vs doxazosina y carvedilol (figuras 17(c), 17(g) 18(c) y 18(g)), esto puede deberse a la participación de miofibroblastos pertenecientes al lecho vascular; según Knittel y cols. (1999), la participación de las células estelares hepáticas activadas en el desarrollo de la cirrosis es diferente dependiendo del tiempo de la lesión, cuando se inicia el proceso de daño la participación de las células estelares hepáticas activadas es importante, una vez que ya ha continuado la lesión estas células regresan a un estado quiescente, dejando la participación ahora de otras células especializadas en la producción de colágeno (miofibroblastos), aumentando aún más la lesión, esta podría ser la razón por la cual, con el Western Blot las células estelares identificadas fue menor que en doxazosina y carvedilol (figura 20(b)).

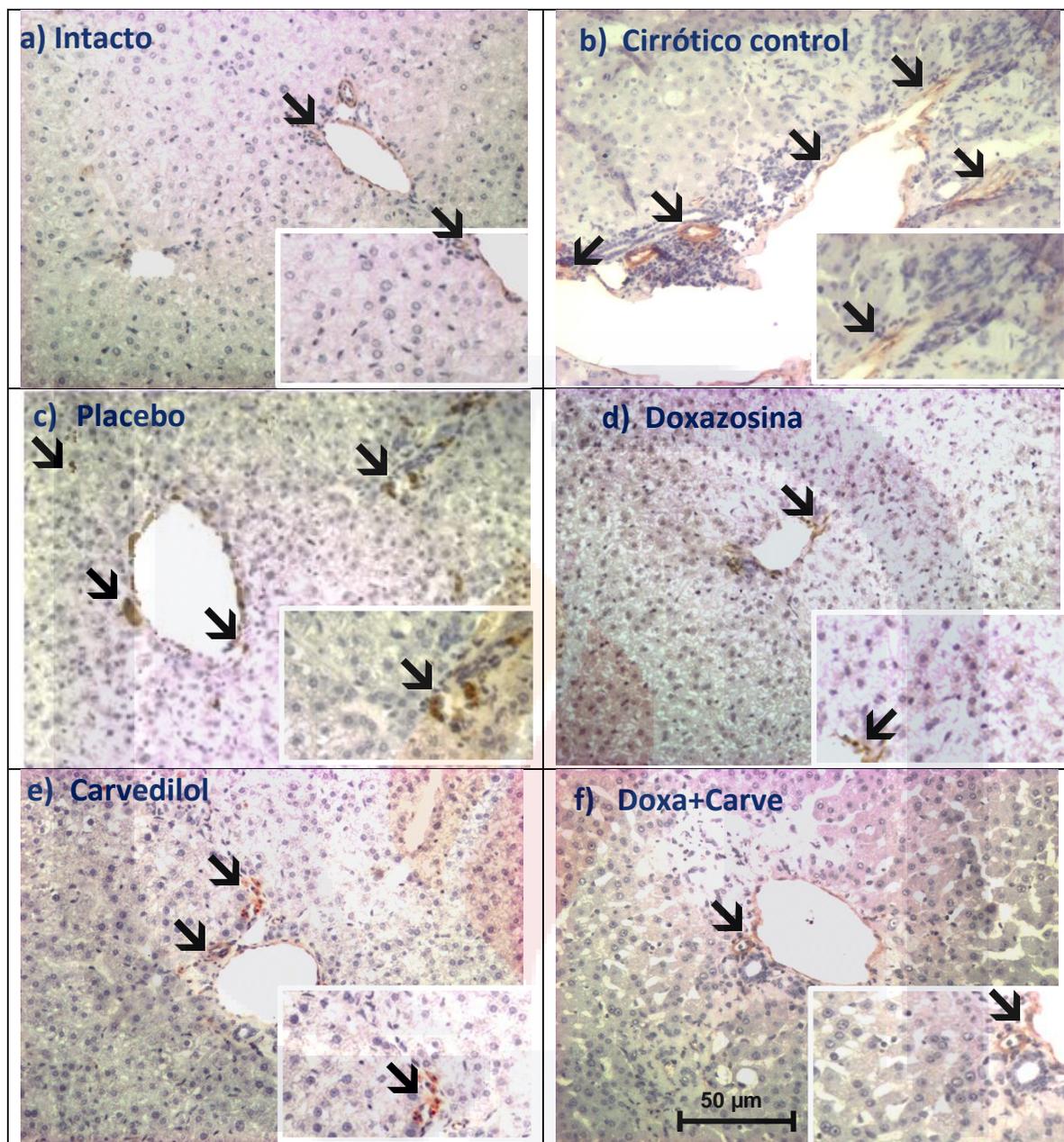


Figura 19: Identificación de células estelares hepáticas activadas por α -SMA. **a)** Intacto, células estelares identificadas alrededor de vena portal (flecha negra). **b)** Cirrótico control, marcado positivo de células estelares activadas, mayor cantidad en comparación con todos los grupos experimentales (flecha negra). **c)** Placebo, marcaje positivo de células estelares organizadas alrededor de vena central y portal (flecha negra). **d)** Doxazosina, identificación de células estelares activadas alrededor de vena central (flecha negra). **e)** Carvedilol, marcaje positivo de células estelares (flecha negra). **f)** Doxa+Carve, marcaje positivo de células estelares activadas organizadas alrededor de vena central (flecha negra). Magnificación 20x, ampliación 40x.

4.2 Identificación y cuantificación de marcadores de fibrosis hepática en grupos experimentales

4.2.1 Determinación del Factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta)

El factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), es una proteína la cual durante cirrosis hepática, su expresión se ve aumentada, se le conoce como uno de los mediadores más potentes profibrogénicos, se ha demostrado que tiene un efecto estimulante sobre las células estelares hepáticas activadas en la síntesis de fibras de colágeno; durante la investigación se logró corroborar los antecedentes que se tienen sobre este factor, la figura 20a muestra como la expresión del TGF-beta en el grupo cirrótico fue más notable que en los otros grupos experimentales, el grupo intacto tuvo una expresión muy pobre lo cual es adecuado pues este grupo pues se encontró en buenas condiciones, en el grupo placebo respecto al intacto, fue mayor la expresión, los grupos doxazosina, carvedilol y Doxa+carve, fueron muy parecidos al intacto, particularmente la expresión en el grupo doxa+carve la cual representa la mayor semejanza con el intacto a diferencia de todos los grupos experimentales, esta última correlación es de suma importancia pues nuevamente nos demuestra la efectividad de estos medicamentos en la reversión de cirrosis hepática.

En la figura 20c se muestra la cuantificación del TGF-beta respecto a beta actina a través de densitometría óptica, en esta grafica se corroboró lo observado en el bandeado obtenido por Western blot de la figura 20a, donde la proporción de TGF-beta en el grupo cirrótico control se encontró muy elevada respecto al intacto; el grupo doxa+carve mostró una disminución mayor respecto a los tratamientos individuales y al grupo placebo, y casi restableció sus valores de forma similar al intacto; en los grupos doxazosina, carvedilol y placebo también se observó disminución en la concentración de TGF-beta en comparación del grupo cirrótico, indicando la efectividad de los tratamientos así como la propia recuperación endógena mostrada a través del placebo.

