



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

TESIS

**“PAPEL DE LA DOXAZOSINA Y EL CARVEDILOL EN LA
REGENERACIÓN CELULAR EN UN MODELO DE REVERSIÓN DE
CIRROSIS HEPÁTICA EN HAMSTER”**

PRESENTA

YESENIA DANYELI NAVARRO GONZÁLEZ

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

TUTOR

DR. MARTÍN HUMBERTO MUÑOZ ORTEGA

COTUTORES

DR. JAVIER VENTURA JUÁREZ.

DR. DANIEL CERVANTES GARCÍA.

AGUASCALIENTES, AGS, NOVIEMBRE DE 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



ANIVERSARIO
UAA

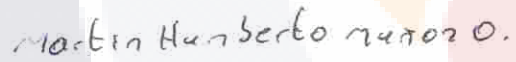
M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

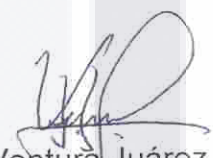
Por medio del presente como Tutores designados de la estudiante **YESENIA DANYELI NAVARRO GONZÁLEZ** con ID **118336** quien realizó la tesis titulada: **PAPEL DE LA DOXAZOSINA Y EL CARVEDILOL EN LA REGENERACIÓN CELULAR EN UN MODELO DE REVERSIÓN DE CIRROSIS HEPÁTICA EN HÁMSTER**, y con fundamento en 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.

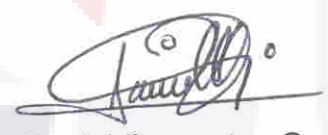
Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 16 de Noviembre de 2016


Dr. Martin Humberto Muñoz Ortega
Tutor de tesis


Dr. Javier Ventura Juárez
Cotutor de tesis


Dr. Daniel Cervantes García
Asesor de tesis

c.c.p.- LAQB YESENIA DANYELI NAVARRO GONZÁLEZ
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

YESENIA DANYELI NAVARRO GONZÁLEZ
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: **“Papel de la Doxazosina y el Carvedilol en la regeneración celular en un modelo de reversión de cirrosis hepática en hámster”**, 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 17 de noviembre de 2016

“Se lumen proferre”

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera primeramente agradecer a mis padres por haberme proporcionado la mejor educación y lecciones de vida. Por corregir mis faltas y celebrar mis triunfos. En especial a mi padre, por haberme enseñado que con esfuerzo y constancia que todo se consigue.

A mi madre, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad. A mi tutores de tesis por que sin su ayuda y conocimientos no hubiese sido posible esta investigación.

A mis hermanos por estar siempre presentes con su apoyo, y sus risas.

DEDICATORIAS

Esta tesis está dedicada a mi familia, por su apoyo constante y amor incondicional durante este posgrado.

A mis padres ROBERTO NAVARRO y ELVIRA GONZÁLEZ quienes me regalaron el privilegio de compartir mi vida en su compañía, me educaron y me enseñaron valores de respeto y perseverancia, gracias a ellos es que estoy aquí, avanzando un escalón más en mi camino y estoy segura que seguirán apoyándome y aconsejándome para que las decisiones que tome sean las mejores para mi persona. Mi padre quien desde pequeña despertó en mí el gusto por el estudio, ayudándome con mis tareas y deberes escolares. Mi madre quien me enseñó valirme por mí misma, a ser una persona independiente y decidida. Ambos con su trabajo diario me guiaron durante todo mi camino por estos 26 años, trabajo que prometo dará los mejores frutos.

A mis hermanos JORGE, ROBERTO, EVELYN Y SAYRA quienes les agradezco no solo que estuvieron presentes, aportando cosas buenas a mi vida, si no por los grades lotes de felicidad y diversión.

Principalmente a mi hermano y amigo JOSE EMMANUEL quien no está presente en cuerpo pero está conmigo siempre en espíritu, aunque el destino te separara de mí lado todos mis triunfos son para ti y tu memoria. Gracias a la vida por regalarme 18 años maravillosos a tu lado, tiempo suficiente para conocer y aprender de tu persona, llevo en mi memoria repleta de recuerdos hermosos; recuerdos que me mantiene de pie. Gracias infinitas donde quiera que te encuentres.

También quiero agradecer a personas que aunque no nos une un lazo sanguíneos, nos une la amistad y el cariño, principalmente a ti mi compañero por tantos años LUIS te agradezco el apoyo que me brindaste durante el transcurso de este posgrado, con tus consejos, tus aportaciones y tu cariño incondicional.

A mi hermana y mejor amiga NALLELY, una de las personas más importantes en mi vida, es un privilegio para mí contar con una persona como tú en las buenas y en las malas, empujándome a mejorar. Gracias por compartir conmigo tu amistad.

| INDICE GENERAL | Páginas |
|--|----------------|
| ACRONIMOS | 11 - 14 |
| RESUMEN | 15 - 16 |
| ABSTRACT | 17 - 18 |
| CAPITULO I | 19 |
| INTRODUCCIÓN | |
| MARCO TEÓRICO | 20-49 |
| El hígado | 20-22 |
| Mecanismos inmunológicos de la cirrosis | 22-26 |
| Células fibrogénicas del hígado | 26-28 |
| Cirrosis y Fibrosis | 28-31 |
| Biomarcadores de fibrosis hepática y de regeneración. | 32-35 |
| HGF | 32-34 |
| α FP | 34 |
| c-myc | 35 |
| Eventos Moleculares de la Fibrosis y Cirrosis hepática | 35-37 |
| Interleucinas | 36-37 |
| Regeneración hepática; proliferación celular | 38-42 |
| Células ovasles | 41-42 |
| Expresión del anticuerpo CD90 | 42-43 |
| Expresión del anticuerpo Ki67 | 43-44 |

| | |
|---|-------|
| Tetracloruro de carbono | 44-45 |
| Formación de especies reactivas de oxígeno | 45-43 |
| Mecanismos de muerte celular mediada por ROS | 46-47 |
| Peroxidación lipídica | 46 |
| Apoptosis | 46 |
| Necrosis | 47 |
| Papel del citocromo P450 | 47-48 |
| Carvedilol y Doxazosina; Farmacología y mecanismo de acción. | 49-50 |
| ANTECEDENTES | 51-55 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 56 |
| HIPOTESIS | 57 |
| JUSTIFICACIÓN | 58 |
| CAPITULO II | 59 |
| OBJETIVOS | |
| General | 60 |
| Específicos | 60 |
| CAPITULO III | 61 |
| METODOLOGÍA | |
| ESTRATEGIA GENERAL | 62 |
| MATERIALES | 63-64 |
| MÉTODOS | 65 |

| | | |
|-------------|--|-------|
| | Inducción de cirrosis hepática, modelo CCl4 | 65 |
| | Modelo experimental del tratamiento con alfa/beta adrenobloqueadores. | 65-66 |
| | Procesamiento de muestras | 66- |
| | Extracción de muestras biológicas | 66 |
| | Procesos Histológicos | 67-68 |
| | Pruebas de Función hepática | 68 |
| | Extracción de RNA | 68 |
| | Retrotranscripción | 69 |
| | PCR | 69-70 |
| | Análisis estadístico | 70 |
| CAPITULO IV | | 71 |
| RESULTADOS | | 72-95 |
| | Inducción de cirrosis hepática | 72-73 |
| | Análisis Macroscópico de hígados con cirrosis y tratados. | 73-74 |
| | Pruebas de función hepática posterior a la inducción de CCl4 y restitución de la función posteriorial tratamiento. | 75-80 |
| | Evaluación histológica de los tejidos problema | 81-91 |
| | Tinción de Hematoxilina eosina (H&E) | 81-85 |
| | Tinción de PAS | 86-88 |

| | | |
|--------------|--|---------|
| | Tinción rojo sirio | 89-91 |
| | Determinación de la actividad proliferativa de células del parénquima hepático. Células madre CD90 (+) y Hepatocitos Ki67 (+). | 92 |
| | Inmunohistoquímica para identificar células CD90 (+) | 92-94 |
| | Inmunohistoquímica para identificar células Ki67 (+) | 95-97 |
| | Cuantificación de células positivas de las proteínas CD90 Y Ki67. | 97-98 |
| | Índice de actividad histológica. | 98-99 |
| | Expresión de marcadores en regeneración hepática | 99-102 |
| CAPITULO V | | 103 |
| DISCUSIONES | | 104-111 |
| CONCLUSIONES | | 112 |
| BIBLIOGRAFÍA | | 113-129 |
| ANEXOS | | |

INDICE DE TABLAS

Paginas

Tabla 1

Principales interleucinas involucradas en el proceso de fibrosis, y sus funciones en la patología

37

Tabla 2

Anticuerpos usados para la detección de antígenos por inmunohistoquímica

67-68

Tabla 3

Genes empleados en el análisis PCR.

69-70

Tabla 4

Características macroscópicas observadas durante el proceso de inducción

98

INDICE DE FIGURAS E IMÁGENES

Páginas

Figura 1.

21

Esquema general del hígado. La tríada portal consiste en la vena portal, arteria hepática, y conductos biliares.

Figura 2

22

Organización del lóbulo y el acino hepático. Sobre la base de la composición sanguínea local, los acinos según Rappaport son divididos en 3 zonas.

Figura 3

23

Las células que comprenden el hígado incluyendo hepatocitos (HEP).

Figura 4.

27-28

Mecanismos de daño a hepatocitos.

Figura 5

30

Vasodilatación arterial en la circulación esplácnica y sistémica en la hipertensión portal.

Figura 6

31

Hallazgos histopatológicos, inducción de cirrosis con CCl₄ a las 4 semanas de tratamiento

Figura 7

33

El equilibrio recíproco entre HGF y TGF

Figura. 8. 40

Las posibles fuentes de células en el hígado.

Figura 9 41-42

Células Progenitoras en hígado adulto visto en condiciones normales y condiciones de daño.

Figura 10 45

Metabolismo y absorción del tetracloruro de Carbono en el organismo.

Figura 11 48

Mecanismo de acción del citocromo P450.

Figura 12 49

Estructura molecular los fármacos alfa y beta bloqueadores.

Figura 13 62

Diagrama de actividades, pre y post inducción de cirrosis hepática en hámster.

Figura 14 62

Diagrama de actividades post sacrificio de todos los grupos a prueba.

Figura 15 66

Análisis de muestras de hígado post sacrificio muestras basal, cirrótico, cirrótico más vehículo, Carvedilol, Doxazosina y

Doxa+Carve.

Figura 16 72

Cambios físicos observados en hámsteres en el transcurso de la inducción

Figura 17 73

Gráfica de pesos registrados en el proceso de inducción.

Figura 18 74

Aspecto macroscópico del hígado de los hámsteres después de la inducción de etapa avanzada de cirrosis y la aplicación de los tratamientos.

Figura 19 75

Transaminasas en suero posterior a la inducción de una etapa avanzada de cirrosis hepática grupos basal y cirrótico.

Figura 20 76

Proteína en suero posterior a la inducción de una etapa avanzada de cirrosis grupos basal y cirrótico.

Figura 21 77

Transaminasas en suero posterior a la inducción de una etapa avanzada de cirrosis en los grupos cirrótico, cirrótico + vehículo (vc) y basal.

Figura 22 77-78

Proteínas en suero post inducción de cirrosis en los grupos cirrótico, cirrótico + vehículo (vc) y basal.

Figura 23 79

Proteínas en suero post inducción de cirrosis en los grupos cirrótico, cirrótico + vc y basal.

Figura 24 79

Proteínas en suero post inducción de cirrosis en los grupos cirrótico, cirrótico + vc y basal.

Figura 25 81-82

Cortes histológicos de hígados tratados sin inducción de cirrosis hepática con CCl4 teñidos con hematoxilina-eosina.

Figura 26 83-85

Cortes histológicos de los hígados teñidos con hematoxilina-Eosina.

Figura 27 87-88

Cortes histológicos de los hígados con la tinción de PAS.

Figura 28 90-91

Evaluación del depósito de colágena (tinción rojo sirio) vista en microscopio de luz polarizada.

Figura 29 93-94

Inmunohistoquímica con CD 90.

Figura 30 95-97

Inmunohistoquímica de células reactivas a KI67.

Figura 31 97-98

Análisis cuantitativo de células positivas a las proteínas CD90 y

Ki67.

Figura 32

100-101

Evaluación semicuantitativa por PCR de la expresión de marcadores importantes de la regeneración de un hígado cirrótico.



ACRONIMOS

| <i>a</i> | Alfa |
|-----------------|-----------------------------|
| ADH | Hormona antidiurética |
| AFP | Alfafetoproteína |
| ALT | Alanino aminotransferasa |
| AST | Aspartato aminotransferasa |
| c-myc | Oncogen de Mielocitomatosis |
| CCI2 | Diclorometilo |
| CCI3 | Triclorometilo |
| CCI300 | Peróxido de triclorometilo |
| CCI4 | Tetracloruro de carbono |
| CD 90 | Racimo de diferenciacion 90 |
| CKT-18 | Citoqueratina 18 |
| CKT-7 | Citoqueratina 7 |
| COOH | Grupo carboxilo |
| CXC | Quimiocinas |
| CYP450 | Isoforma del citocromo P450 |
| DAB | Diaminobenzidina |
| DNA | Acido desoxirribonucleico |

| | |
|-------------|---|
| FAD | Flavín adenín dinucleótido |
| FGH | Factor de crecimiento hepático |
| FMN | Flavin mononucleótido |
| G0 | Fase del ciclo celular donde la célula se encuentra en estado quiescente |
| G1 | Primera fase del ciclo celular, donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas, preparación para la síntesis de ADN |
| GPP | Gradiente de presión en la vena porta |
| GST | Glutación S transferasa |
| H2O | Agua |
| HDL | Lípido de alta densidad |
| HE | Hematoxilina eosina |
| HGF | Factor de crecimiento de hepatocitos |
| HSC | Célula estelar hepática |
| HSCa | Célula estelar hepática activada |
| IgG | Inmunoglobulina G |

| | |
|-------------------|---|
| IL-6 | Interleucina 6 |
| Ki67 | Marcador de proliferación celular |
| LDL | Lípido de baja densidad |
| MCP-1 | Proteína quimiotáctica de monocitos |
| MEC | Matriz extracelular |
| MMP | Metaloproteinasas de la matriz |
| MSC | Marcadores de la matriz extracelular |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| NF-kappa B | Factor nuclear kappa de células B |
| NH2 | Grupo amina |
| nm | Nanómetro |
| OH | Alcohol |
| PAS | Acido periódico de Schiff |
| PBS | Buffer fosfato salino |
| PCR | Reacción de cadena de la polimerasa |

| | |
|---------------------------------|--|
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PH | Hepatectomía parcial vascular |
| RAAS | Sistema renina angiotensina aldosterona |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno. |
| S | Fase del ciclo celular donde se da la replicación de ADN |
| SH2 | Enlace disulfuro |
| SNS | Sistema nervioso simpático |
| TAA | Tioacetamida |
| TGF- β1 | Factor de crecimiento transformante beta |
| TIMP-1 | Inhibidor tisular de la metaloproteinasa |
| VC | Vena central |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |
| α-SMA | Alfa actina de músculo liso |
| β | Beta |

RESUMEN

La cirrosis hepática es el resultado final del daño crónico al hígado a causa del abuso en el proceso de detoxificación que se lleva a cabo naturalmente en este órgano provocando su deterioro y desencadenando una serie de fenómenos orquestados principalmente por la sobre síntesis de matriz extracelular y sintomatologías como ascitis, varices esofágicas, fibrosis porto portal (cirrosis) y con mayor incidencia hipertensión portal. En condiciones normales este órgano llega a contrarrestar el daño, disminuyendo las fibras de colágena con ayuda de metaloproteasas (MMPs), en un hígado cirrótico las células madre (células ovals) juegan un papel importante en la regeneración del órgano, estas células son activadas por factores como el FGH principalmente y proliferan llenando espacios vacíos formando nódulos de regeneración. Se ha demostrado que el nervio vago tiene una participación en la activación en estas células progenitoras, las cuales también pueden ser activadas cuando el hígado se somete a una hepatectomía parcial regenerándose un 70% de su estructura.

Actualmente la cirrosis es catalogada como la quinta causa de muerte en México, su tratamiento actual consta únicamente de la eliminación del agente causal y el trasplante hepático. En el presente trabajo se evaluó el uso de fármacos α y β bloqueadores con el propósito de analizar su participación en el proceso de regeneración del tejido hepático, la inhibición de las células estelares hepáticas y disminución de los efectos antihipertensivos juegan un papel favorable en la repoblación celular ya que dan tiempo a que células de regeneración (células ovals) y células en estado quiescente formen nódulos regenerativos en el parénquima hepático.

El trabajo constó del análisis de 70 hámsteres (*Mesocricetus auratus*) macho en una etapa avanzada de cirrosis hepática previamente establecida con inyecciones intraperitoneales de CCl₄ usando petrolato como vehículo. Se

analizaron parámetros importantes en la funcionalidad hepática como: 1) funcionalidad hepática mediante las transaminasas, albúmina, y algunos factores de coagulación, 2) análisis histológico con tinciones especiales para fibras de colágeno (tinción rojo-sirio), síntesis de glucógeno (tinción de PAS), estructura del parénquima hepático (tinción HE), 3) inmunohistoquímica de marcadores específicos de regeneración (CD 90, Ki67), 4) análisis molecular con la determinación de marcadores (AFP, C-myc, CKT-7, CKT-18, FGH) de las muestras de hígado extraídas.

El análisis bioquímico demuestra una mejora en la funcionalidad de los hígados tratados con Carvedilol y Doxasocina esto con la disminución en la concentración de las transaminasas en suero, por otro lado en el análisis morfológico de las tinciones los hígados en tratamiento recuperan la estructura típica de un hígado sano y en mayor grado los hígados con ambos tratamientos, esto al igual que en el análisis molecular con los marcadores de regeneración donde los dos tratamientos presentan un aumento en la expresión de estos marcadores, y la disminución de oncogenes descartando la proliferación descontrolada a cargo de las células ovas también vistas en la inmunohistoquímica rodeando la zona porta. En base a lo anterior el tratamiento Carvedilol en comparación con la Doxazosina, y aun mejor la aplicación de estos dos tratamientos juntos arrojan una mejora progresiva y acentuada, observándose una mejora equiparable con el grupo control tanto histológica, bioquímica y molecularmente, incluso superando la aplicación del tratamiento aislado lo que nos lleva al uso terapéutico de estos fármacos como una posible medida alternativa para el tratamiento en pacientes con cirrosis.

ABSTRACT


Cirrhosis of the liver is the result of the chronic damage to the liver caused by the abuse in the process of detoxification that takes place naturally in this organ. Provoking its deterioration and triggering a series of phenomena. Principally due to the over synthesis of the extracellular matrix. And symptomatology's such ascites, esophageal varices, portal fibrosis "cirrhosis" and with higher incidence of portal hypertension. In normal conditions this organ can counter the damage by decreasing the collagen fibers with the help of metalloproteinases. (MMPs), In a cirrhotic liver stem cells play an important role in regenerating the organ. These cells are activated by factors such as the FGH principally, proliferate by filling empty spaces forming regenerating nodules. It has been shown that the Vagus nerve has a participation in the activation in the progenitor cells. That which can also be activated when the liver undergoes partial hepatectomy and regenerates 70% of its structure.

Currently the cirrhosis is classified as the fifth leading death in Mexico. Its current treatment consists only of elimination of the causative agent and liver transplant. In the present study, we evaluated the use of A- and B- blockers to analyze their participation in the regeneration process of the hepatic tissue, inhibition of the hepatic stellar cells and decrease of the antihypertensive effects play a favorable role in repopulation because they give time for the regenerative cells (oval cells) and cells in the quiescent state to form regenerative nodules in the liver parenchyma.

The study consisted of the analysis of 70 hamsters (*Mesocricetus Auratus*) male at an advanced stage of liver cirrhosis previously established with intraperitoneal injections of CCl₄ using petrolatum as a form of vehicle. Important parameters in the liver function were analyzed: 1) hepatic function

through transaminases, albumin, and coagulation factors; 2) histological analysis with special stains for collagen fibers (red-Syrian staining), glycogen synthesis PAS), hepatic parenchyma structure (HE staining), 3) Immunohistochemistry of specific regeneration markers (CD 90, Ki67,), 4) molecular analysis with the determination of markers (AFP, C-myc, CKT-7, CKT-18, FGH) from liver samples extracted.

The biochemical analysis demonstrates an improvement in the functionality of livers treated with Carvedilol and Doxazocin this with the decrease in serum transaminases concentration, on the other hand in the morphological analysis of the stains the livers in treatment recover the typical structure of a healthy liver to a greater degree. livers with both treatments, as well as in the molecular analysis with the regeneration markers where the two treatments present an increase in the expression of these markers, and the decrease of oncogenes discarding the uncontrolled proliferation in charge of the oval cells also seen in the immunohistochemistry surrounding the portal zone. Based on the above, the treatment Carvedilol in comparison with Doxazocin, and even better the application of these two treatments together show a progressive and accentuated improvement. Observing a comparable improvement with the control group both histologically, biochemically, and molecularly. Even surpassing the application of the isolated treatment which leads us to the therapeutic use of these drugs as a possible alternative measure for treatment in patients with cirrhosis.



CAPITULO I

-INTRODUCCIÓN-

I.I MARCO TEÓRICO

- EL HÍGADO

El hígado es la glándula más grande del cuerpo humano, y es el encargado de realizar un gran número de actividades fisiológicas y metabólicas vitales para el organismo (Yang, Zhu, Weiming, Shi, He, & Xu, 2016).

Recibe alrededor del 20% de su suministro de sangre de la arteria hepática y el 80 % de la vena porta, es considerado la primera línea de defensa del organismo debido a su localización anatómica, importante para la inmunidad del huésped. Para llevar a cabo sus funciones inmunológicas, el hígado se enriquece en varios subconjuntos tales como macrófagos, células dendríticas, células linfoides, etc. (Li & Hua, 2016). La sangre de la vena portal drena el tracto gastrointestinal y al tejido linfoide asociado a intestino (GALT) lleva cantidades significativas de varias sustancias principalmente toxinas, antígenos externos, mediadores inflamatorios, citocinas y factores de crecimiento (Porowski, Wirkowska, Hryniewiecka, Wyzgal, Pacholczyk, & Paczek, 2015).

Los principales tipos celulares que constituyen sinusoide hepático son principalmente los hepatocitos, las células NK, las células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales, y las células estelares hepáticas. Por un lado los hepatocitos son las células más importantes del hígado, además de comprender cerca del 80% del parénquima hepático, llevan a cabo las funciones clásicas del órgano, tales como la síntesis de proteína, síntesis y metabolismo de glucógeno, síntesis de algunos factores de coagulación, etc., (Schumacher & Guo, 2016).

Por otro lado, las células de Kupffer son principalmente responsables de la eliminación de patógenos y moléculas insolubles, además de las células

endoteliales sinusoidales que contribuyen a eliminar las moléculas solubles de la circulación (T, X, Ping, XU, & WANG, 2008).

Otro tipo celular son las estelares hepáticas, están localizadas en el espacio de Disse (figura 1), donde llevan a cabo su función en estado de senescencia, el acumulo de retinoles en su citoplasma, durante la lesión hepática, HSCs migran a la ubicación del daño, cambian a un fenotipo activado, y producen matriz extracelular (Schumacher & Guo, 2016).

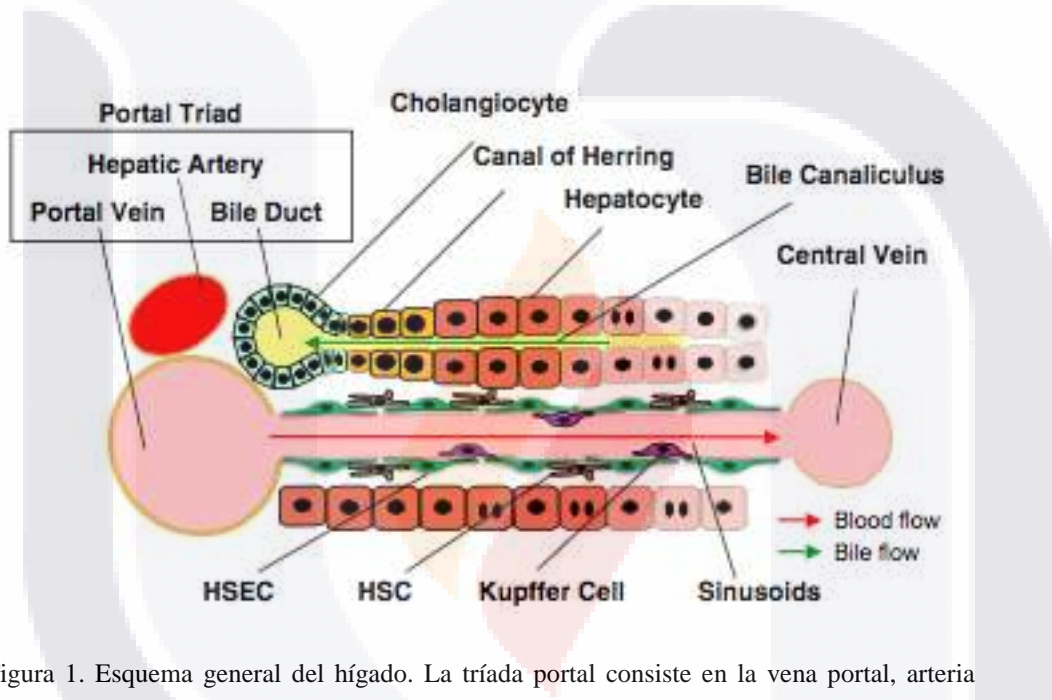


Figura 1. Esquema general del hígado. La triada portal consiste en la vena portal, arteria hepática, y conductos biliares. La sangre fluye de la vena porta y la arteria hepática hacia la vena central entre los hepatocitos a través de los sinusoides rodeados por las células hepáticas sinusoidales endoteliales (HSEC). La bilis producida por los hepatocitos se recoge en los conductos biliares a través de los canalículos biliares. Las células de Kupffer, (macrófagos residentes del hígado), se encuentran en el lado luminal del sinusoides, mientras que las células estrelladas hepáticas (HSC) están localizadas en el "espacio de Disse" un lugar situado entre los hepatocitos y una sinusoides. El canal de Hering es la región de la unión entre los hepatocitos y conductos biliares (Miyajima, Tanaka, & Itoh, 2014) (Bile canaliculus; canal biliar, central vein; vena central, hepatocyte; hepatocito, canal of herring; canal de herri, Cholangiocyte; colangiocito, Duct bile; conducto biliar, Hepatic Artery; arteria hepática, Portal vein; vena portal, HSEC; células hepáticas sinusoidales endoteliales,

HSC; células estelares hepáticas, Sinusoids; sinusoides, Blood flow; flujo sanguíneo, Bile Flow; flujo biliar).

Acino de Rappaport

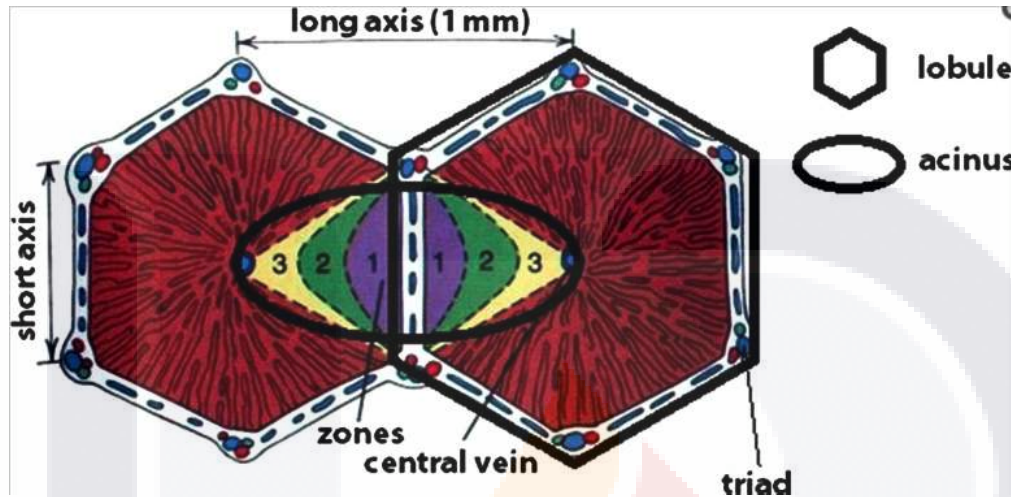


Figura 2. Organización del lóbulo y el acino hepático. Sobre la base de la composición sanguínea local, los acinos según Rappaport son divididos en 3 zonas: zona 1 o zona periportal, zona 2 o zona mediozonal y zona 3 o zona centrilobulllar. La zona periportal está cerca de la vasculatura de la tríada portal y suministrado por la sangre altamente oxigenada. La zona perivenosa es proximal a la vena central y recibe mal la sangre oxigenada. La toxicidad se hace visible en primero en la región periportal, ya que esta es la primera zona de para filtrar la sangre (Godoy, et al., 2013) (Lobule; lóbulo, Acinus; acino, long axis; eje largo, Short axis; eje corto, central vein; vena cetral, zones; zonas, triad; triada).

- MECANISMOS INMUNOLOGICOS DE LA CIRROSIS

Las células inmunes pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la fibrosis hepática. Las células T CD8 promueven la fibrosis hepática.

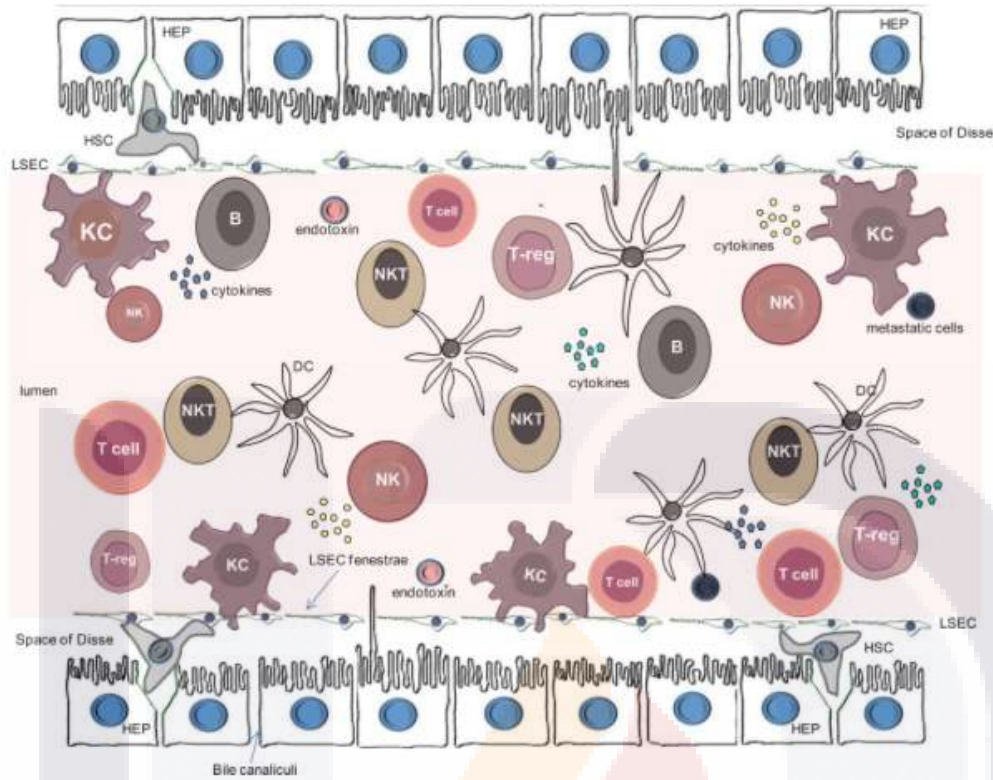


Figura 3. Las células que comprenden el hígado incluyendo hepatocitos (HEP), células hepáticas endotelial sinusoidal (CESH), células de Kupffer (KC), células hepáticas estrelladas (HSC) y las células NK, natural killer; NKT asesinas naturales, células T; DC, células dendríticas; Treg, células T reguladoras (Bogdanos, Bin, & Gershwin, 2013) (space of Disse; espacio de disse, Cytokines; citosinas, DC; celula dendrítica, NK; asecinas naturales, endotelin; endotelina, bile canalicul; canalículo biliar, T Cell; células T, T-reg; células T reguladoras, endotoxin; endotoxinas, metastasic cells; células metastasicas, lumen; luz)

Las principales células encargadas de la inmunidad en el hígado son las células NK (figura 2). Estas células son abundantes en los linfocitos hepáticos (10-15%) y desempeñan un papel importante en la primera línea de defensa innata contra la infección viral y la transformación tumoral (Bogdanos, Bin, & Gershwin, 2013)

Se ha demostrado que estas células desempeñan un papel importante en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa a través de la producción de una variedad de citocinas, IFN- γ e IL-4 principalmente, cuya funciones se cree es mediada a través de la producción de estas citocinas o muerte directa de las células diana. La citotoxicidad de las células NK contra células diana se determina por un desequilibrio entre los efectos de receptores inhibidores y estimuladores expresados en las células NK con sus correspondientes ligandos expresados sobre las células diana (Hashimoto, et al., 2011)

En comparación con las células NK periféricas, las células NK hígado presentan mayor citotoxicidad contra las células tumorales, ya que poseen un mayor número de vesículas y gránulos rojos con núcleo, y expresan niveles más altos de TRAIL, perforina, granzima B, y otros (Esparza, Manzano, Alcaraz, & Peñarrubia, 2015).