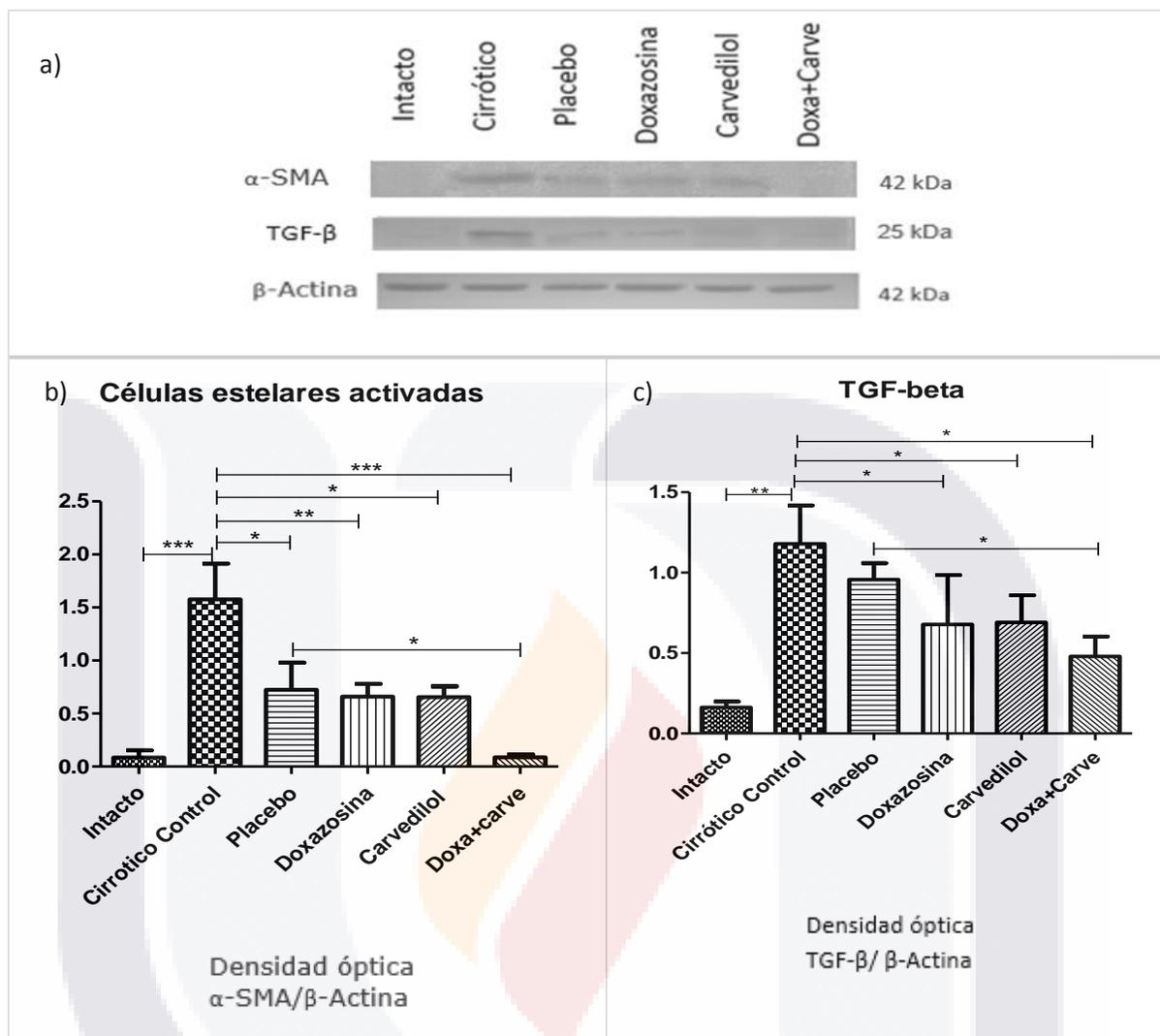


Figura 20. Expresión y Cuantificación de α -SMA para células estelares hepáticas activadas y TGF- β : **a)** Western Blot para α -SMA, TGF- β y β -actina en grupos experimentales. **b)** Análisis densitométrico de α -SMA contra β -actina para la identificación de células estelares. **c)** cuantificación del factor de crecimiento transformante beta de grupos experimentales, grupo cirrótico control cuenta con una concentración elevada respecto a los otros grupos, Doxa+carve disminuye en mayor concentración la expresión reestableciendo de forma muy similar al intacto. Los datos representan la media obtenida de las muestras de cada grupo experimental \pm desviación estándar de cada uno de los marcadores de cirrosis analizados (n=3 muestras de tejido por grupo experimental, * p<0.05).

4.2.2 Determinación de la metaloproteína 13 (MMP-13)

La MMP-13, es una enzima que tiene como función degradar colágeno tipo I y III, durante lesiones hepáticas como lo es la cirrosis hepática. La expresión de esta proteína se encontró disminuida en el grupo cirrótico, de la misma manera

en la cuantificación por PCR y densitometría, esta enzima estuvo por debajo de los niveles normales en el grupo cirrótico control respecto al intacto; los grupos placebo y carvedilol, tanto en la figura 21(a) como 21(b), no mostraron una expresión tan marcada al ser comparada con el grupo intacto, esto puede deberse a que esta proteína debe de estar en mayor concentración para poder degradar las altas concentraciones de colágeno que fueron producidas durante la inducción de cirrosis, el grupo doxazosina al contrario presentó valores muy similares al intacto, finalmente se observó como el grupo doxa+carve tiene una expresión menor de MMP-13 en relación al intacto, posiblemente porque el proceso de reversión de cirrosis hepática es más rápido en este grupo, y lo que sucede es que esta proteína está comenzando a reestablecer su expresión, puede ser que eventualmente en un inicio de la reversión existía una concentración elevada de esta proteína posteriormente esta tuvo que disminuir drásticamente para ir poco a poco restableciendo su expresión y así alcanzar valores normales como en el intacto.

4.2.2 Determinación del inhibidor Tisular de Metaloproteinasa 2 (TIMP-2)

Los inhibidores tisulares de metaloproteinasas, son proteínas que se encargan de inhibir la actividad de las metaloproteinasas, durante cirrosis hepática se observó que TIMP-2 muestra una expresión mayor en comparación con estados normales del hígado; en la figura 21(a) y 21(c) se muestra como la expresión y cuantificación en el grupo cirrótico control fue el doble o más a casi todos los otros grupos experimentales, principalmente el intacto, el grupo placebo fue el único que no tuvo diferencias significativas en relación al cirrótico control; los grupos experimentales tratados con los alfa/beta adrenobloqueadores presentaron una expresión así como cuantificación del TIMP-2 comparable al intacto, estos resultados indican la efectividad de los medicamentos al restituir casi en su totalidad los valores de esta proteína después de una lesión en el hígado.