Además, estas células pueden rápidamente producir grandes cantidades de citocinas de esta manera, ayudar a eliminar los patógenos invasores, toxinas y antígenos de los alimentos de la sangre venosa portal a través de la modulación de la respuesta inmune adaptativa. Por lo tanto, las células NK / NKT junto con las células de Kupffer y células endoteliales sinusoidales en sinusoide hepático forman un sistema fuerte, esta defensa que juega un papel clave en la eliminación de patógenos, moléculas de residuos, toxinas, y las células tumorales circulantes de la circulación (Patel, Schutzer, & Pysopoulos, 2016).

A partir de estudios en la última década, la apoptosis de hepatocitos parece ser la primera respuesta celular al daño tóxico y se cree que es el principal modo de muerte celular en las enfermedades del hígado. La apoptosis se ejecuta a través de la activación de cascadas a través de las vías de apoptosis. Las vías comienzan con la activación de una caspasa iniciadora por diferentes estímulos, caspasa-8 en la membrana mediada por la caspasa-9 en

las vías mitocondriales, y la caspasa-12 en el retículo endoplásmico; las caspasas iniciadoras activan entonces activos efector caspasa-3, -6 o -7 que escinden sustratos clave necesarios para las funciones celulares normales que conducen a la apoptosis (J, et al., 2015).

Por otro lado las células de Kupffer, macrófagos específicos del hígado cuya función principal la eliminación de partículas pequeñas y moléculas mediante vesículas pinocitarias mediante la unión a complejos inmunitarios de IgG e IgA, estas células tienen muchas otras funciones que son esenciales para la conservación de la homeostasis hepática en diversas circunstancias (Cubero & N., 2006). Estas células inmunológicas generalmente no inducen la lesión hepática, ya que durante afecciones patológicas como la ictericia obstructiva, cirrosis en general la capacidad de estas células para captar complejos inmunitarios se ve disminuida, solo pueden acumularse en grados significativos antes del inicio de la lesión, sin embargo, la extravasación de estos coincide con el aumento de los parámetros de la lesión hepática, por otra parte, los neutrófilos han sido implicados en el proceso de lesión de un número de un diferentes patologías hepáticas incluyendo colestasis obstructiva (Yang, et al., 2014) y cirrosis alcohólica donde estas células interactúan con un complejo de proteínas situado en la vía de señalización de las membranas extracelulares de esta manera induce factores solubles, como citosinas, quimiocinas, factores de crecimiento, metabolitos de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa y especies reactivas del o

xido, el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico (Cubero & N., 2006).

Una vez reclutados a los sinusoides hepáticos (figura 2), los neutrófilos son extravasados al parénquima hepático para una muerte celular mediada por los mismos neutrófilos, que normalmente está mediada por las interacciones entre las moléculas de adhesión, tales como molécula de adhesión

intercelular-1 (ICAM-1) presente en los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales, y integrinas $\beta 2$ presentes en neutrófilos (Woolbrinht & Jaeschke, 2015) (Schroder & Tschopp, 2010). Durante el inicio del daño al hígado los neutrófilos extravasados pueden iniciar la lesión hepática mediante la liberación de ROS generados por la NADPH oxidasa, así como la degranulación y liberación de enzimas citotóxicos (Jaeschke, 2011).

- CÉLULAS FIBROGÉNICAS DEL HÍGADO

Como fue mencionado con anterioridad la síntesis de MEC es uno de los eventos principales durante de fibrosis y cirrosis hepática, ya que desencadena complicaciones como la disfunción de hígado y la hipertensión portal; las HSC juegan un papel primordial en la fibrosis hepática conformando su función con su activación a miofibroblastos (Terai & Tsuchiya, 2016), provocado a consecuencia de una variedad de estímulos, tales como la inflamación y el daño hepatocelular (Timothy & A Mann, 2016).

En un hígado normal la HSC está en reposo y no prolifera, es residente del espacio de Disse (figura 1), su principal función es el almacenaje de vitamina A y otro retinoides. Tras la lesión hepática viene su activación transformándose a un fenotipo similar a miofibroblasto, expresan alfa actina de musculo liso y matriz extracelular, además de expresar adrenoreceptores $\alpha 1A$, $\beta 1$, $\beta 2$ and, $\beta 3$ (Paik, 2016) y colágena del tipo 1. En su estado activado, también están encargadas de la secreción de metaloproteinasas, cambiando el equilibrio de la MEC contribuyendo a la fibrosis (Wang C. , et al., 2016).

La activación de estas HSC viene derivado una amplia variedad de citocinas, factores de crecimiento, y las especies reactivas del oxígeno. Entre ellos el

TGF- β y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas son las dos citocinas más importantes que estimulan la transformación de las HSC y la proliferación, respectivamente, además, IFN- γ es una de las citocinas más importantes para bloquear la activación de las células HSC (Attallah, et al., 2016); por otro lado, otros factores activadores de las HSC son el factor de crecimiento transformante beta, el factor de crecimiento epidérmico y la interacción con los hepatocitos, macrófagos, células linfoides innatas, células B, células T, NK y células endoteliales (Paik, 2016). Ya activadas estas células aumentan el depósito de matriz extracelular como la elastina y el colágeno fibrilar I, II, y V, no fibrilar de colágeno IV y VI (Muñoz Ortega, et al., 2016), siendo el colágeno del tipo I y tipo III los más comunes en hígados sanos, encontrándose exclusivamente en los espacios porta y vena central y el colágeno del tipo IV los espacios de Disse en escasas proporciones (Benitez, 2003).

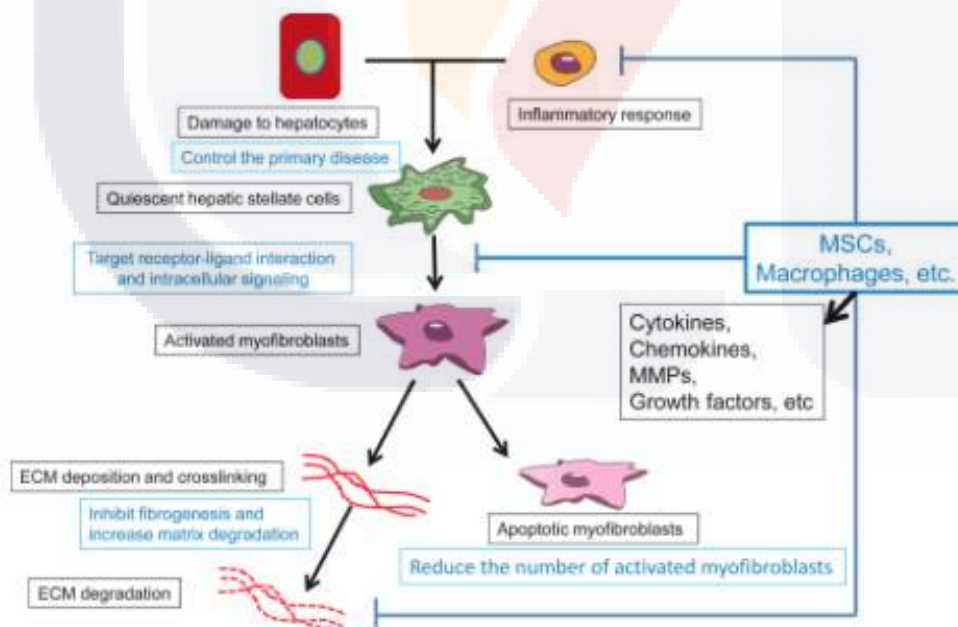


Figura 4. Mecanismos de daño a hepatocitos. MMPs: metaloproteinasas; MSC: Células madre mesenquimales; ECM: Matriz extracelular; damage to hepatocytes: daño a hepatocitos; control the primary disease: control primario del daño; Macrophages: macrófagos; Cytokines: citosinas; Chemokines: quimiocinas; Growth factor: factor de crecimiento; ECM degradation: degradación de la matriz extracelular; Activated myofibroblasts: activación de miofibroblastos) (Xinguang, Huixing, Linlin, Wanxin, Xiaojun, & Linghua, 2016).

Estudios recientes han demostrado que la activación in vivo de células madre hematopoyéticas por agentes fibrogénicos eventualmente puede conducir a la senescencia de estas células, lo que contribuiría a la reversión de la fibrosis aunque también puede favorecer el inicio del cáncer de hígado (Panebianco, Oben A., Vinciguerra, & Paziienza, 2016).

Posterior a la regresión de la fibrosis, ocurre la programación de la muerte de las HSC activadas, sin embargo, modelos en ratón con inducción de cirrosis ya sea con alcohol o CCl₄ muestran que en la fase de recuperación, un cierto número de HSC adquirieron un fenotipo inactivo similar al fenotipo que distingue a estas células en estado quiescente (Zhou, Zhang, & Qiao, 2014).

○ CIRROSIS Y FIBROSIS

Una lesión hepática crónica puede ser causada principalmente por la infección del virus de la hepatitis, la ingesta excesiva de alcohol, esteatohepatitis no alcohólica, hepatitis autoinmune y colangitis biliar primaria (Xiao-Ya, et al., 2016), los cuales entre otros factores desencadenan la reducción en la funcionalidad del hígado, hipertensión portal y un aumento en el riesgo de carcinoma hepatocelular (Terai & Tsuchiya, 2016). La primera consecuencia del daño es la inflamación, la reacción inflamatoria es el proceso coordinado por el cual el hígado responde a los insultos locales, tratando de restaurar la estructura original y la función hepática, sin embargo, si el daño local es persistente y / o intenso, la respuesta inflamatoria

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mantenida da lugar a una sustitución gradual de tejido hepático normal a un estado fibrótico (Esparza, Manzano, Alcaraz, & Peñarrubia, 2015).

Por lo tanto la fibrosis es definida por la acumulación excesiva de MEC, que provoca la formación de tabiques fibrosos que rodean a grupos de hepatocitos, eventualmente la degeneración de los cordones de hepatocitos hacia nódulos, es una definición de la progresión de un paciente a cirrosis (Timothy & A Mann, 2016).

La cirrosis se define como una etapa avanzada de la fibrosis y se caracteriza por la formación de nódulos de regeneración de parénquima hepático que están separadas y encapsulados por/en tabiques fibróticos y asociados con los cambios angioarquitectural. La historia natural de la cirrosis hepática se caracteriza por una larga etapa asintomática (cirrosis compensada) con una baja mortalidad, seguida de una fase descompensada sintomática la cual se caracteriza por las consecuencias clínicas de la insuficiencia hepática y la hipertensión portal y por la alta mortalidad (Prystupa, Kicinski, Sak, Boguszezwska, & Jurkowska, 2015); se encuentra entre la causa más común de muerte en todo el mundo, pacientes con cirrosis corren el mayor riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (CHC), el sexto cáncer más frecuente y la principal causa de muerte relacionada (Xinguang, Huixing, Linlin, Wanxin, Xiaojun, & Linghua, 2016).

Es bien sabido que la hipertensión portal (figura 4), una de las principales complicaciones, se caracterizan por provocar alteraciones estructurales y funcionales en el hígado en pacientes con enfermedades crónicas de este órgano (Giunta, Coonde, & Fraquelli, 2016).

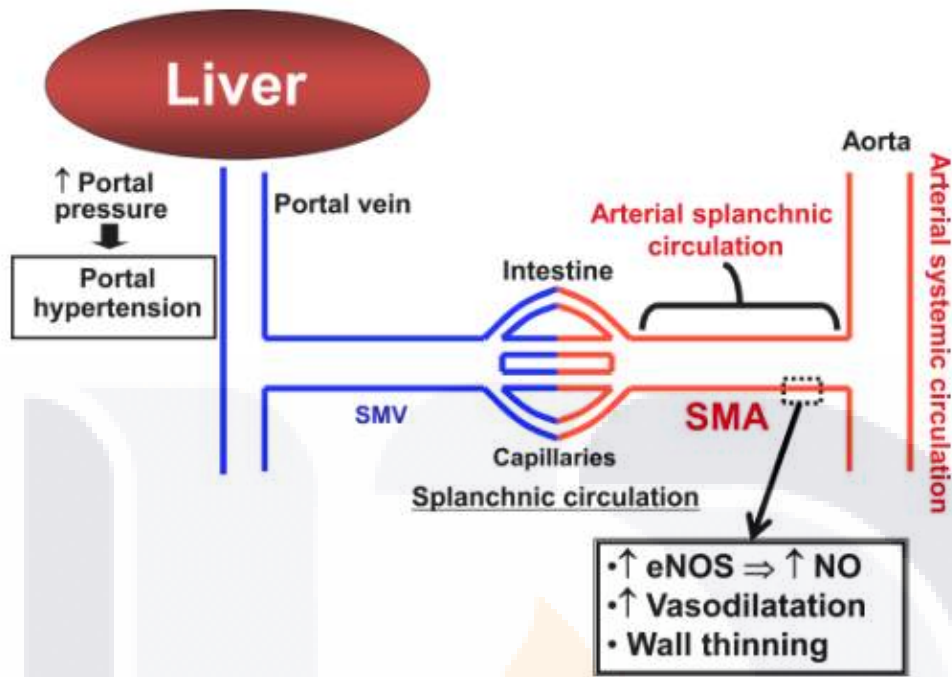


Figura 5. Vasodilatación arterial en la circulación esplácnica y sistémica en la hipertensión portal. En respuesta al aumento de la presión portal, niveles elevados de vasodilatadores, tales como el óxido nítrico (NO), causan vasodilatación posterior. La sobre producción de NO puede producir adelgazamiento de la pared arterial, lo cual también puede contribuir a la vasodilatación sostenida. SMA: la arteria mesentérica superior, SMV: la vena mesentérica superior, la eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial (Liver: hígado; portal pressure: presión portal; hypertension portal: hipertencion portal; portal vein: vena porta; intestine: intestino; capillaries: capilares; splanchnic circulation: circulación esplénica; arterial splanchnic circulation: circulación arterial esplénica; NO: óxido nítrico; Vasodilatation: vasodilatación; Wall thinning: adelgazamiento de la pared) (Iwakiri, 2012).

El depósito progresivo de la fibrosis hepática tiene un papel clave en el pronóstico de los pacientes con enfermedades crónicas del hígado, el desarrollo posterior de la hipertensión portal lleva a complicaciones como ascitis, encefalopatía hepática, hemorragia varicosa y además la descompensación (Giunta, Coonde, & Fraquelli, 2016).

La esteatosis (figura 5) es considerada una condición multifactorial ya que abarca un amplio rango de daño en el hígado, que va desde una esteatosis sencilla hasta una esteatohepatitis no alcohólica, esta última con una incidencia de mortalidad más alta ya que llega a provocar cirrosis en comparación de la esteatosis sencilla la cual se considera una condición relativamente benigna (Auguet, et al., 2016).