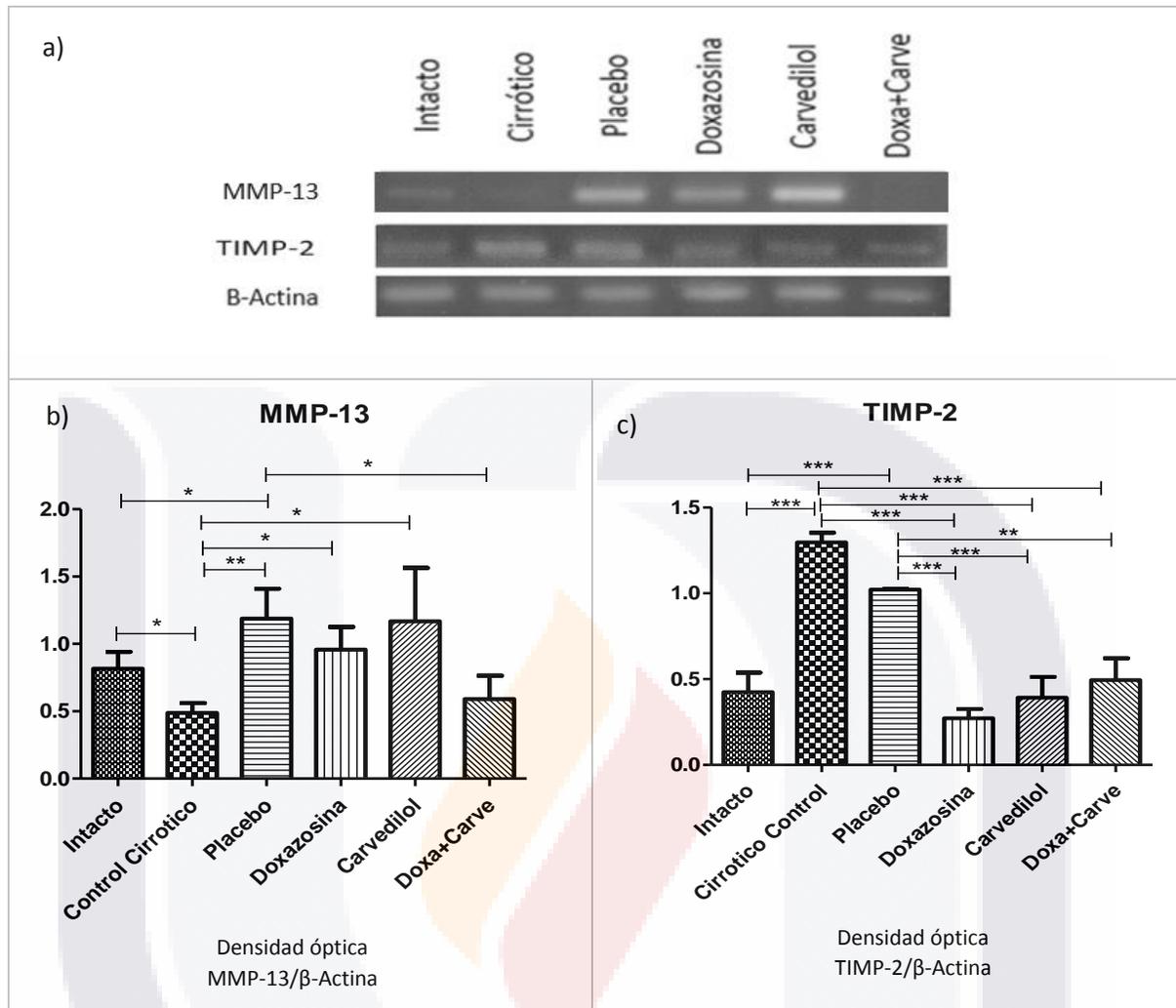


Figura 21. Expresión y cuantificación de la Metaloproteinas 13 e Inhibidor tisular de Metaloproteinasas 2 (TIMP-2) en los grupos experimentales. a) Expresión de la MMP-13, TIMP-2 y β-Actina por PCR en grupos experimentales. b) Cuantificación por densidad óptica de la MMP-13 de grupos experimentales, grupo cirrótico control cuenta con una concentración pobre respecto a los otros grupos, Doxa+carve disminuyó la concentración de la expresión reestableciendo de forma muy similar al intacto. c) Cuantificación por densidad óptica de TIMP-2, se observa gran concentración del TIMP-2 en grupo cirrótico control, congruente con lo observado en figura 21-a, los grupos tratados con alfa/beta adrenobloqueadores disminuyeron de manera significativa la expresión de esta proteína llegando a valores similares al intacto, el placebo no presenta cambios significativos respecto al cirrótico control pero si con los demás grupos experimentales. Los datos representan la media de cada grupo experimental ± desviación estandar (n=3, * p<0.05).



...CAPITULO VII DISCUSIÓN...



7. Discusión

La cirrosis hepática es una enfermedad conocida por los grandes índices de mortalidad a nivel mundial, en México, es la sexta causa de muerte y los principales factores que la provocan son el alcohol, el hígado graso no alcohólico y la hepatitis B y C, actualmente no existe un tratamiento capaz de revertirla; existen diversas investigaciones experimentales en modelos de roedores, donde se ha buscado primeramente conocer a dicha enfermedad y la serie de acontecimientos que se generan con ella, a raíz del conocimiento de algunos de las causas que aceleran y agravan el proceso de cirrosis hepática, se logró identificar la participación de una población celular residente del hígado las cuales son las responsables de la sobreproducción de fibras de colágeno, este descubrimiento genero la oportunidad de buscar nuevas terapias para revertir dicha enfermedad. En este proyecto se buscó la posibilidad de que la doxazosina y el carvedilol, ambos medicamentos utilizados contra la hipertensión, pudieran revertir cirrosis hepática, obteniendo buenos resultados; la inducción de cirrosis hepática fue realizada en un modelo en hámster tomando como referencia el estudio realizado por Muñoz-Ortega y cols., (2015), de la misma manera utilizamos tetracloruro de carbono para el modelo de cirrosis hepática, prolongando la inducción a 20 semanas, este periodo resultó ser el adecuado para que se produjera la enfermedad en los hámsteres, la dosis fue la misma que utilizó Muñoz-Ortega y cols., (2015), la variación en el tiempo de desarrollo de cirrosis hepática respecto al estudio previo tomado como referencia, pudo deberse a las propias características de los animales, pues van a existir diferencias biológicas que pueden ser un punto importante por el cual existan variaciones en los diferentes modelos experimentales utilizados en la investigación científica, a pesar del tiempo que llevo la inducción, se logró desarrollar cirrosis hepática en los hámsteres experimentales utilizados en el estudio en base a el daño observado en el hígado a través de las tinciones realizadas y los marcadores moleculares analizados, se analizaron 3 muestras de cada grupo para generar resultados

significativos con el objetivo de disminuir la variabilidad biológica que presenta cada animal.

En este estudio como ya se mencionó, se utilizó para la reversión de cirrosis hepática, alfa y beta adrenobloqueadores, anteriormente se habían utilizado diferentes tipos de estos, tales como prazosina y propanolol (Oben y cols., 2004) de la misma manera para la reversión cirrosis hepática.

En nuestra investigación se consideró hacer uso de alfa y beta adrenobloqueadores, por una característica importante que presentan las células estelares hepáticas, se conoce según Friedman (2008), que estas células, son las principales responsables de la producción de colágena durante la cirrosis hepática.

Oben y cols., (2004), en sus estudios también mencionan la importancia de las células estelares hepáticas activadas durante una lesión en el hígado, ellos identificaron que expresan receptores adrenérgicos, y demostraron in vitro que al inhibirlas con medicamentos adrenobloqueadores, su actividad y proliferación disminuía, ellos utilizaron propanolol (beta-bloqueador) y prazosina (alfa-1-bloqueador); nosotros hicimos uso de la doxazosina y el carvedilol, el uso de estos medicamentos, resultó ser efectivo en la reversión de la cirrosis hepática las dosis utilizadas correspondieron a las que uso Muñoz-Ortega y cols., (2015), 1 mg/kg para doxazosina y 1.2 mg/kg para carvedilol, también se implementó una más en la sinergia utilizando dosis de 0.23 mg/kg para doxazosina y 0.35 mg/kg para carvedilol; se demostró que estos medicamentos inhiben la actividad de las células estelares hepáticas activadas, lo cual se pudo identificar a través de la disminución de la expresión de alfa-SMA (figura 19), así como la disminución de colágena en tejido hepático (figura 17 y 18), comprobamos al igual que Oben y cols., (2004), que los adrenobloqueadores resultan ser efectivos para revertir cirrosis hepática, sin embargo, nosotros estamos probando que el carvedilol a diferencia del propanolol (medicamentos beta adrenobloqueadores) puede ser mejor candidato en el tratamiento para revertir cirrosis hepática, este argumento se



corroborar con otro estudio realizado por Bañares y cols. (1999), donde se constató que el carvedilol ayudó a mejorar la presión portal en mayor proporción respecto al propranolol en pacientes con cirrosis, igualmente Hamdy y El-Demerdash (2012), demostraron la efectividad del carvedilol para mejorar la función hepática durante un daño en el hígado en modelo de rata atribuyéndole ésta mejora a las propiedades antioxidantes con que cuenta este medicamento, todas éstas evidencias y los resultados obtenidos exhiben el acertado uso del carvedilol para revertir la cirrosis hepática y como es que este beta adrenobloqueador cuenta con mejores efectos para revertir dicha enfermedad respecto a otros beta-adrenobloqueadores como es el caso del propranolol.

La doxazosina es un alfa adrenobloqueador, este medicamento se probó en 2015 por Muñoz-Ortega y cols., ellos pudieron constatar que este medicamento es efectivo en la reversión de cirrosis hepática, nosotros nuevamente estamos corroborando estos resultados ya que durante nuestra investigación, este alfa adrenobloqueador pudo recuperar en gran medida la histología hepática (figura 17), de la misma manera los marcadores analizados alcanzaron valores similares al grupo intacto (figura 18-21). No obstante, un aspecto importante de este trabajo fue el obtenido con la sinergia, donde a una dosis baja de ambos medicamentos, el tejido logra un restitución muy similar al intacto. Nuestros resultados se pueden confirmar en estudios realizados con medicamentos pertenecientes a la familia de los alfa-adrenobloqueadores como la prazosina, la cual también ha sido utilizada para tratar de revertir cirrosis hepática, este medicamento se probó *in vitro* en la inhibición de las células estelares hepáticas activadas, Oben y cols. (2004), demostraron que con su uso la proliferación y activación de estas células disminuía, estos resultados indican la eficacia que tienen los alfa-adrenobloqueadores contra la cirrosis hepática, por otro lado y para confirmar el efecto protector con que cuenta la doxazosina, Perilini y cols. (2005), probaron que este medicamento lograba reducir las fibras de colágena producidas en fibrosis cardiaca, estos hallazgos resultan ser de gran

importancia pues se está confirmando que la doxazosina es un buen candidato para revertir fibrosis independientemente del órgano a tratar.

En nuestra investigación probamos un tratamiento utilizando ambos medicamentos, se utilizaron en un grupo de hámsteres con cirrosis hepática, comprobando que la sinergia es mucho más efectiva que con el uso particular de los medicamentos, los resultados fueron prometedores pues según las figuras (17(f-g), 18(f-g), 19(f-g)), se observa que los valores son muy semejantes al grupo de animales sanos, este hallazgo puede ser utilizado para realizar más estudios respecto a la dosis pues a pesar de que los resultados se encuentren satisfactorios, se puede mejorar aún más la respuesta, algunos estudios ya habían manejado sinergias de medicamentos alfa/beta adrenobloqueadores como lo que se realizó por Oben y cols. (2004), utilizando propanolol y prazosina *in vitro* e *in vivo* en modelos de rata y ratón, consiguiendo resultados similares a los nuestros, el efecto observado en ambas investigaciones habla de la respuesta de las células estelares hepáticas activadas ante inhibidores alfa y beta adrenérgicos donde se podría concluir que al inhibir ambos receptores, la actividad de estas células se ve más afectada por lo que como consecuencia el tejido hepático comienza a regenerarse.

Las metaloproteinasas 13 (MMP-13) son proteínas las cuales según Tsukamoto (1999), durante una lesión hepática su expresión disminuye, esta proteína en condiciones normales degrada colágeno tipo I y III.

La figura (21(a)) muestra como el grupo cirrótico control, no se expresa MMP-13, lo cual afecta la degradación de colágeno tipo I y III demostrado en las figuras (17(b) y 18(b)). En este sentido los alfa/beta adrenobloqueadores utilizados durante la investigación, demostraron como su uso aumentaba de manera significativa la expresión de esta proteína (figura 21(a) y 21(b)) probando nuevamente la efectividad de los medicamentos ahora en marcadores de fibrosis. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es otra proteína que regula diversas actividades celulares como proliferación y



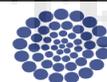
diferenciación celular, según Senties-Gómez y cols., (2005), en su revisión, dicen que es una de las principales proteínas profibrogénicas durante cirrosis hepática, Meindl-Beinker y cols., (2012), mencionan que esta proteína puede verse altamente expresada en diversos estados de daño hepático como fibrosis hepática, cirrosis hepática y hepatocarcinoma, también indican que se ve involucrada en la activación de las células estelares hepáticas; las células de Kupffer son otra población celular residente del hígado, estas tras una lesión, son activadas, esta activación ocasiona que liberen precisamente este factor de crecimiento, Friedman (2008) menciona que las células de Kuffer al liberar esta citocina, activan a las células estelares hepáticas, y una vez que las CEHs, se encuentran activadas liberan aún más TGF- β con lo que estarán activando a otras CEHs vecinas; ambas poblaciones celulares cuentan con receptores adrenérgicos (Oben y cols., 2004), aparentemente la regulación de diferentes citocinas como lo es el TGF-beta tiene una relación muy estrecha con la estimulación de receptores adrenérgicos (Sanz-Rosa D., 2010), es por ello que si son inhibidos los receptores adrenérgicos con el uso de alfa y beta adrenobloqueadores, puede disminuir la activación de las células estelares hepáticas; nosotros comprobamos *in vivo* que el TGF- β se sobreexpresa en el grupo cirrótico control (figura 20(a)), también demostramos que la doxazosina y el carvedilol disminuyeron su expresión y que la aplicación sinérgica de ambos medicamentos fue más efectiva que la aplicación individual (figura 20(a) y 20 (c)).

El inhibidor tisular de metaloproteinasas II, es otra proteína encargada de inhibir la actividad de las diversas isoformas de metaloproteinasas, es decir, se encarga de inhibir la degradación de matriz extracelular, Benyon y cols., (1996), demostraron como esta proteína se ve elevada durante cirrosis hepática, este mismo efecto se observó en nuestro estudio donde en el grupo cirrótico control su concentración es mucho mayor que en el grupo intacto (Figura 21(a) y 21(c)), estos resultados confirman que esta proteína se sobreexpresa durante una lesión hepática, el uso de los alfa/beta

adrenobloqueadores demostró la disminución de su expresión y con ello la efectividad que tienen en el daño hepático.

Mediante los tres marcadores de fibrosis investigados (TGF- β , MMP-13 y TIMP-2), se demostró que la sinergia de doxazosina con carvedilol, restituye casi por completo sus valores respecto al grupo intacto (figuras 20 y 21), esto nos dice que los medicamentos funcionan en la reversión de cirrosis hepática.





...CAPITULO VIII CONCLUSIÓN...

8. Conclusión

- Se estableció un modelo de cirrosis hepática en hámsteres a las 20 semanas de inducción de tetracloruro de carbono con una dosis de 50 mg/kg
- Los adreno bloqueadores (Doxazosina y carvedilol), disminuyeron el daño en el hígado del hámster ocasionado por la cirrosis hepática, el parénquima no se recuperó por completo pero si sanó bastante (figura 16) esto ayudó a que la función hepática mejorara.
- La cantidad de las células estelares hepáticas activadas identificadas en los grupos tratados fue muy similar al grupo intacto, esto es congruente con los marcadores de fibrosis estudiados y la cantidad de colágeno tipo I, donde la expresión de las células estelares hepáticas activadas depende en gran medida de la estimulación del TGF- β , y la cantidad de colágeno tipo I así como la expresión de TIMP-2, va derivar de la cantidad de estas células presentes.
- El TGF- β , el colágeno tipo I y el TIMP-2 se expresan poco en condiciones normales, los tratamientos utilizados lograron disminuir su expresión respecto al cirrótico control; la MMP-13 disminuye durante lesiones hepáticas, este efecto se demostró en el cirrótico control, los tratamientos ayudaron a aumentar dicha expresión con valores semejantes al intacto.
- En todas las pruebas realizadas, los tratamientos mostraron efectos positivos con resultados similares al intacto
- La sinergia logró la mayor capacidad de reversión de cirrosis hepática, demostrando con ello que el modelo establecido es capaz de revertir esta enfermedad, también, el uso de adrenobloqueadores alfa y beta en sinergia es más efectivo que su uso individual, este evento genera la posibilidad de realizar más investigación acerca de otras dosis y posibles mejoras en cuanto a la respuesta de estos medicamentos en la reversión de cirrosis hepática.