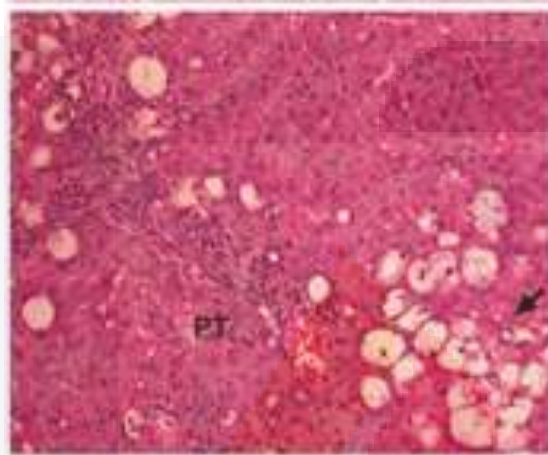


Figura 6. Hallazgos histopatológicos, inducción de cirrosis con CCl₄ a las 4 semanas de tratamiento. Se observan cambios microcirculatorios, grasos e hidrópicos, Hepatología crónica con severa degeneración de grasas. 400X (Chobert, et al., 2012).

Por otro lado datos en la literatura de han vinculado de manera inequívoca la angiogénesis con la fibrosis hepática y la progresión de la enfermedad hepática crónica, lo que sugiere que la angiogénesis puede favorecer la fibrogénesis (Ding, Tian, Li, Wang, & Zhan, 2015). En cuanto a tratamientos hasta el momento la biopsia hepática sigue siendo considerado una estándar para el diagnóstico y evaluación de la fibrosis hepática, por otro lado sus complicaciones como la hipertensión portar y las varices esofágicas, pueden ser evaluadas con la medición del gradiente de presión de la vena hepática y la endoscopia respectivamente (Giunta, Coonde, & Fraquelli, 2016).

○ BIOMARCADORES DE FIBROSIS HEPÁTICA Y DE REGENERACIÓN

En la actualidad la tecnología de las células madre es la alternativa más fiable en contra del daño crónico al hígado, ya que las células madre han dado esperanza para identificar nuevas fuentes expandibles de células que pueden incluir la regeneración del hígado (Hu, et al., 2016).

Las células madre adultas que existen naturalmente en el hígado incluyen células madre mesenquimales y células madre hematopoyéticas (Hu, et al., 2016).

Biomarcadores de Regeneración

El concepto de células madre hasta el momento ha demostrado que proporcionan una explicación alternativa de la progresión de enfermedades como el carcinoma hepatocelular, estas son una subpoblación de células cancerosas que pueden iniciar y regenerar el tejido. Recientemente se ha demostrado que varios grupos de células de carcinoma hepatocelular contienen marcadores como CD44, CD90, CD133 y CD24, los cuales mostraron ser células madre del cáncer por trasplante de xenoinjeto en ratones inmunodeficientes (in vivo) (Thakolwiboon, Zhu, Liang, H. Welling, Zhang, & M. Lubman, 2014).

El destino de las células madre está en gran proporción determinada por el microambiente llamado nicho, la matriz extracelular, como un componente clave en el nicho, es responsable de mantener la estabilidad estructural y la regulación de la proliferación celular, la diferenciación, la migración y otras actividades celulares (Y, Zimmer, H, GK, Fernan, & WJ, 2016).

HFG

Se identificó como un potente factor de crecimiento para los hepatocitos, desempeña un papel esencial en el desarrollo y la regeneración del hígado

además muestra actividad antiapoptótica en hepatocitos (Prystupa, Kicinski, Sak, Boguszewska, & Jurkowska, 2015). Molecularmente hablando este factor bajo condiciones de reducción, da dos bandas con pesos moleculares de 69 kDa y 34 kDa, respectivamente, por lo tanto, el HFG es una molécula dimérica compuesta de una subunidad (69 kDa) y una subunidad (34 kDa), respectivamente, unidas por un enlace disulfuro (Nakamura & Mizuno, 2010).

Relación entre los factores HFG y TGF:

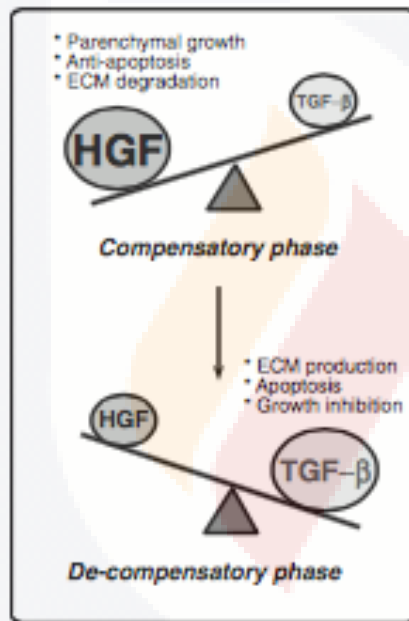


Figura 7. El equilibrio recíproco entre HGF y TGF está involucrado en la determinación del pronóstico de las enfermedades crónicas de órganos, tales como la cirrosis hepática, esclerosis renal y fibrosis pulmonar. En las primeras etapas de trastornos crónicos, la producción de HGF se ve mejorada para suprimir la producción de TGF. Cuando HGF domina el equilibrio eventos regenerativos y eventos antifibróticos se producen como respuesta compensatoria (Schuppan & Pinzani, 2012). Por el contrario, la producción de TGF está regulado durante las etapas avanzadas de prohibir la producción de HGF. Bajo condiciones dominantes el TGF conduce a una rápida progresión de la fibrosis de órganos y su disfunción. Para invertir el equilibrio patógena, la suplementación HGF debe ser

considerada como una nueva estrategia para la atenuación de la fibrosis, una vía común que conduce a fase terminal insuficiencia de órganos como el hígado (HGF: HFG: factor de crecimiento de hepatocitos; ECM: matriz extracelular; TGF-B: factor de crecimiento tumoral; Parenchymal growth: crecimiento parenquimal; Compensatory phase: fase compensatoria; De-compensatory phase: fase descompesatoria) (Nakamura & Mizuno, 2010).

Por lo tanto el HFG mejora enfermedades agudas y crónicas de órganos a través de sus efectos regenerativos, anti apoptóticos, y efectos antifibróticos, además de ser útil para atenuar trastornos inflamatorios, como la cirrosis hepática (Takeda, et al., 2013).

α FP

Alfa-fetoproteína (α FP) es una proteína del componente fetal producida durante el período embrionario por el endodermo visceral del saco gestacional y, más tarde, por el hígado (Abubakar, et al., 2016).

Es uno de los marcadores más utilizados para la detección del carcinoma hepatocelular primario, aunque no significativamente para los pacientes con carcinoma hepatocelular primario en fases tempranas (Wang T. , et al., 2016).

Algunos estudios han demostrado que la presencia de niveles elevados de α FP en pacientes con cirrosis hepática es un factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma hepatocelular; o que sugiere que el aumento de la producción de α FP se podría reflejar en pacientes con cirrosis hepática, en gran parte y anormal o alterado regeneración de las células del hígado, sin embargo, hay otras causas de aumento de los niveles, tales como cirrosis, cáncer de pulmón, cáncer biliar, cáncer gástrico, cáncer pancreático, teratocarcinoma de los testículos, esferocitosis y tirosinemia (Arreta, Cacho, Villavicencio, Estrada, & Hernandez, 2007).

c- Myc

Se trata de un oncogén encargado de la regulación de varios procesos celulares, crucial para el mantenimiento de la célula, estrictamente el crecimiento y la proliferación normal, ya que su inactivación produce efectos letales, de ahí la importancia de que este estrictamente regulado (Wierstra & Alves, 2008), promoción de tumorigenesis, la proliferación celular y el mantenimiento de las células madre (Yang, Zhou, Tone, Durkin, & Popescu, 2016). Se ve sobre expresado en los tumores humanos, estudios demuestran que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento y la diferenciación celular en carcinoma hepatocelular (Khalid, Khan, Mani, Chattopadhyay, Sarkar, & Sinha, 2014). Se ha observado que este oncogen es un iniciador potente en los tumores de hígado, activando el supresor tumoral p53 (Jang, et al., 2012). En la célula, sin embargo interactúa muy promiscuamente con la cromatina, si se expresa a niveles suficientemente elevados, puede ser detectada a elementos (TR, et al., 2016).

○ EVENTOS MOLECULARES DE LA FIBROSIS Y CIRROSIS HEPÁTICA

PDGF así como sus receptores presentan una sobreexpresión en tejidos fibrosos, por lo tanto su actividad aumenta en tejidos fibrosos. Este factor es libertado los las células NK después de la exposición al daño de este órgano (Zhou, Zhang, & Qiao, 2014).

Después de la unión a su receptor específico en la membrana de las HSC, PDGF activa moléculas de señalización y factores de transcripción correspondiente, lo que lleva a la activación de sus genes diana corriente abajo y la activación de HSCs. Estudios han demostrado que este factor es capaz de regular positivamente la expresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-1, e inhibir la actividad de la colagenasa, lo que reduce la degradación de ECM,

desembocando a la mejora del hígado cirrótico (Kocabayoglu, Lade, A, & Dragomir, 2016).

Por otro lado el TGF- β es el conocido inductor fuerte de la fibrogénesis en la fibrosis hepática. Este se sintetiza principalmente por HSC / miofibroblastos, KCS, LS. Estudios han demostrado que TGF- β 1 desempeñan un papel clave en el inicio y mantenimiento de la fibrosis hepática, además de inducir la expresión de los genes de producción de la matriz e inhibe la degradación de la ECM mediante la regulación negativa de la expresión de MMPs y la promoción de TIMP, lo que lleva al depósito excesiva de fibras de colágeno y promover el desarrollo de la fibrosis hepática, responsable también de la pérdida de tejido ya que inhibe la síntesis de ADN de los hepatocitos, lo que provoca una disminución de tejido hepático durante la cirrosis (Sipeki, Szalmas, Lakatos, & Maria., 2014).

También se sabe que el TGF- β tiene un papel crucial durante el desarrollo, la remodelación de tejidos y homeostasis mediante el control de muchos procesos celulares, tales como la diferenciación, la proliferación, la apoptosis y la motilidad en muchos tipos de células (Martinez Palacián, et al., 2013)

El TNF- α juega un papel muy importante durante el proceso de fibrosis hepática con la activación de las HSC y síntesis de ECM, pero también en la inducción de la apoptosis en HSCs, estudios han demostrado ejercer un antifibrogénico en HSCs de rata mediante la reducción de glutatión y la inhibición de la expresión α 1 pro-colágeno (Liberal & Grand, 2016).

Los pacientes tratados con IFN muestran una regresión de la fibrosis hepática, incluso si no se alcanza la erradicación viral, lo que indica que sí tiene actividad IFN antifibrótico a través de la activación de la apoptosis de HSCs. IFN- β podría inactivar HSCs y disminuir su producción de actina α -

músculo liso (SMA) y el colágeno a través de la inhibición de TGF-beta y PDGF vías (Zhou, Zhang, & Qiao, 2014).

Interleucinas

| Interleucinas | Actividad durante el proceso de fibrosis y/o cirrosis hepática. |
|---------------|--|
| IL-1 | Activación de las HSC. Estimula a las células estelares hepáticas para producir MMP-9, MMP-13 y TIMP-1 |
| IL-6 | Puede atenuar la apoptosis Promueve la regeneración de los hepatocitos a través de NF-kappa B Encontrada en pacientes con hígado graso no alcohólico. Induce la inflamación en el hígado. |
| IL-10 | Regula la respuesta inflamatoria Efecto modulador sobre la fibrogénesis hepática. Efectos antifibróticos con la inhibición de la HSC. |
| IL-17 | Aumenta con el grado de fibrosis |
| IL-22 | Inductor de la senectud de las HSC. Restringe la fibrosis hepática. |

Tabla 1. Principales interleucinas involucradas en el proceso de fibrosis, y sus funciones en la patología (Esparza, Manzano, Alcaraz, & Peñarubia, 2015); (Kronenber, et al., 2012).

REGENERACIÓN HEPÁTICA; PROLIFERACIÓN CELULAR

El hígado tiene una enorme capacidad de regeneración a través de diferentes respuestas celulares dependiendo de la naturaleza y gravedad de la lesión. Todo el proceso de reparación del hígado se puede integrar en dos aspectos, incluyendo la regeneración y la curación de la herida. La regeneración hepática es un proceso relativamente complejo y requiere la aportación coordinada de diferentes tipos de células (Yin, Evason, Asahina, & Stainier, 2013).

Durante el proceso de regeneración el sistema de complemento es activado, lo que provoca la liberación de diversas citocinas, entre las que destacan TNF- α e IL-6. En respuesta a esto los hepatocitos en estado quiescente entran al ciclo celular, entonces diversos factores de crecimiento tales como HGF, EGF, HB-EGF y TGF- α , llevan a la célula a la fase S del ciclo, fase donde se da la progresión de la regeneración hepática (Li & Hua, 2016).

Los macrófagos son las células más estudiadas durante la regeneración del hígado, varios estudios han demostrado que la activación de estas células juega un papel importante en la regeneración, y ya que estos proporcionan fuerza de cebado con la liberación de citosinas derivadas de estas células, tales como tumoral- α (TNF- α) y la IL-6, mencionadas anteriormente (Bogdanos, Bin, & Gershwin, 2013).

En general, debido a las diversos tipos de lesiones hepáticas, la regeneración hepática se puede dividir principalmente en tres niveles distintos de restauración (Mao, Glorioso, & Nyberg, 2014). 1. En condiciones normales, o después de la pérdida moderada de parénquima por la resección quirúrgica como ejemplo, la masa hepática se mantiene por la división de hepatocitos (Michalopolous, 2015). 2. Células maduras intrahepáticas, células madre / progenitoras (CCP) residentes y migratorias también participan activamente

en la regeneración del hígado. Por ejemplo, la activación de las células madre / progenitoras hepáticas (LSPCs) es ampliamente identificado en ambas lesiones agudas y crónicas (T & Miyajima, 2014). 3. Cuando la proliferación de hepatocitos se inhibe o se ve abrumada, la lesión hepática conduce a la activación de LSPCs para reemplazar el parénquima hepático lesionado, células ovals hepáticas (Miyajima, Tanaka, & Itoh, 2014) y pequeñas células progenitoras de hepatocitos como (SHPCs) son dos de las poblaciones LSPC que tienen la capacidad de diferenciarse en hepatocitos (Yovchev, Xue, Shafritz, Locker, & Oertel, 2013).



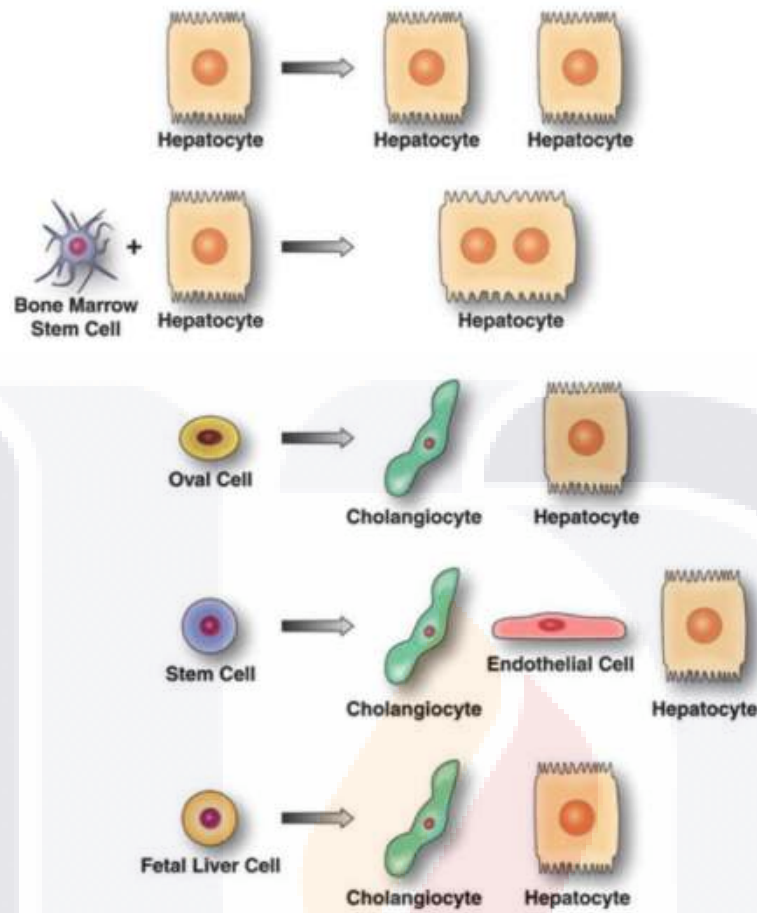


Figura 8. Las posibles fuentes de células en el hígado. Una variedad de tipos de células pueden ser inducidas para formar las células del parénquima en el hígado. Los hepatocitos se pueden dividir para producir hepatocitos hijo; células de médula ósea pueden añadir material genético mediante la fusión con hepatocitos. Las células ovales son células precursoras residentes para colangiocitos y hepatocitos. Las células madre pueden producir todas las células en el hígado. Las células de hígado fetal son una fuente experimental para hepatocitos y colangiocitos (hepatocyte: hepatocito; bone marrow stem cell: células madre de médula ósea; oval cell: células ovales; cholangiocytes: colangiocitos; stem cell: célula madre; Endothelial cell: célula endotelial; fetal liver cell: célula fetal hepática) (Yu, Fisher, Lillegard, Rodysill, Amiot, & Nybeg, 2012).