...CAPITULO IX REFERENCIAS...

9. Referencias

1. Ávila R., Gorodner A., Samar M. E. y Reyes V. (2014). Microscopía de polarización y tumores de glándulas salivales humanas. *Oral*, 1155-1158.
2. Basu S. (2003). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Elsevier Science Ireland. Toxicology*, 113-127.
3. Bataller R. y Brenner D. A. (2005). Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 209-218.
4. Bellota P., Martínez-Moreno B., Palazón J., y Duch J. (2012). Ascitis y síndrome hepatorenal. *Medicine*, 644-651.
5. Boll M., Weber L. W., Becker E. y Stampfl A. (2001). Mechanism of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity Hepatocellular Damage by Reactive Carbon Tetrachloride Metabolites. *M. Boll et al.*, 649-659.
6. Buey L. G., Gonzalez-Mateos F. y Moreno-Otero R. (2012). Cirrosis Hepática. *Medicine*, 625-633.
7. Cascales-Angosto M. y Álvarez-Gómez J. Á. (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *R. Acad. Nac. Farm*, 59-84.
8. Cassiman D., Pelt J. v., Vos R. D., Lommel F. V., Desmet V., Yap S.H. y Roskams, T. (1999). Synaptophysin: A Novel Marker for Human and Rat Hepatic Stellate Cells. *American Journal of Pathology*, Vol. 155, No. 6, 1831-1839.



9. Castilho A., Candido D., Fontes A. M., Ferreira F. U., Picanço V., Freitas M. C. y Covas D. T. (2011). Human hepatic stellate cell line (LX-2) exhibits characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental and Molecular Pathology*, 664–672.
10. Clària J. y Titos E. (2004). La célula de Kupffer. *Gastroenterol Hepatol*, 264-273.
11. Coronato S., Laguens G. y Girolamo V. D. (2012). Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patologías tumorales. *Rev. Medicina (Buenos Aires)*, 495-502.
12. Cubero F. J. y Nieto N. (2006). Células de Kupffer y hepatopatía alcohólica. *Enferm Dig.*, 460-472.
13. Dubuisson L., Desmoulière A., Decourt B., Evade L., Bedin C., Boussarie L. y Rosenbaum J. (2002). Inhibition of Rat Liver Fibrogenesis Through Noradrenergic Antagonism. *Hepatology*, Vol. 35, 325-331.
14. Friedman S. L. (2008). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev*, 125–172.
15. Fujii T., Fuchs B. C. y Yamada S. (2010). Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC Gastroenterology*, Vol. 10, 1-11
16. García M. J., Rodríguez A. d. y Sánchez E. B. (2006). Técnicas Inmunohistoquímicas y diagnóstico molecular. En *Técnico Especialista en Anatomía Patológica* (págs. 131-133). Sevilla, España: MAD S.L.

17. Gartner L. P. y Hiatt J. L. (2002). *Texto Atlas de Histología*. (Págs. 402-412). Estados Unidos de América: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C. V.,
18. Geerts A., Schuppan D., Lazeroms S., De-Zanger R. y Wisse E. (1990). Collagen type I and III occur together in hybrid fibrils in the space of Disse of normal rat liver. *Hepatology*, 233-241.
19. Gómez-Mena C. (2012). La cirrosis hepática es la sexta causa de muerte en México: especialista . *La Jornada*.
20. Gumucio J. J. y Miller D. L. (1981). Functional implications of liver cell heterogeneity. *Gastroenterology*, 393-403.
21. Gutiérrez-Ruiz D. C. y Kershenobich D. D. (2003). Fibrosis Hepática. *Revista Gastroenterologa de México*, 31-34.
22. Guyton A. C. (2001). El Hígado como órgano. En A. C. Guyton, *Tratado de fisiología medica* (págs. 859-863). México Df.: McGraw Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.
23. Hamdy N. y El-Demerdash E. (2012). New therapeutic aspect for carvedilol: Antifibrotic effects of carvedilol in chronic carbon tetrachloride-induced liver damage. *Toxicology and Applied Pharmacology* 261, 292-299.
24. Heino J. (2007). The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays*, 1001-1010.
25. Hermosillo-Sandoval J. M., Ramírez-Casillas V., Hernández-Hoyos S., Osuna-Rubio J., Nuño-Guzmán C. M., Gálvez-Gastélum F. J. y Miranda-Díaz, A. G. (2008). Evaluación histológica de la fibrosis hepática en pacientes con



lesión posquirúrgica de vías biliares. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social* , 663-668.

26. Hernández-Nazará Z., Martínez-López E. y Domínguez J. A. (2005). Mecanismos moleculares de la regulación transcripcional de colágena $\alpha 1(I)$ por las células estelares hepáticas. *Investigación en Salud*, vol. VII , 33-39.

27. Herrerías J. M., Díaz-Belmont A. y Jiménez-Sáenz M. (1996). *Tratado de Hepatología*. Cap I, (Pags. 20-23). Sevilla, España: A. Pinelo, Camas-Sevilla .

28. INECC. (2009). Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos. México, pags. 22.

29. Jaramillo F., Rincón A. y Posadas., F. (2006). En F. Jaramillo, *Toxicología básica* (págs. 180-181). México: Ed. Textos Universitarios.

30. Knäuper V., Cowell S., Smith B., López-Otini C., ÓShea M., Morris H. y Murphy G. (1997). The Role of the C-terminal Domain of Human Collagenase-3 (MMP-13) in the Activation of Procollagenase-3, Substrate Specificity, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase Interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 7608-7616.

31. Koolman J. y Röhm H. (2004). *Bioquímica, Texto y Atlas*. Madrid, España: Panamericana.

32. Krishna M. (2013). Anatomía microscopica del hígado. *Clinical Liver Disease* .Vol. 2, 109-112.

33. Luna L. G. (1968). Chapter 1, Preparation of Tissue. En L. G. Luna, *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (págs. 1-2). New York: McGraw-Hill.

34. Luquin M. R. (2000). Parkinsonismo inducido por neurotoxinas. *Rev Neurol*, 31(1):60-6.
35. March-Riera S. (2006). Identificación y Caracterización Funcional de la Molécula de Membrana CD38 en Células Hepáticas Estrelladas. *Tesis doctoral, Universidad de Barcelona, Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica.*
36. Muñoz-Ortega M. H., Llamas-Ramírez R. H., Romero-Delgadillo N., Elías-Flores T., Tavares-Rodríguez E., Campos-Esparza M., Cervantes-García D., Muñoz L., Ventura-Juarez J. (2015). Doxazosin Treatment Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Hamsters through a Decrease in Transforming Growth Factor β Secretion. *Gut and Liver*, 1-8
37. Martín M. G. y Molina, A. Z. (2010). Transaminasas: Valoración y significación clínica. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHP-AEP*, 267-275.
38. Moore K. L. y Dalley A. F. (2007). *Anatomía con orientación clínica*. Pags. 296, Estados Unidos: Editorial Medica Panamericana S.A.
39. Navarro M., Arbonés J., Acín S., Carnicer R., Sarría A., Surra J. y Osada J. (2005). Animales de experimentación utilizados como modelos en la investigación de la arteriosclerosis. *Clin Invest Arterioscl.* , 82-93.
40. Niki T., Pekny M., Hellemans K., Bleser P. D., Berg K. V., Vaeyens F. y Geerts A. (1999). Class VI Intermediate Filament Protein Nestin Is Induced During Activation of Rat Hepatic Stellate Cells. *Hepatology*, 520-527.
41. Oben J. A. y Roskams T. (2004). Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut*, 438-445.