Células ovas

Las células mesoteliales forman una sola capa de mesotelio y cubre la superficie del hígado, estudios han demostrado que cuando de ejerce un daño crónico al hígado, esta células son capaces de migrar del exterior al interior del hígado y dar lugar a las HSC en fibrosis biliar inducida por la ligadura del conducto biliar o miofibroblastos en la fibrosis inducida por CCl4 (Li, Lua, W, & Asahina, 2015), es por eso que son consideradas como ruta alternativa a la regeneración del parénquima cuando la replicación de hepatocitos se bloquea, su precursor se considera que es una célula madre de hígado facultativa (LSC), un reciente rastreo de linaje indicaron que la LSC es Sox9+ y puede sustituir a la mayor parte de la masa de los hepatocitos en varias configuraciones (Tarlow, Finegold, & Grompe, 2014).

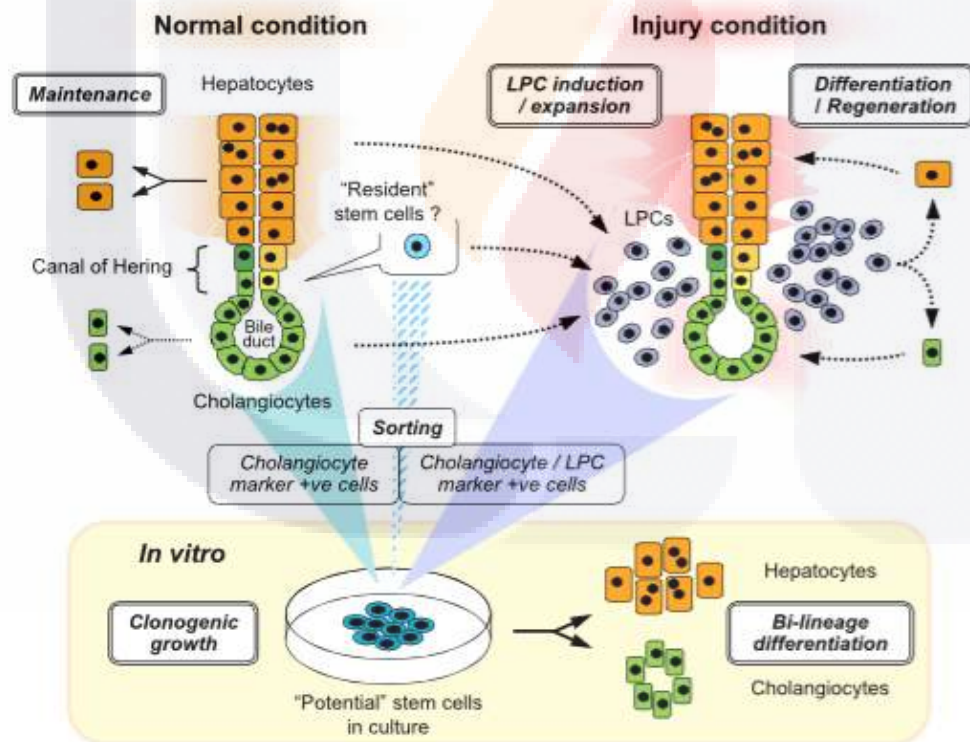


Figura 9. Células Progenitoras en hígado adulto visto en condiciones normales y condiciones de daño. En condiciones fisiológicamente normales, el mantenimiento homeostático de los hepatocitos se consigue principalmente por la proliferación de los propios hepatocitos maduros. A ciertos tipos de condiciones de la lesión, las poblaciones de células epiteliales únicas con un fenotipo inmaduro, llamadas células progenitoras del hígado adulto (LPC), emerge y se expande, creyendo así que contribuyen al proceso de regeneración debido a su potencial de diferenciación tanto de hepatocitos como de hepatocitos y colangiocitos, estas células se cree se derivan del canal de Hering, el cual puede albergar células como las células madre. La purificación por clasificación de células y experimentos de cultivo posteriores han demostrado que la población colangiocitos es un marcador positivo en hígado normal, así como los colangiocitos / LPC es un marcador positivo en hígado lesionado (Miyajima, Tanaka, & Itoh, 2014).

(Resident stem cells; células madre residentes, biliar conduct; conducto biliar, Hepatocytes; hepatocitos, Normal condition; condiciones normales, Cholangiocytes; colangiocitos, LPC; células progenitoras de hígado adulto, injury condition; condiciones de daño).

Las células ovals junto con células madre progenitoras aparecen transitoriamente en el periodo inicial de la regeneración del hígado, ya que constituyen una población de células progenitoras bipotencial de hígado adulto. Cuando la proliferación e incluso la función de los hepatocitos se ve comprometida por la enfermedad crónica o la administración de algún xenobiotico, las células ovals emergen de la zona periportal, en particular, los canales de Hering (rama más pequeña terminal del árbol biliar), y se expanden en el parénquima dañado, un proceso conocido como "respuesta de células ovals" o "reacción ductular". Las células ovals pueden dar lugar a hepatocitos y células epiteliales biliares (Martinez Palacián, et al., 2013).

EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO CD90

CD90 es una proteína de superficie de 25 KDa también conocida como Thy-1 anclada a GPI, usada como marcador de células madre en cáncer, ya que es expresado por células del conducto biliar (Lai, et al., 2016). En condiciones

normales las células Thy-1 son una población heterogénea, situada en la región periportal.

CD90 tiene un doble papel en donde tiene efecto promotor de tumores en algunos tipos de cáncer, y a la vez un efecto supresor de tumor en otros tipos de cáncer. En humanos, la expresión de CD90 se encuentra más pronunciada en neuronas, células T, células endoteliales, células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas y fibroblastos, entre las funciones conocidas de esta célula está la modulación de la fibrosis y la promoción de la migración celular (A, A, J, & BG, 2016).

Recientemente se ha demostrado la expresión de células CD90 en las células del estroma (por ejemplo células madre mesenquimales, fibroblastos) (Thakolwiboon, Zhu, Liang, H. Welling, Zhang, & M. Lubman, 2014) y en células de cáncer de HCC, CD90 se localiza en la membrana celular y el citoplasma (Thakolwiboon, Zhu, Liang, H. Welling, Zhang, & M. Lubman, 2014).

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Ki-67

Ki-67 es una proteína que en los humanos está codificada por el gen MKI67; es una proteína de núcleo que está estrictamente asociado con y puede ser necesario para la proliferación celular (Bonanni, et al., 2012).

Estudios recientes informaron que Ki67 podría ser adecuado para la inclusión en la práctica clínica habitual de cáncer de mama. En las pruebas de múltiples genes nuevos la proliferación tiene un impacto importante en el cálculo del riesgo de recurrencia. Por ejemplo, Ki67 mejoró de forma independiente la predicción de la respuesta al tratamiento y el pronóstico en un grupo de pacientes de cáncer de mama que reciben tratamiento neoadyuvante (Rovira, et al., 2012).

Esta proteína oscila entre los marcadores tumorales con mayor índice de capacidad regenerativa, es muy conocido en el área de oncología para la definición de los proliferación celular (Pascale, et al., 2016).

○ TETRACLORURO DE CARBONO

El uso de drogas es una de las causas más importantes de la insuficiencia hepática aguda y lesiones crónicas (J, YL, Y, Y, & CQ, 2016).

El CCl₄ es el modelo de inducción de cirrosis hepática más usado en el área científica debido a su hepatotoxicidad en los hepatocitos, ya que la apoptosis de los hepatocitos es un importante factor que contribuye a la lesión hepática aguda en una variedad de enfermedades hepáticas (Liu, Wang, & Nowicki, 2014).

La cadena de transporte de electrones y el equilibrio redox de las mitocondrias con objetivos importantes en el daño durante la intoxicación con CCl₄ (Zavodnik, 2015).

Absorción, distribución y excreción del CCl₄

El CCl₄ se activa por CYP2E1, CYP2B1 / CYP2B2 en la sala de emergencias de los hepatocitos para formar el radical triclorometilo y CCl₃* molécula altamente toxica; este radical puede reaccionar con el oxígeno conduce a la formación del radical peróxido de triclorometilo (CCl₃OO*), una especie altamente reactiva, que inicia una reacción en cadena de la peroxidación de lípidos, y provocar daño oxidativo.

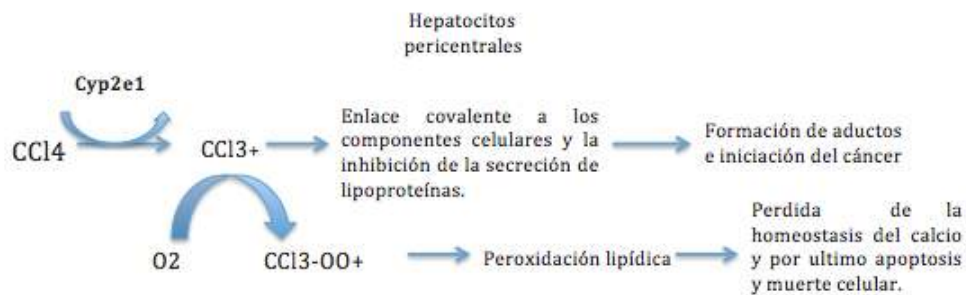


Figura 10. Metabolismo y absorción del tetracloruro de Carbono en el organismo (Ghafoory, Breitkopf, Li, Scholl, Dooley, & Wolfl, 2013).

○ FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

ROS es un término colectivo para las moléculas que contienen oxígeno que, debido a electrones de la capa de valencia no apareados, son altamente reactivos, causando daño oxidativo a los componentes de la célula, incluyendo el ADN, proteínas y lípidos; como resultados de la detención así del ciclo celular esta la apoptosis y la senescencia prematura. En las células normales, una gran porcentaje de ROS son provenientes de la fosforilación oxidativa llevada a cabo en la mitocondria, sus niveles son nivelados mediante un sistema complejo que contiene especies antioxidantes como lo son la vitamina C, E, glutatión, entre otros (Ronn, Guibentif, Saxena, & Woods, 2016).

Con base a datos que evidencian la gran cantidad de ROS intracelular generado en las mitocondrias, provocado en presencia de la interrupción de la cadena respiratoria y la función misma de la mitocondria, se ha sugerido que estos factores son de los más importantes para desencadenar el desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica, que a lo largo de estos puntos, defectos estructurales y funcionales han sido reportados en pacientes con esta enfermedad (Caligiuri, Gentilini, & Marra, 2016).

Se ha documentado que el deterioro mitocondrial y la lesión celular hepática está asociado principalmente a la lipotoxicidad (Caligiuri, Gentilini, & Marra, 2016) (Caligiuri, Gentilini, & Marra, 2016).

Estresantes celulares tales como las especies reactivas de oxígeno, afectan negativamente la capacidad reestructora de las células madre hematopoyéticas, lo que sugiere que una elevación en los niveles de ROS es una barrera importante en la repoblación del tejidos (Ronn, Guibentif, Saxena, & Woods, 2016).

Los ROS se genera tan pronto como a 1 h después de la administración del CCl₄ la formación de ROS en el retículo endoplásmico conduce a la perturbación de la homeostasis de Ca²⁺, alteración del proceso de glicosilación y la acumulación de proteínas mal plegadas que causan estrés y puede servir como una señal de muerte celular para inducir la apoptosis.

Mecanismos de muerte celular mediada por ROS

Peroxidación lipídica

Mecanismo de muerte células más común, mediado por radicales libres provoca la ruptura de las membranas celulares, la peroxidación lipídica es un proceso llevado a cabo por múltiples pasos, provocando la formación de radicales a partir de ácidos grasos poliinsaturados y la participación de iones metálicos, en defensa a esto, las células desarrollaron mecanismos de defensa en contra de los ROS y a peroxidación lipídica, incluyendo enzimas que desintoxican ROS, vitamina E, y quelantes de hierro (Jaeschke, 2011).

Apoptosis

La formación de superóxido inducida puede desencadenar la muerte celular por apoptosis, actuando mediante la activación de la quinasa c-Jun-N-terminal y caspasas (De la Rosa, Schoemaker, & Vrenken, 2006).

Un estudio en hepatocitos de rata demostró que la generación de superóxido intracelular no causa apoptosis en hígado de rata in vivo o los hepatocitos de ratón en cultivo; que se desintoxica primera y sólo cuando los sistemas de defensa están desbordados, el estrés oxidativo provoca necrosis (AL, M, & A, 2009).

Necrosis

Diversas ROS tiene la capacidad de inducir necrosis a través de mecanismos que involucran a la transición de la permeabilidad mitocondrial, la ruptura de la membrana y el potencial de agotamiento de ATP. Sin embargo, los ROS extracelulares no activan directamente la transición de la permeabilidad mitocondrial, pero actúan a través de la oxidación de NAD (P) H, absorción de Ca^{2+} y la formación de ROS mitocondrial (Uchiyanna, Kim, & Kon, 2008).

Por otro lado la translocación de hierro lisosomal a las mitocondrias puede agravar sinérgicamente la disfunción mitocondrial y el oxidante mitocondrial el estrés inducido por el ROS extracelular (Hashimoto, et al., 2011).

- PAPEL DEL CITOCROMO P450

Las enzimas del citocromo P450 son importantes en el metabolismo de sustancias endógenas y xenobióticos; un gran número de estas reacciones se llevan a cabo por la familia del citocromo P450 de proteínas (Woolbrinht & Jaeschke, 2015), su expresión se ve influenciada por factores endógenos, tales como polimorfismos genéticos, sexo, la edad, y los niveles de hormonas (Waxman & Holloway, 2009) e incluso por factores exógenos tales como drogas y sustancias químicas ambientales.