42. Oben J. A., Yang S., Lin H., Ono M. y Diehl A. M. (2003). Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 685-690.
43. Orellana M., y Guajardo V. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev Méd Chile*, 85-94.
44. Páramo-Hernández, D. B., Otero, W., & Pineda-Ovalle, L. F. (2010). Fibrogénesis Hepática. *Rev Col Gastroenterol*, 197-187.
45. Perlini S., Palladini G., Ferrero I., Tozzi R., Fallarini S., Facchetti A. y Ferrari A. U. (2005). Sympathectomy or Doxazosin, But Not Propranolol, Blunt Myocardial Interstitial Fibrosis in Pressure-Overload Hypertrophy. *Hypertension*, 1213-1218.
46. Poonkhum R., Pradidarcheep W. y Chaunchaiyakul S. N.-N. (2011). Distribution of Hepatic Myofibroblasts and Type I and III Collagen in Rat Liver Cirrhosis Induced by Thioacetamide. *Int. J. Morphol*, 501-508.
47. Secretaria de Salud Publica de México, Estadísticas de Mortalidad en México: Muertes Registradas en el año 2003. *Salud Publica de México*, vol.47, no.2, 172-187.
48. Secretaria de Salud Publica de México, Programa Nacional de Salud 2007-2012, Pags. 29-174.
49. Ramos C., Becerril-Berrocal C., Cisneros J. G. y Montañó M. (2004). El Miofibroblsto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 215-231.
50. Reznagel R. O., Glende E., Jr J. A. y Waller R. L. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmac. Ther.*, 139-154.

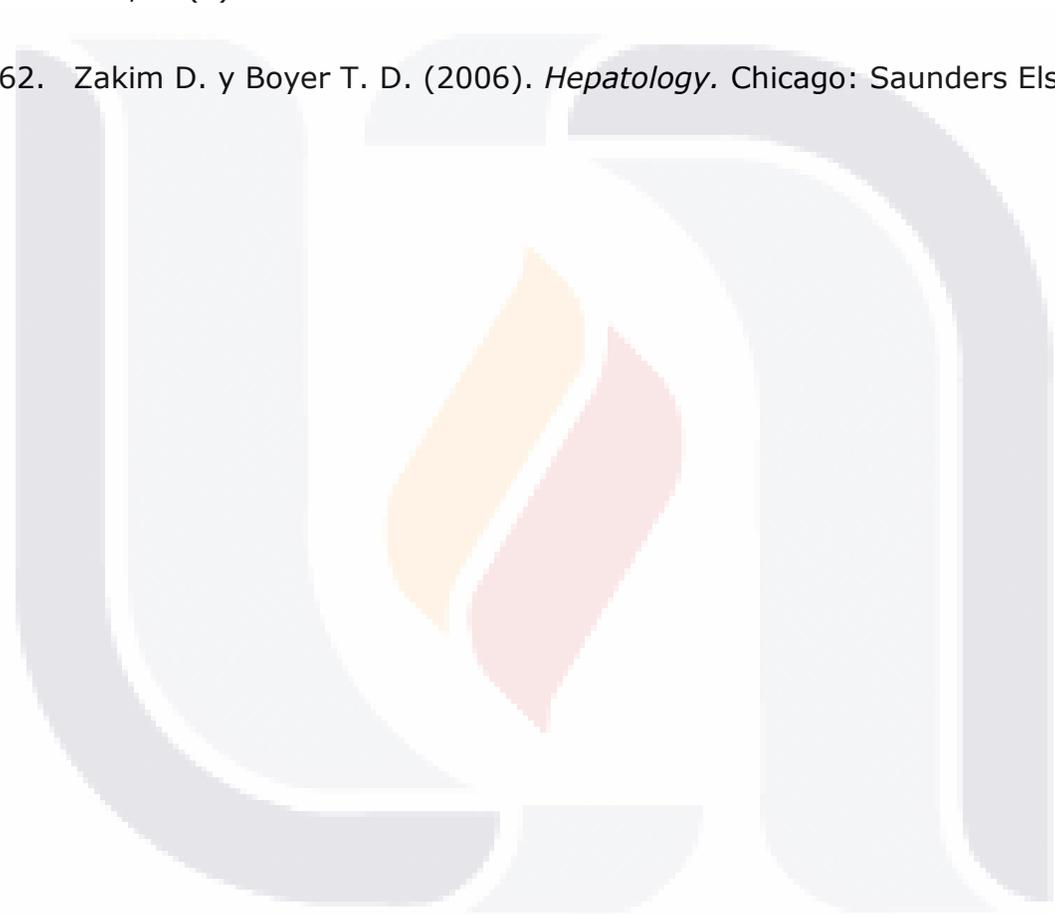
51. Reynaert H., Thompson M. G., Thomas T. y Geerts A. (2002). Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 50, 571-581.
52. Salvá J. A. (1966). Alfa y beta bloqueadores adrenérgicos en su relacion con la terapeutica. *Anales de Cirugia y Medicina* , 325-332.
53. Samar M. E., Ávila R. E., Asis O. G., Fonseca I. y Corball A. (2012). Identificacion de Colágeno I y III con Picrosirius Red/Polarización en el Estroma de Tumores Salivales. *Int. J. Odontostomat*, 59-64.
54. Sandoval E. (2005). *Tecnicas Aplicadas al Estudio de la Anatomía Vegetal*. Pags. 38-56. Cd. de Mexico: UNAM.
55. Sarema M., Znidaka R., Macíasb M. y Reyc, R. (2006). Las células estrelladas del hígado: su importancia en condiciones normales y patológicas. *Gastroenterol Hepatol*, 93-101.
56. Sgonc R., GeorgWick, Grundtman C. y Mayerl C. (2013). The Immunology of Fibrosis. *Annu. Rev. Immunol.* Vol. 31, 107-135.
57. Shah N., Groves A. y Anderson, D. (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell*, Vol. 85, 331-343.
58. Sundaram D. R. (2009). Factores de Crecimiento Fisiológicamente Balanceados de Aplicación Tópica: Nuevo Paradigma en el. En *Journal of Drugs in Dermatology* (págs. 3-13).
59. Ueno T., Sata M., Sakata R., Torimura T., Sakamoto M., Sugawara H. y Tanikawa K. (1997). Hepatic Stellate Cells and Intralobular Innervation in Human Liver Cirrhosis. *Human Pathology Volume 28, No. 8*, 953-959.



60. Vallejo A. (2012, Vol. 9 No. 1). Objeciones al uso de modelos animales. *Revista Lasallista de Investigación*, 7-11.

61. Ventura-Juárez J., Campos-Rodríguez R. y Tsutsumi V. (2002). Early interactions of *Entamoeba histolytica* trophozoites with parenchymal and inflammatory cells in the hamster liver: an immunocytochemical study. *Can J Microbiol*, 48(2):123-31.

62. Zakim D. y Boyer T. D. (2006). *Hepatology*. Chicago: Saunders Elsevier.



Apéndice

Inclusión de tejidos en parafina

Los tejidos son colocados en casetes para tejidos, y posteriormente montados en Histoquinet donde pasaran por diversos compuestos según marca el procedimiento.