Durante la enfermedad hepática, condiciones como la esteatosis, la fibrosis hepática, la cirrosis y el hepatocarcinoma someten al citocromo P450 a cambios su expresión, potencialmente alterando el metabolismo de los

fármacos en curso y afectando a la toxicidad mediante la reducción o mejorar el metabolismo (Woolbrinht & Jaeschke, 2015); es por eso que es importante hacer una análisis genético de esta enzima en pacientes en etapa terminal de a enfermedad (Chen, et al., 2014)

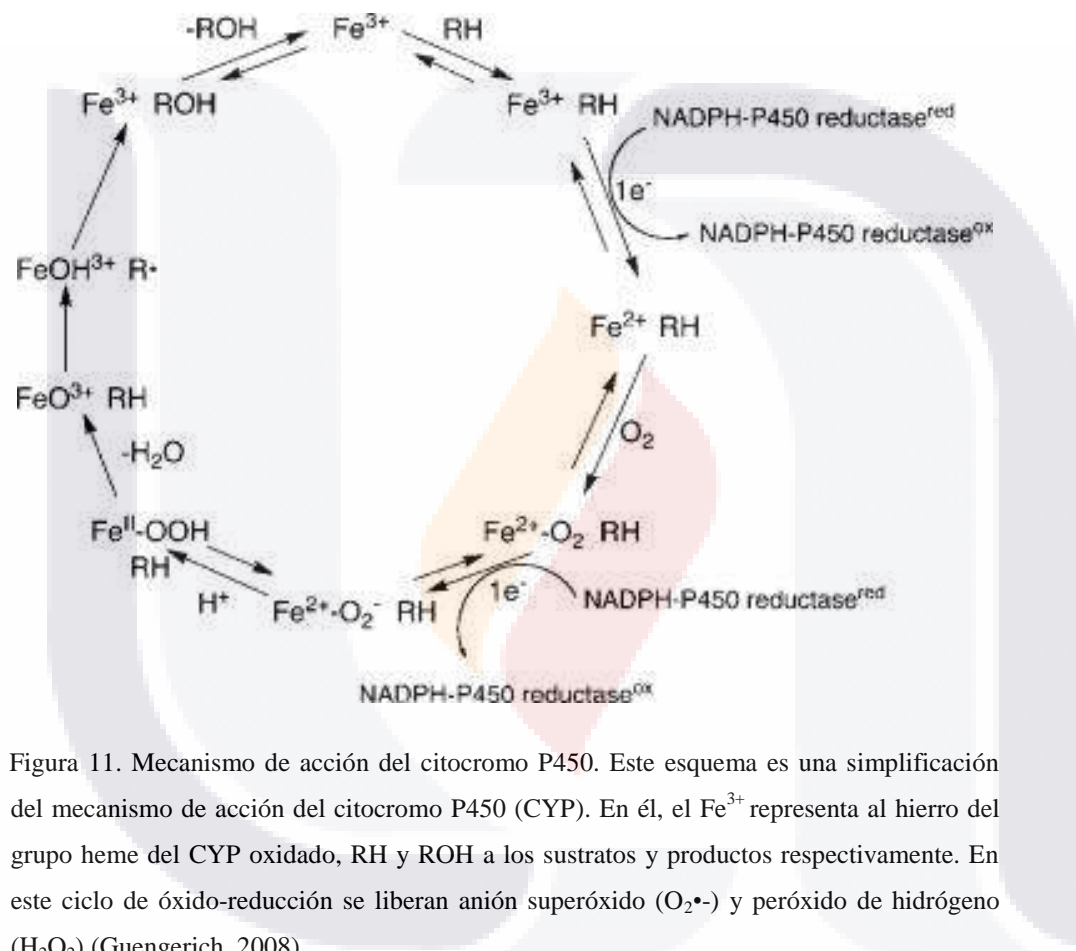


Figura 11. Mecanismo de acción del citocromo P450. Este esquema es una simplificación del mecanismo de acción del citocromo P450 (CYP). En él, el Fe^{3+} representa al hierro del grupo heme del CYP oxidado, RH y ROH a los sustratos y productos respectivamente. En este ciclo de óxido-reducción se liberan anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Guengerich, 2008).

○ CARVEDILOL Y DOXAZOSINA; FARMACOLOGÍA Y MECANISMO DE ACCIÓN

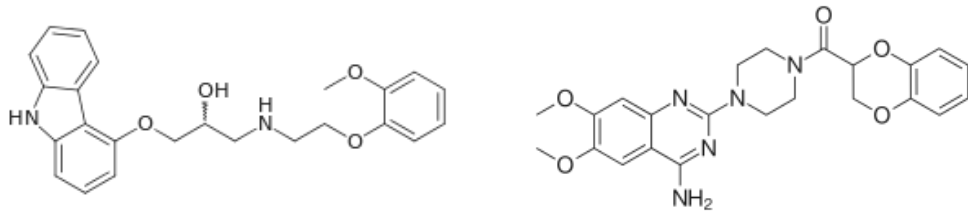


Figura 12. Estructura molecular los fármacos alfa y beta bloqueadores. Carvedilol (izquierda) y la Doxazosina (derecha). (Alejandro, 2009)

El Carvedilol es un antagonista beta usado actualmente como un fármaco antihipertensivo, clínicamente indicado para pacientes con daño portal con el objetivo de reducir la hipertensión portal (Hamdy & El, 2012) debido a este posee propiedades antioxidantes y efectos antifibróticos.

La nueva generación de bloqueadores beta como el Carvedilol tiene un efecto hipotensor portal potente que es superior a propranolol; sin embargo, tiene mayor riesgo de causar hipotensión sistémica (Paik, 2016), hasta el momento el uso de beta bloqueantes en pacientes con avanzado grado de cirrosis con ascitis es un tema controversial en cuanto a su seguridad y eficacia, ya que se ha informado sobre el posible riesgo de padecer síndrome hepatorenal y lesión renal aguda con el uso de estos tratamiento, sin embargo en la actualidad estudios han demostrado que los beta bloqueadores son seguros (Leithead, Rajoriya, & Tehami, 2015).

El Carvedilol es metabolizado en un gran porcentaje en e hígado, por medio de reacciones de oxidación y conjugación, se excretá en la bilis en forma de conjugados glucurónidos. Estos conjugados son metabolitos activos, por lo que puede afectarse la eficacia de su acción farmacológica en pacientes que tiene colestasis. Por otra parte, el Carvedilol se une en cantidad importante con proteínas plasmáticas, por lo que en pacientes con cirrosis avanzada

puede incrementarse su biodisponibilidad (Ding, Tian, Li, Wang, & Zhan, 2015).

Los bloqueadores beta no selectivos pueden ser particularmente potentes para la inhibición de la angiogénesis de la cirrosis hepática. El Carvedilol por ejemplo debido a su receptor alfa 1 y sus efectos bloqueadores beta, tiene el potencial de inducir una disminución más pronunciada de la presión portal (Ding, Tian, Wang, & Zhang, 2015).

Por otro lado la Doxazosina un antagonista de receptores alfa 1 adrenoreceptor, ejerce un efecto antihipertensivo y es usado como tratamiento en la hiperplasia benigna de próstata, inhibiendo la sobreexpresión de TGF- β (Muñoz Ortega, et al., 2016).

Estudios ha demostrado que el tratamiento con Doxazosina causa alteraciones diferenciales en el flujo sanguíneo y los niveles de NOS en el trato genitourinario, por tanto sugiere efectos benéficos de antagonista como la Doxazosina en la próstata y vejiga cuando se usan para tratar la presión arterial y la hiperplasia prostática benigna (Yono, Yamamoto, Yoshida, Ueda, & Latifpour, 2007).

I. II ANTECEDENTES

La regresión de la cirrosis hepática es un tema controversial, ya que hablar sobre la posible recuperación de la función de un hígado después de un daño crónico, puede hasta cierto punto ser tomado como imposible, por la poca evidencia documentada que respalda esta hipótesis.

En estudio in vivo de células endoteliales de la vena umbilical humana, se determinó la capacidad de la Doxazosina para afectar el crecimiento de las células endoteliales vasculares humanas y a su vez su capacidad de modular el VEGF mediada por la angiogénesis, esto, con el análisis del efecto de este fármaco sobre el crecimiento celular, la apoptosis, la adhesión, la migración y la respuesta angiogenica de estas células. Los resultados proporcionan una nueva visión de la capacidad de la Doxazosina para suprimir el crecimiento y la respuesta angiogenica de las células endoteliales humanas por interferir con VEGF y a acción de FGF-2. Lo que proporciona evidencia sobre el potencial de los tratamientos a base de quinazolina como agentes antiangiogénicos para el tratamiento de cáncer de próstata (Keledjian, Garrison, & Kyprianou, 2005).

En un estudio se evaluaron características morfológicas a intervalos mensuales en ratas inducidas con CCl₄ durante un período de 9 meses, durante los primeros 4 meses se identificaron características del complejo de reparación hepática, junto con la ampliación de los nódulos hepáticos y adelgazamiento de los septos fibrosos. Después de los 4 meses el cuadro histológico, compuesto de nódulos grandes, discretos y con cirrosis septal incompleta, parecía estar estabilizado. Estos hallazgos sugirieron que cuando se elimina la causa de la cirrosis, el hígado puede adaptarse a una estructura nueva y permanente, probablemente compatible con la función normal o casi

normal, lo que puede hacer que la cirrosis hepática clínicamente, aunque no morfológicamente, es reversible (Di Vinicius *et al.*, 2005).

Un estudio en ratas Wistar albinas de 3-4 meses de edad, de entre 250 y 350g de peso, con una ingesta calórica controlada y con una ligadura del conducto biliar común, demostró que hígados con colestasis crónica a consecuencia de la ligadura presentaron un incremento en los niveles de c-Myc fosforilado y ERK ambos responsable de la proliferación celular, esta respuesta proliferativa de c-Myc es dependiente de la transcripción de genes implicados en la maquinaria de síntesis proteica por tanto este oncogen también tiene un papel importante en la biogénesis ribosomal y la traducción de proteínas (Arduini, 2009).

Por otro lado un estudio demostró que la regeneración hepática posterior al daño causado por un agente extraño no solo puede estar a cargo del órgano mismo sino a la acción de algunos de los factores que son causales de la patología, como la participación del nervio vago hepático en rata Wistar en la activación del compartimento de células progenitoras hepáticas en un hígado cirrótico, probablemente a través de la unión de la acetilcolina al receptor M3, expresado en estas células. Estos hallazgos pueden ser de importancia clínica para los pacientes con un trasplante de hígado (David Cassiman *et al.* 2002).

En un estudio se evaluó la expresión de la ciclina D1 en comparación con la Ki67 en pacientes con carcinoma de cuello uterino activado por virus del papiloma humano de alto riesgo, donde se encontró que estas células están asociadas con un aumento en la proliferación celular, se señala que tanto c-myc como Ki67 pueden tener esta misma propiedad ya que estas dos proteínas aumentan su expresión con la proliferación celular presente en la neoplasia intraepitelial cervical y en carcinoma de cuello uterino (Alameda, *et al.*, 2004).

En otro estudio se analizó la respuesta proliferativa de Ki67 mediante inmunohistoquímica de 96 casos de vesículas biliares con colecistitis crónica, con evidencias de reagudización inflamatoria, signos de regeneración epitelial, displasia, ni tumor, del Servicio de Anatomía Patológica de Clínica Alemana de Santiago y 102 pacientes con cáncer de vesícula biliar del Hospital de Temuco, Chile. En todos los casos el diagnóstico se realizó en la pieza de colecistectomía. El nivel de infiltración tumoral fue establecido mediante el estudio seriado de la totalidad de la vesícula biliar (mapeo). La expresión de Ki67 en distintos tipos de adenocarcinoma de la vesícula biliar muestran intensa positividad en el epitelio tumoral con porcentajes de entre 40% e incluso hasta un 100% de las células epiteliales tumorales, un porcentaje muy aumentado en comparación con la expresión en mucosa vesicular no tumoral donde alrededor de un 40% de las células mostraban coloración. Estos resultados demuestran una clara separación entre lesiones tumorales y no tumorales en base a los índices de proliferación medidos a través de la expresión de Ki67 (Roa, Elorza, Lantadilla, Ibacache, & De Aretxabala, 2009)

Un estudio en rata reconoce a las células estelares hepáticas como las células progenitoras del hígado, con el análisis de la proliferación y la diferenciación in vitro de estas células con el fin de explorar su capacidad potencial en el trasplante intrahepático. Estas células fueron detectadas en la zona porta y el conducto biliar en el hígado de ratas sometidas a la 2-acetilamoni-fluoreno y posteriormente a la hepatectomía parcial, las células ovals aisladas presentaron altos índices de positividad para el anticuerpo CD 90 (99.8%), Estas células fueron trasplantadas a animales después de un trasplante ortotópico, observando se que después del trasplante de estas células se extendía la supervivencia y mejora de la función del hígado trasplantado. Estos resultados indican que las células ovals hepáticas pueden ser útiles

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

para la regeneración celular de un hígado después del trasplante ortotópico (Li, et al., 2013).

Con esto nos podemos dar cuenta del avance considerable en el desarrollo de agentes antifibróticos y otras estrategias para tratar la fibrosis hepática; sin embargo, la restauración a largo plazo de la masa hepática funcional aún no se ha logrado. Con base a esto se investigó si las células madre progenitoras hepáticas trasplantadas pueden repoblar efectivamente el hígado con una avanzada etapa de fibrosis o incluso cirrosis bien establecida para esto se utilizaron células madre progenitoras derivadas de hígado fetal o hepatocitos maduros de ratas DPPIV1 F344 las cuales fueron trasplantadas en ratas DPPIV2 con tioacetamida (TAA) por 4 meses, en él se demostró una repoblación de más del 20% del hígado en la ausencia de PH. Por tanto este estudio es una prueba de que el trasplante de células madre progenitoras epiteliales puede restaurar parénquima lesionado en un entorno de hígado con la avanzada fibrosis cirrosis (Mladen I. et al. 2014).

Un estudio en ratas Wistar evaluó la reacción ductular de CKT-7 en nogenesis carcinógena en múltiples etapas en relación con los niveles de γ GT. Se llevó a cabo una inducción de carcinoma hepatocelular durante 24 horas con Dietilnitrosamina. Los resultados en la incidencia de tumores, características histológicas, el índice de hígado de daños en el ADN y la expresión de las proteínas de estrés oxidativo, demuestran el aumento de las células positivas a CKT-7 así como el aumento de los niveles de gamma glutamil transferasa (γ GT), lo que sugiere que la reacción ductular está implicado en la progresión de la hepatocarcinogenesis de múltiples etapas (Moreira, et al., 2016).

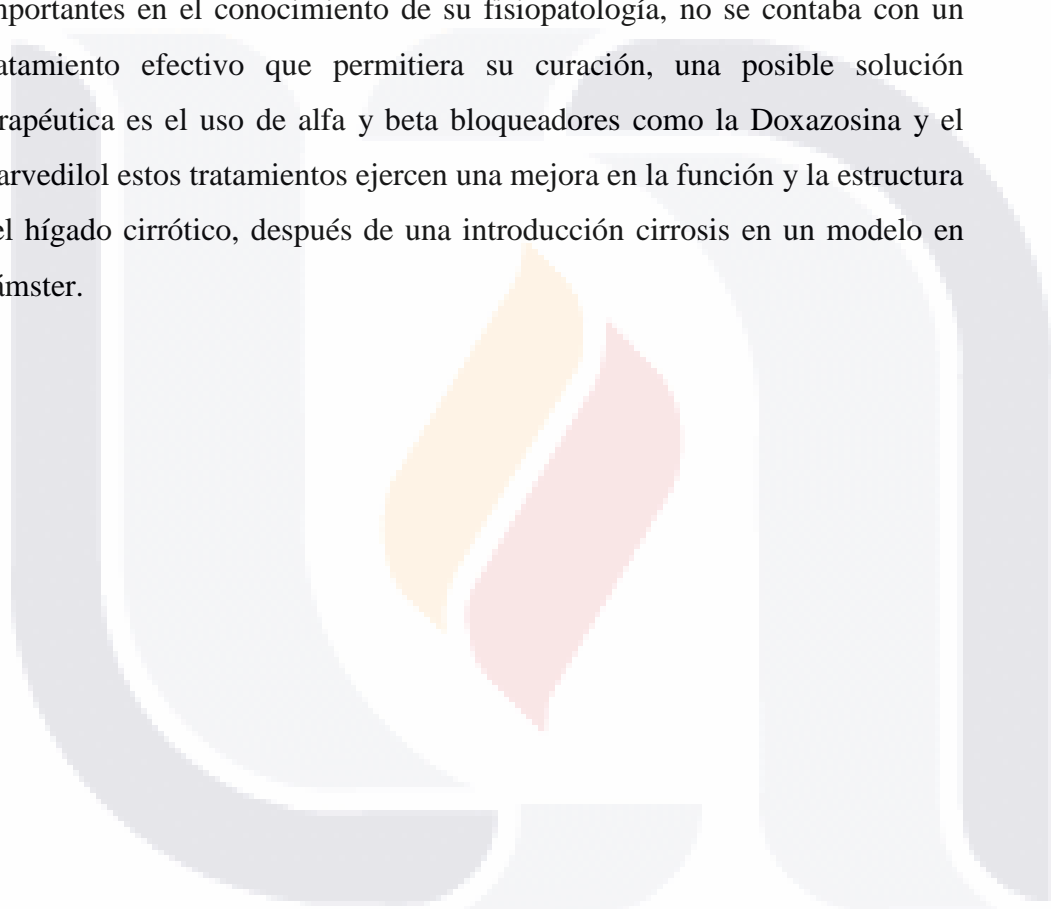
Por otro lado un estudio en rata Wistar macho con cirrosis inducida con CCl4 proporcionó evidencias de efectos antifibróticos prometedores del Carvedilol que se pueden explicar por una evidente mejora de estrés

oxidativo a través, principalmente, de la reposición de GSH, además de la restauración de la actividad de las enzimas antioxidantes y la reducción de la peroxidación de lípidos, así como la mejora de la inflamación y la fibrosis por la disminución de la acumulación de colágeno, el nivel de proteína de fase aguda, la expresión de NF-kappa B y la activación finalmente HSC (Hamdy 2012).