Procedimiento:

Cubas	Compuesto	Tiempo
1	Agua destilada	1 hora
2	Alcohol 70%	1 hora
3	Alcohol 80%	1 hora
4	Alcohol 96%	1 hora
5	Alcohol 96%	1 hora
6	Alcohol 100%	1 hora
7	Alcohol 100%	1 hora
8	Alcohol-Xilol 1:1	1 hora
9	Xilol 100%	1 hora
10	Xilol 100%	1 hora
11	Parafina	1 hora
12	Parafina	1 hora

Una vez que el tejido paso por todas las cubas, se formaron bloques de parafina para posteriormente realizar cortes micrométricos.



Silanizado de laminillas

Reactivo	Volumen	Tiempo
Acetona	200 ml	5 minutos
Acetona-Silano al 2%	200 ml	5 minutos
Agua destilada	200 ml	2 lavados

Las laminillas se lavaron en cada uno de los reactivos finalmente se colocaron en horno a 50-65 °C por 24 hr. (Ventura-Juarez, 2002)

Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E)

Procedimiento:

1. Colocar laminillas en Xilol por 5 minutos dos lavados
2. Alcohol 100% por 2 minutos dos lavados
3. Alcohol al 96% por 2 minutos dos lavados
4. Agua destilada por dos minutos
5. Hematoxilina por 3 minutos
6. Agua corriente por 10 minutos
7. Eosina 1 minuto
8. Agua destilada 2 minutos
9. Alcohol al 96% 3 baños
10. Alcohol 100% 2 minutos, dos lavados
11. Xilol 5 minutos, dos lavados.
12. Montado con Entellan

(Luna, 1968)

Tinción Rojo Sirio

1. Xilol 7 minutos 2 lavados
2. Alcohol 100% 5 minutos 2 lavados
3. Alcohol 96% 3 minutos 2 lavados
4. Agua destilada 3 minutos
5. Incubar cortes en solución de hematoxilina de weigert para tinción de núcleos 8 minutos
6. Lavar por 5 minutos con agua corriente
7. Incubar en cámara húmeda con solución Rojo-Sirio picro durante una hora
8. Lavar con agua acidificada 2 baños
9. Alcohol al 96% 45 segundos 2 baños
10. Alcohol al 100% 2 minutos 2 baños
11. Xileno 7 minutos
12. Montado con Entellan

Agua acidificada

- 100 ml de Agua destilada
- 500 µl de Ac. Acético

Solución de hematoxilina de Weigert

I. Solución A

- Cristales de Hematoxilina 1 gr
- Alcohol al 95% 100 ml

II. Solución B

- Agua destilada 95 ml
- Ácido hidrociorhidrico concentrado 1 ml
- Cloruro Férrico 4 ml

Diluir partes iguales de amabas soluciones (Solución A y B), según se utilice.



(Luna, 1968)

Inmunohistoquímica

1) Desparanización del tejido:

Lavar con xileno y alcohol al 100% dos veces por 5 minutos respectivamente, lavar con alcohol al 96% por 10 minutos y uno más con alcohol al 70% por 5 minutos, finalmente lavar con agua corriente por 5 min.

2) Desenmascaramiento de epítomos:

Colocar dentro de olla a presión 1.5 lt de buffer de citrato de sodio, encender y dejar subir al máximo la presión, apagar y colocar las laminillas ya desparanizadas, quedando totalmente cubiertas de buffer, nuevamente encender la olla, una vez que salio el vapor se deja por dos minutos más, luego apagar y dejar reposar por 5 min dentro del buffer, pasado el tiempo, lavar laminillas con PBS 1x 5min/3 veces.

3) Inactivación de las peroxidasas endógenas:

Colocar laminillas en solución de metanol-peróxido (10%) durante 30 min. a temperatura ambiente, lavar con PBS 1x 3 veces/5 min., rodear el tejido con marcador pen PAP para poder permeabilizar las membrana, una vez que ya están circulados los tejidos colocar sobre ellos PBS 1x-Tritón X-100 (0.2%) por 30 min.

4) Bloqueo de uniones específicas

Incubar laminillas por una hora a temperatura ambiente con solución compuesta por Suero Fetal Bovino (20%) y PBS 1x-Triton X-100 (0.2%), lavar con PBS 1x 3 minutos, 3 veces

5) Primer Anticuerpo

Diluir el anticuerpo en PBS-Triton X-100 (0.2%) –BSA (3%), 1 μ l por cada 100 μ l de solución, Incubar toda la noche en cámara húmeda a 4° C., lavar laminillas con PBS 1x-Triton X-100 (0.2%) 3 veces/5 min.

6) Segundo anticuerpo

Incubar con el anticuerpo de DAKO Envision (K1490) por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, lavar con PBS 1x 3 veces/5 min, incubar con solución compuesta por DAB diluida 1:10 con buffer hasta que se desarrolle el color, lavar con PBS 1x 3 veces/5min, contrastar con hematoxilina durante 1 minuto, finalmente lavar con PBS 1x (3 veces/ 5 minutos).

7) Deshidratación del tejido

Colocar tejidos en alcohol al 96% 2 veces/5min, lavar con alcohol al 100% una vez por 10 minutos y finalmente con Xilol 2 veces/7 min., cubrir con Entellan y portaobjetos.

(Ventura-Juárez, 2002)

Extracción de RNA

1. Colocar 300 μ l de buffer de lisis en tubo eppendorf con la muestra
2. Homogenizar el tejido con el buffer, agregar 200 μ l más de buffer de lisis y mezclar por inversión
3. Añadir 400 μ l de tampón de disolución de RNA (RDA azul), mezclar por inversión 3-4 veces, incubar a 70°C por 3 minutos
4. Centrifugar 10 minutos a 12000 rpm
5. Transferir el lisado a tubo eppendorf nuevo
6. Agregar 300 μ l de etanol al 95% al lisado aclarado y mezclar 3-4 veces



7. Transferir mezcla a columna y centrifugar a 12000 rpm hasta que toda la dilución pase a la columna
8. Adicionar 600 μ l de RWA-Etanol
9. Centrifugar a 12000 rpm, eliminar eluido
10. Preparar mezcla de incubación DNAsa
11. Aplicar 50 μ l de solución DNAsa a la columna
12. Incubar a temperatura ambiente por 25 minutos
13. Añadir 200 μ l de solución stop DNAsa y centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto
14. Adicionar 600 μ l de solución RWA-Etanol y centrifugar a 12000 rpm 1 minuto
15. Vaciar eluido
16. Añadir 250 μ l de solución RWA-Etanol y centrifugar a 12000 rpm 2 minutos
17. Dejar evaporar etanol (5 minutos aprox.)
18. Pasar la columna a tubo eppendorf de 1.5 ml y añadir 100 μ l de agua libre de nucleasas, centrifugar por 1 minuto a 12000 rpm y almacenar a -70°C

Solucion DNAsa

- Yellow core buffer 40 μ l
- MnCl_2 0.09M 5 μ l
- DNAsa 5 μ l

Retrotranscripción de RNA a cDNA

1. Preparar solución de RNA con primers
 - 1 μ g por reacción de RNA
 - 0.1 μ l primers
 - Agua libre de nucleasas (ajustar a volumen final de 2.5 μ l)
2. Colocar solución en tubos eppendorf, llevar a termociclador a 70°C por 5 minutos, inmediatamente colocar en hielo por 5 minutos.