I.III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México la cirrosis hepática es la tercera causa de mortalidad en hombres y la séptima en mujeres. Se ha descrito que la mortalidad por cirrosis hepática varía entre 11.6 a 47.4 por 100,000 habitantes, encontrándose la mayor mortalidad en el área central del país, a pesar de los avances importantes en el conocimiento de su fisiopatología, no se contaba con un tratamiento efectivo que permitiera su curación, una posible solución terapéutica es el uso de alfa y beta bloqueadores como la Doxazosina y el Carvedilol estos tratamientos ejercen una mejora en la función y la estructura del hígado cirrótico, después de una introducción cirrosis en un modelo en hámster.



I.IV HIPÓTESIS

La administración de Carvedilol y Doxazosina aumentarán los eventos de regeneración y reorganización celular en el hígado de hámsteres (*Mesocricetus auratus*) con cirrosis hepática.



I.V JUSTIFICACIÓN

La cirrosis hepática es considerada como la quinta causa de mortalidad en México, cada año fallecen 30 mil personas por esta enfermedad. Este padecimiento es un problema de salud pública en el país, que se registra comúnmente en la población con edad productiva (Campollo, 1997).

El impacto social y económico de la cirrosis hepática probablemente ha sido desestimado en favor de otro tipo de padecimientos, y a pesar de que ésta es considerada como un problema de salud pública, no se le ha estudiado formalmente en épocas recientes.

Actualmente se conoce que el hígado posee una población de células que forman un compartimiento neuroendocrino del hígado, lo que podría estar bajo el control del sistema nervioso central (sensibles a acción de neurotransmisores) (Medeiros, 2014), por lo tanto esta evidencia demuestra que el sistema nervioso parasimpático promueve la expansión de células progenitoras del hígado después de la lesión, mejorando la regeneración (Roskams, 2004). Sin embargo, el efecto de la inhibición del sistema nervioso simpático (SNS) en el número de células ovas (células progenitoras) aun no es bien conocido. La inhibición adrenérgica moviliza precursores hematopoyéticos en la circulación y también se ha demostrado que promueve la regeneración del hígado (Oben, 2003)

Con base a lo anterior, este proyecto tiene como propósito demostrar la eficiencia de fármacos alfa y beta bloqueadores Carvedilol y Doxazosina en la regeneración de la estructura y la función hepática después de una inducción de cirrosis con CCl₄, modelo más usado en toxicología actuando sobre los hepatocitos (Castro, 1993).



CAPITULO II

-OBJETIVOS-

- **II.I Objetivo General**

Demostrar la eficiencia de la Doxazosina y el Carvedilol en la regeneración de la estructura y función hepática.

- **II.II Objetivos Específicos**

Analizar el restablecimiento histológico de las 3 zonas (zona porta, zona centrolobulillar y zona media) más importantes en la función hepática.

Verificar la restitución de la función hepática mediante pruebas bioquímicas.

Detectar la presencia de células positivas a CD90 y Ki-67 durante la regeneración hepática.

Identificar la expresión de marcadores con mayor relevancia en la regeneración tisular durante el tratamiento con los α/β adrenobloqueadores



CAPITULO III

-METODOLOGÍA-

III.I ESTRATEGIA GENERAL

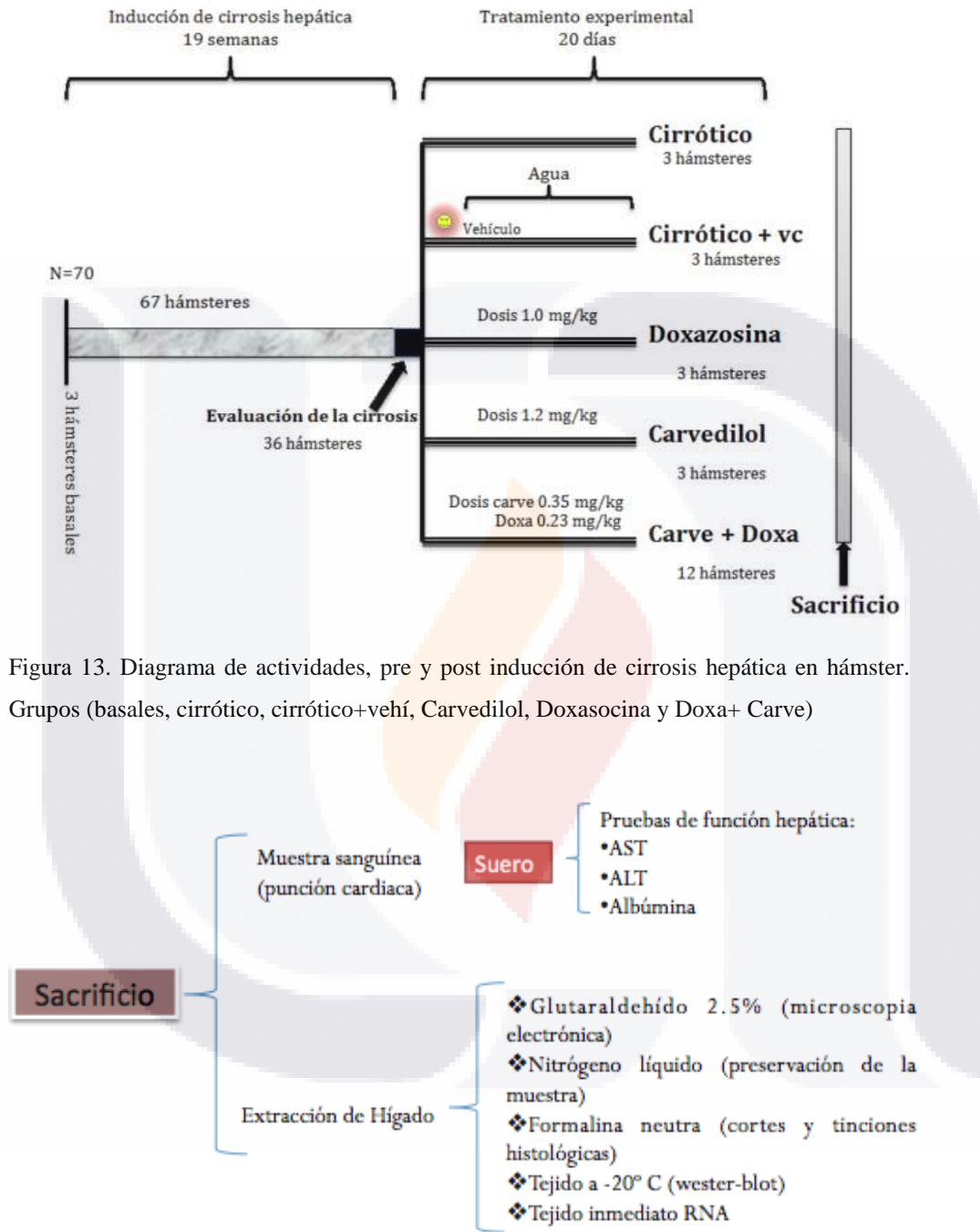


Figura 13. Diagrama de actividades, pre y post inducción de cirrosis hepática en hámster. Grupos (basales, cirrótico, cirrótico+vehí, Carvedilol, Doxasocina y Doxa+ Carve)

Figura 14. Diagrama de actividades post sacrificio de todos los grupos a prueba.

III.II MATERIALES

| APARATO | NUMERO DE SERIE | MARCA |
|--|-----------------|-------------------|
| Centrifuga | | SOLBAT |
| Histoquinet automático | STP120 | LEICA |
| Thermoscientific | 5336 | LEICA |
| Microtomo | RM2125 | LEICA |
| Estufa | | RIOSSA |
| Microscopio | Axioscop40 | ZEIZZ |
| Chemistry system | Vitros DT60 II | JOHNSON&JOHNSON |
| Sv total RNA | Z3100 | PROMEGA |
| Tubo de centrífuga de polipropileno | Safe-Lock | EPPENDORF |
| Ultra-turrax | T10 Basic | IKA |
| Ultracongelador | TSU600A | THERMO SCIENTIFIC |

| | | |
|----------------------------|-------|---------|
| GoTaq Real-Time PCR | R2523 | PROMEGA |
|----------------------------|-------|---------|

| | |
|------------------------|--------|
| Transiluminador | BIORAD |
|------------------------|--------|

| | |
|---|------|
| Swift MiniPro Thermal Cycler | ESCO |
|---|------|



III.III MÉTODOS

INDUCCIÓN DE CIRROSIS HEPÁTICA, MODELO CCl₄

Se usaron 70 hámsteres macho dorados (*Mesocricetus auratus*), 3 fueron tomados como basales, se indujo cirrosis en los 67 hámsteres aplicando una dosis previamente establecida y estandarizada de tetracloruro de carbono (CCl₄) a una dosis de 50 mg/kg vía intraperitoneal 2 veces por semana durante 19 semanas, fueron registrados los pesos mensuales y cambios anatómicos observados, tales como ascitis, pérdida de pelo y necrosis testicular, entre otros. Durante el proceso de inducción los animales fueron alimentados con trozos de purina y agua ad libitum mantenidos en ciclos de luz y oscuridad de 12/12. 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 de laboratorio).

Después de las 19 semanas de inducción fueron sacrificados 3 hámsteres para tomarlo como control de la cirrosis inducida (cirróticos) y 3 hámsteres como controles de regeneración endógena (cirróticos + vehículo) alimentados con croquetas e hidratados con agua durante el proceso de tratamiento.

MODELO EXPERIMENTAL DEL TRATAMIENTO CON ALFA/BETA ADRENO BLOQUEADORES.

Después de las 19 semanas correspondientes a la inducción con CCl₄, se formaron los siguientes grupos: 1) Tratados con Doxazosina a una dosis de 1.0 mg/kg (n=3), 2) tratados con Carvedilol a una dosis de 1.2 mg/kg (n=3),

3) cirrótico mas vehículo que fue tratado con agua ad libitum (n=3)mg/kg de peso; ; todos tratados durante 20 días y 3) tratados con doxazosina y carvedilol a una dosis de 0.23 y 0.35 mg/kg kg (estas dosis aplicada en humanos fueron llevadas al peso del animal) respectivamente durante 3 semanas (n=15).

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS:

EXTRACCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Después de los tratamientos los hámsteres fueron anestesiados con pentobarbital a una dosis de 0.63 mg/kg de peso y sacrificados para la extracción de muestra sanguínea y tejido (hígado completo), las muestras de sangre fueron centrifugadas en la centrifuga marca Solbat, se separó el suero del paquete globular y este fue almacenado a -20°C para pruebas de función hepática. El tejido fue dividido para los diversos procesamientos, como se puede observar en el siguiente esquema.



Figura 15. Análisis de muestras de hígado post sacrificio muestras basal, cirrótico, cirrótico más vehículo, Carvedilol, Doxazosina y Doxa+Carve.

PROCESOS HISTOLÓGICOS

Las muestras biológicas fueron fijadas con formalina neutra (10%) por 24 horas antes de ser procesadas en el Histoquinet automatico (Microm STP120) con las soluciones vistas en el anexo A.

Después de la preparación los tejido se fijaron en bloques de parafina (Richard Allan Scientific Paraffin en el Thermoscientific Microm EC 350-2), cada uno de los cubos de parafina fueron procesados en el Microtomo de rotación (Leica modelo RM 2125) obteniendo cortes de 5 micras de espesor. En portaobjetos previamente silanizados se colocaron cada uno de los tejidos, y fueron mantenidos durante 24 horas en la estufa (RIOSSA) a una temperatura 68° C.

Las laminillas secas y atemperadas fueron teñidas mediante la tinción HE, tinción de PAS, tinción rojo sirio e inmunohistoquímica usando los marcadores KI67 y CD90 siguiendo los protocolos establecidos (véase en anexos B, C, D Y G), las laminillas se montaron con medio entellan y se sellaron con esmalte transparente para su observación al microscopio (Micro Zeizz Axioscop40, cámara cool SNAP-Pro) las imágenes histológicas capturadas fueron editadas en el Programa Imagen -Pro Plus.

Tabla 2. Anticuerpos usados para la detección de antígenos por inmunohistoquímica.

| Anticuerpo primario | Epitope | Dilución | N° catalogo | de Casa comercial |
|----------------------------|---------------------------|-----------------|--------------------|--------------------------|
| KI 67 | IgG | 1:100 | hPRa2+3 | CELL MARQUE |
| CD90 | CD90/ThY1Gln20- Lys130 | 1:100 | MAB7335 | R&D SYSTEMS |

| | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------|-------|--------|------|--|
| Anticuerpo | | | | | |
| SECUNDARIOS | | | | | |
| Envision+Dual link system-HRP | Rabbit/Mouse Ig G | 1:1 | K4061 | Dako | |
| Cabra Anti-Rata IgG HRP | Ig G de Conejo | 1:500 | 10H556 | MP | |

PRUEBAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA

Después del sacrificio de los hámsteres se extrajeron muestras sanguíneas por medio de punción cardíaca. Se separó el suero y se determinaron las transaminasas, AST y ALT, además de proteínas como la albúmina, factores de coagulación y bilirrubinas por medio del equipo de Químicas (VITROS, DTSC II) a cada uno de los grupos.

EXTRACCIÓN DE RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el kit SV Total RNA Isolation System (PROMEGA con un número de catálogo Z3100), para esto se tomó la muestra inmediatamente después del sacrificio de los 14 hámsteres en tubos Eppendorff que contenía buffer de lisis y homogeneizaron en el equipo T10 Basic ultra-turax. Las muestras fueron tratadas con buffer de lisis, y posteriormente homogeneizadas, siguiendo el protocolo de extracción (véase en anexo F) se extrajo RNA.

El RNA extraído fue cuantificado (espectro) y resguardado a -90°C en ultra congelador.

RETROTRANSCRIPCIÓN

Las muestras de hígado con 5ng de RNA de cada uno de los tratamientos fue sometida a retrotranscripción para la obtención de cDNA mediante el uso del kit de la marca promega GoScript Reverse Transcription system.

PCR

Las muestras con concentración definida de cDNA fueron procesadas mediante PCR con el kit REDTaq ReadyMix (R2523), se hibridaron con oligos de importancia en la regeneración del órgano; FGH, AFP, c-Myc, CKT-18 y CKT-7. Para la observación de los productos de PCR se realizó en gel de agarosa al 2.5% con bromuro de etidio al 0.05%. En cada carril se cargaron 5 µL de producto PCR y 3 µL del buffer de carga. La visualización de las bandas en el gel se realizo en un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad).