3. Centrifugar por 10 segundos en microcentrifuga para recuperar todo el condensado y mantener el volumen inicial.
4. Preparar solución de transcripción inversa
 - Agua libre de nucleasas (ajustar a volumen final de 7.5 μ l)
 - GoScript™ 5X Reaction Buffer 2 μ l
 - MgCl₂ 0.75 μ l
 - PCR Nucleotide Mix 0.5 μ l
 - Recombinant RNasin 10u
 - GoScript™ Reverse Transcritase 0.5 μ l
5. Adicionar 7.5 μ l de solución de transcripción inversa a RNA-primers
6. Colocar el tubo en termociclador e incubar a 25° por 5 minutos
7. Incubar en termociclador a 42°C por 2 horas
8. Incubar en termociclador a 70°C por 15 minutos
9. Guardar muestras a -70°C

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

1. Preparar solución para PCR
 - 2 μ l de solución Red Taq
 - 1 μ l de primer forward
 - 1 μ l de primer Reverse
 - 1 μ l de cDNA obtenido
 - 5 μ l de Agua libre de nucleasas
2. Mezclar y centrifugar solución
3. Colocar en termociclador una vez que este ya fue ajustado con los parámetros de desnaturalización, alineación de primers y extensión.
 - Desnaturalización 95°C 35-60 segundos
 - Alineación de primers 55-60 °C dependiendo del oligo de 30-60 segundos
 - Extensión 72 °C por 10 segundos
 - 40 ciclos
4. Guardar muestras a -70°C hasta su uso



Electroforesis en gel de agarosa para PCR

1. Preparar agarosa al 2% con TAE 1x y colocar en cámara de electroforesis.
2. Añadir TAE 1x a cámara de electroforesis hasta que cubra el gel.
3. Colocar muestras en pocillos.
4. Dejar correr muestras por 20 min a 80 Volts.
5. Aumentar voltaje a 120 Volts.
6. Parar cámara de electroforesis hasta que terminen de correr las muestras
9. Analizar gel.

Extracción de Proteínas

1. Tomar 100 mg de tejido congelado a -20°C y colocar en tubo eppendorf de 1.5 ml
2. Añadir a los 100 mg de tejido obtenido 300 μl de buffer de lisis
Buffer de lisis
 - Tris de HCl al 0.01 M
 - NaCl al 0.05 M
 - Iodoacetamida al 0.003
 - Tosil-1-lisina-clorometilcetona al 0.003
 - Metil-metano-sulfonil-fluorido al 0.001 M
 - N-etil malemida al 0.003 M
3. Homogenizar el tejido con el buffer
4. Centrifugar muestras a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C
5. Transferir el lisado a tubo eppendorf nuevo y guardar a -4°C hasta su uso

Cuantificación de proteínas

1. Realizar una curva estandar de proteínas en micro placa de 96 pocillos utilizando albúmina sérica bovina (BSA) con concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e ir

diluyendo según se muestra en el procedimiento colocando cada dilución en los primeros pocillos con 3 repeticiones

Procedimiento:

10 μ l H ₂ O	10 μ l H ₂ O	10 μ l H ₂ O
1 μ l BSA +9 H ₂ O	1 μ l BSA +9 H ₂ O	1 μ l BSA +9 H ₂ O
2 μ l BSA +8 H ₂ O	2 μ l BSA +8 H ₂ O	2 μ l BSA +8 H ₂ O
4 μ l BSA + 6 H ₂ O	4 μ l BSA + 6 H ₂ O	4 μ l BSA + 6 H ₂ O
6 μ l BSA + 4 H ₂ O	6 μ l BSA + 4 H ₂ O	6 μ l BSA + 4 H ₂ O
8 μ l BSA + 2 H ₂ O	8 μ l BSA + 2 H ₂ O	8 μ l BSA + 2 H ₂ O
10 μ l BSA	10 μ l BSA	10 μ l BSA

2. Adicionar 240 μ l de solución de Bradford

Solución de Bradford

- Disolver Azul de Coomassie G 250 100 mg en 50 ml de etanol al 95%.
- Agregar 800 ml de agua destilada y agitar durante 5 minutos.
- Añadir 100 ml de ácido fosfórico al 85% con agitación constante durante 5 minutos.
- Aforar a 1 Lito con agua destilada y filtrar con papel filtro Whatman
- Guardar en frasco ámbar y refrigerar.

3. Leer en espectrofotómetro a 595nm

4. Realizar cálculos.

5. Colocar en una nueva micro placa de 96 pocillos las muestras por triplicado según se presenta en el procedimiento (M=muestra)

Procedimiento:

1 μ l Proteína M1 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M1 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M1 +9 H ₂ O
1 μ l Proteína M2 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M2 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M2 +9 H ₂ O
1 μ l Proteína M3 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M3 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M3 +9 H ₂ O



1 μ l Proteína M4 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M4 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M4 +9 H ₂ O
1 μ l Proteína M5 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M5 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M5 +9 H ₂ O
1 μ l Proteína M6 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M6 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M6 +9 H ₂ O
1 μ l Proteína M7 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M7 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M7 +9 H ₂ O
1 μ l Proteína M8 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M8 +9 H ₂ O	1 μ l Proteína M8 +9 H ₂ O

6. Adicionar 240 μ l de solución de Bradford
7. Leer en espectrofotómetro a 595 nm
8. Realizar cálculos

Electroforesis en gel de poliacrilamida

1. Hacer el gel de poliacrilamida

Gel Separador 12%	Gel concentrador 4%
Agua 1.87 ml	Agua 3 ml
Acrilamida 2.2 ml	Acrilamida 650 μ l
Tris 1.5 M pH =8.8 1.43 ml	Tris 0.5 M pH =6.8 1.25 ml
SDS 10% 55 μ l	SDS 10% 50 μ l
PSA 10% 55 μ l	PSA 10% 40 μ l
TEMED 5 μ l	TEMED 6 μ l

2. Montar gel en cámara de electroforesis y adicionar el buffer de corrida 1x.
3. Cargar gel con 5 μ l del marcador de peso molecular y 50 μ l de la muestra (Muestra con contenido de 50 μ g de proteína + buffer de muestra 4x con β -mercaptoetanol hervidas previamente durante 2 minutos y centrifugación rápida de un spin).
4. Correr el gel 80 mV durante 15 min y enseguida aumentar a 120 mV durante una hora o hasta que terminen de correr las proteínas.

Western blot

1. Colocar el gel en buffer de transferencia.
2. Activar la membrana con metanol durante 3 minutos.

3. Colocar la membrana activada en buffer de transferencia.
4. Montar el sándwich de la siguiente manera.
 - Esponja mojada con el buffer de transferencia
 - Papel filtro mojado con el buffer de transferencia
 - Gel
 - Membrana
 - Papel filtro mojado con el buffer de transferencia
 - Esponja mojada con el buffer de transferencia
5. Colocar el sándwich en cámara de electroforesis.
6. Llenar la cámara con buffer de transferencia.
7. colocar dentro de la cámara un agitador magnético.
8. Transferir durante toda la noche a 12 mAmp.
9. Al día siguiente desmontar el sándwich para revelar la membrana.
10. Bloquear la membrana con leche en polvo al 5% mas TBS tween 1x durante una hora.
11. Transferir la membrana al anticuerpo primario, preparado previamente en solución TBS Tween 1x + leche en polvo 5%.
12. Incubar a 4° C durante 24 horas en agitación.
13. Lavar membrana 2 veces por 10 minutos y 2 veces por 5 minutos respectivamente en TBS Tween 1x.
14. Incubar con el segundo anticuerpo preparado con TBS tween 1x mas leche en polvo 5% durante 2 horas en agitación.
15. Lavar con TBS tween 1x 3 veces por 10 minutos y 2 veces por 5 minutos respectivamente.
16. Revelar con fosfatasa alcalina, tomar una pastilla y diluir en 15 ml.
17. Detener la reacción una vez que se observen bandas.
18. Dejar secar las membranas para su posterior análisis.