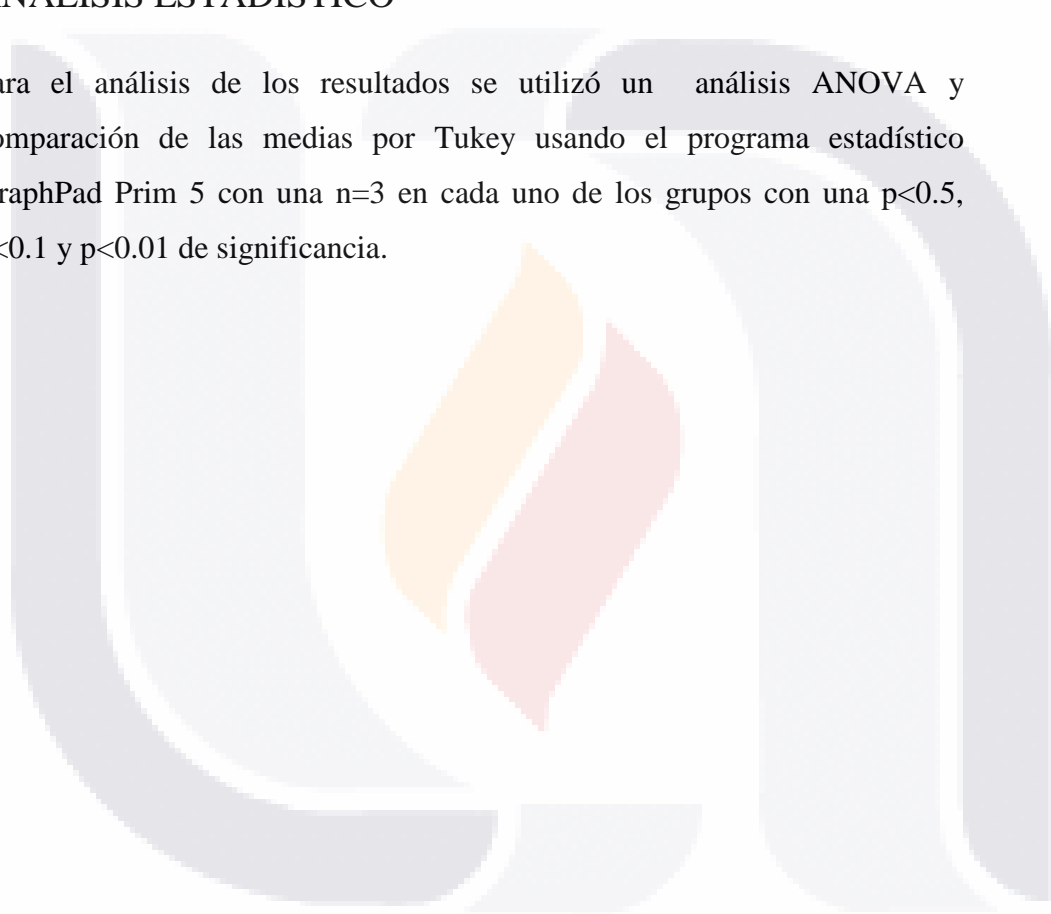
Tabla 3. Genes empleados en el análisis PCR.

| GEN | Oligonucleótido-F | Oligonucleótido-R | Tamaño de amplicon | Número de Acceso al NCBI |
|-----------------|---------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
| β actina | GTGTGTGACAAT GGCTCTGG | TCTTTTGCTCTGGGC TTCAT | 115pb | XM_0050636 76.1 |
| AFP | GAGATTGAGAA GCTGGTCCTG | GCAGCACTCTGCTAT TTTG | 160pb | XM_0050681 61.1 |
| c-Myc | TGCTCCACCTCT AGCCTGTA | AGGAGAGAAGGCTG TGGAGT | 200pb | AJ582076.1 |
| HFG | GCATCATTGGTA AAGGAGGC | GCGTACCTCTGGATT GCTTG | 200pb | XM_0050808 80.1 |

| | | | | |
|--------------|--------------------------|--------------------------|-------|--------------------|
| CK-7 | GACCCTACCATC CAGCAAGT | CCACTTGGTCTCCAG CATCT | 160pb | XM_0050672 71.2 |
| CK-18 | ACTCCACCACCT TTCCACCA | TTTGTGGAGCGGGA CACAGA | 129pb | XM_0050672 90.2 |

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados se utilizó un análisis ANOVA y comparación de las medias por Tukey usando el programa estadístico GraphPad Prim 5 con una n=3 en cada uno de los grupos con una $p < 0.5$, $p < 0.1$ y $p < 0.01$ de significancia.





CAPITULO IV
-RESULTADOS-

Inducción de cirrosis hepática

Durante la inducción de cirrosis hepática CCl_4 los hámsteres presentaron una pérdida progresiva de peso en los animales (Figura 15), por otro lado se observó físicamente la acumulación de líquido en el área peritoneal además de un aparente daño testicular en algunos de estos casos (Figura 14) todos sometidos a la misma dieta e hidratación.



Figura 16. Cambios físicos observados en hámsteres en el transcurso de la inducción. Se observa un aumento en el volumen testicular (circulo) así como en el área peritoneal (flecha negra).

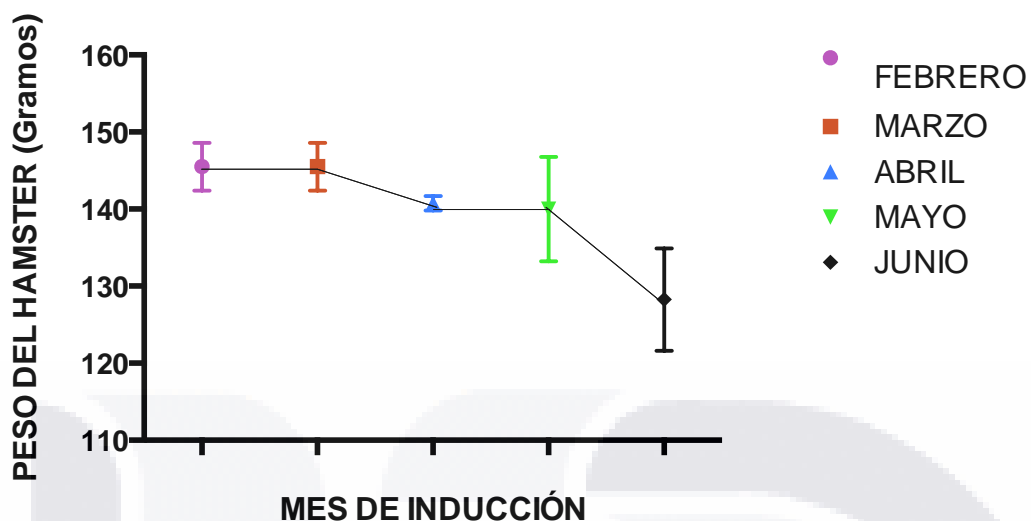


Figura 17. Gráfica de pesos registrados en el proceso de inducción. En esta grafica puede observarse un decremento en el peso de los hámsteres durante la inducción de la cirrosis hepática ($p < 0.05$).

Análisis Macroscópico de hígados con cirrosis y tratados.

Posterior al sacrificio a nivel macroscópico observamos que en los hígados cirróticos presentan una mayor contenido de acúmulos de grasa en la superficie del órgano además de una pérdida de la coloración y de estructura morfológica con presencia de nódulos inflamatorios, en relación a los intactos y los tratados lo cuales presentan semejanza entre sí en estas características e incluso la sinergia en la que el hígado presenta una coloración mas rosada, no presenta inflamación ni acúmulos de grasa.

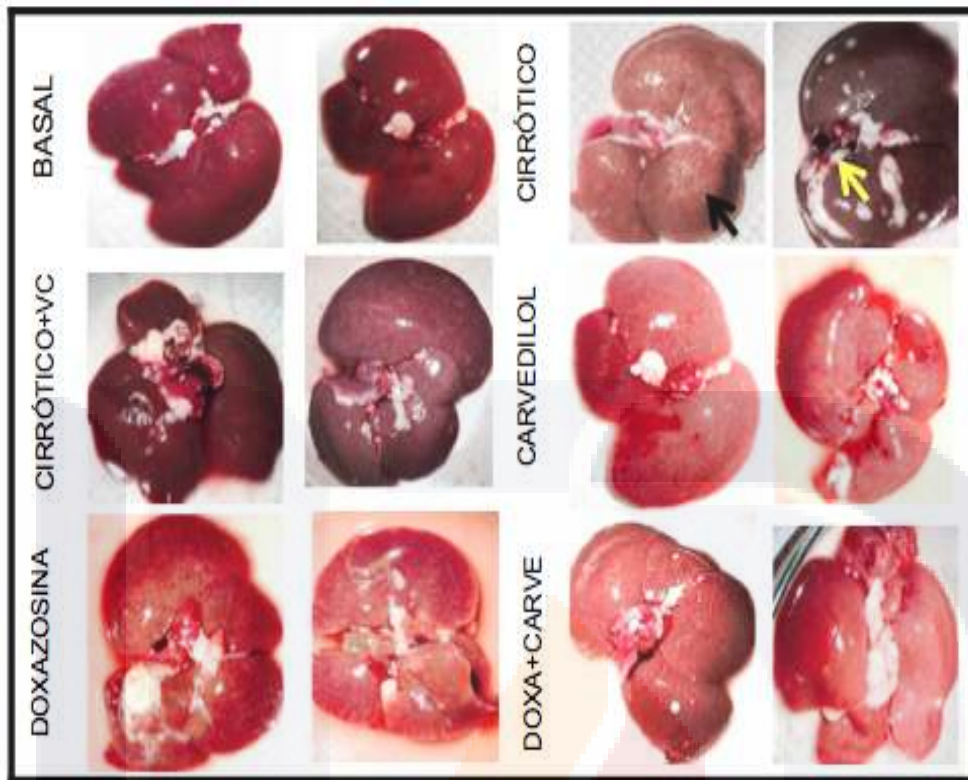


Figura 18. Aspecto macroscópico del hígado de los hámsteres después de la inducción de etapa avanzada de cirrosis y la aplicación de los tratamientos. En la parte superior los hígados intactos muestran una apariencia sana en morfología y coloración, los hígados dañados con el CCl₄ muestran la formación de nódulos (flechas negras) y algunos puntos con acúmulos de grasa (flechas amarillas), los grupos cirrótico + vehículo (vc) presentan una coloración pálida causada posiblemente por la acumulación de líquidos depositados en el órgano; para los tejidos dañados con CCl₄ y posteriormente tratados con Carvedilol o Doxazosina se observan una coloración ya más característica del órgano en comparación de nuestros hígados sanos (parte superior).

Pruebas de función hepática posterior a la inducción de CCl₄ y restitución de la función posterior al tratamiento.

a) Pruebas de función hepática posterior a la inducción:

Con el fin de determinar el grado de cirrosis durante la inducción con CCl₄ se determinaron algunas enzimas de daño tales como AST y ALT donde observamos inicialmente que con el proceso de daño se incrementan ambas enzimas indicando un daño a nivel celular causado por la liberación de estas enzimas al torrente sanguíneo, así como la capacidad de síntesis de albúmina se ve disminuida por el mismo daño en la función celular (figura 17)

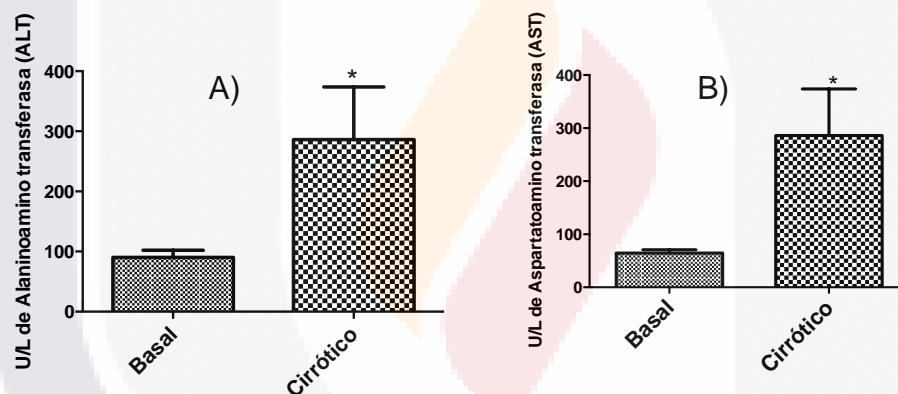


Figura 19. Transaminasas en suero posterior a la inducción de una etapa avanzada de cirrosis hepática grupos basal y cirrótico. Los gráficos representan los valores obtenidos con 3 animales por grupo en cada prueba. Con una significancia estadística *P<0.05 en el grupo cirrótico con respecto al grupo basal, se observa un importante incremento en la concentración de ambas enzimas en el suero del grupo cirrótico, lo que nos señala que el CCl₄ infringe un daño en el metabolismo del hígado.

C)

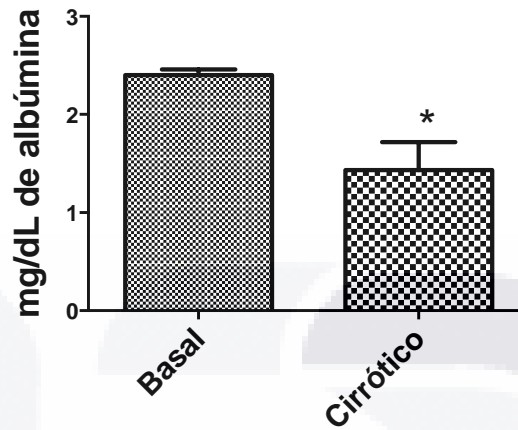


Figura 20. Proteína en suero posterior a la inducción de una etapa avanzada de cirrosis grupos basal y cirrótico. El gráfico muestra valores de 3 animales por grupo, con una significancia estadística de $*P < 0.05$ en el grupo cirrótico con respecto al grupo basal en la disminución de la proteína, lo cual nos proporciona información sobre la falta de función en la células hepáticas a causa del daño.

b) Recuperación de la función hepática durante la reversión endógena.

El análisis de los grupos anteriores con respecto al grupo con reversión endógena tanto en la producción de enzimas como proteínas se señala una aparente mejora evaluando su capacidad regeneradora, ya que observamos que el grupo cirrótico presenta un aumento significativo en el daño celular, con el deficit en la síntesis de enzimas y proteínas importantes en el organismo, con respecto al grupo basal.

Se muestra la concentración de ALT de cada uno de los grupos, donde los hámsteres cirróticos muestran diferencias significativas (** $p < 0.01$) con respecto a los hámsteres cirrótico + vc, por otro lado la comparación entre los grupos cirrótico + vc y el basal en este mismo gráfico se muestran

notorias diferencias (*p<0.05) lo que nos indica que la regeneración endógena de hígado no fue lo suficiente para llegar a una función hepática normal.

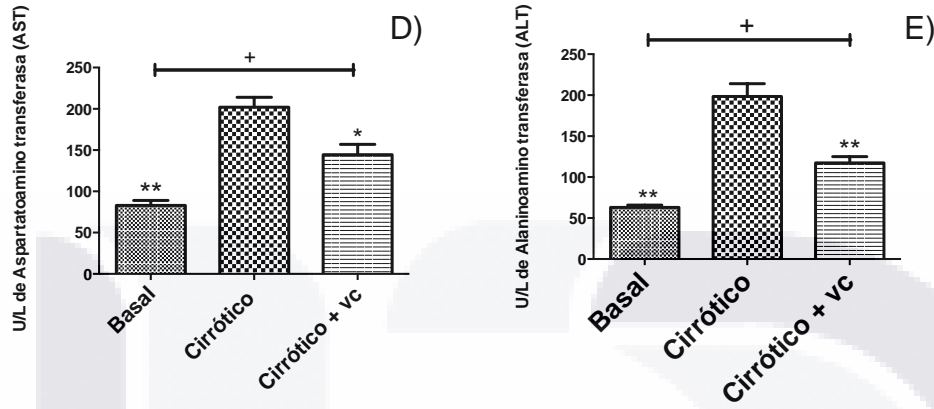


Figura 21. Transaminasas en suero posterior a la inducción de una etapa avanzada de cirrosis en los grupos cirrótico, cirrótico + vehículo (vc) y basal.

En la gráfica de la derecha se muestra concentración de AST donde al igual que la ALT el cirrótico presenta diferencias significativas con respecto al cirrótico + vc (*p<0.05) y con el basal (**p<0.01) e incluso los grupos cirrótico + vc y basal no llegan a tener concentraciones similares sino que aún se encuentran muy por encima de casi un 50% (*p<0.05).

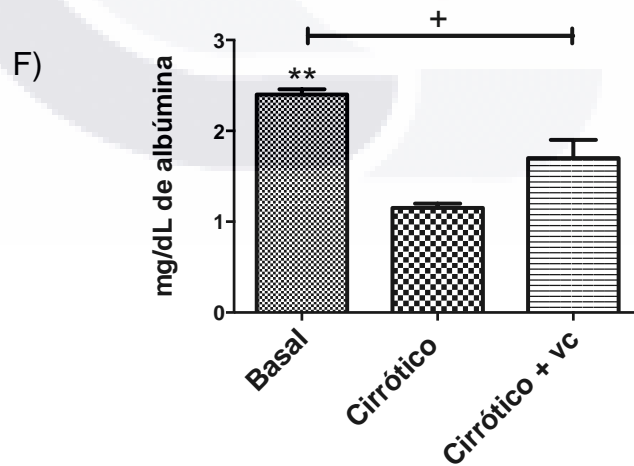


Figura 22. Proteínas en suero post inducción de cirrosis en los grupos cirrótico, cirrótico + vehículo (vc) y basal. El grupo cirrótico presenta una disminución en la síntesis de albumina con respecto al grupo basal (** $p < 0.01$) al igual que el grupo cirrótico + vc (+ $p < 0.05$). Por otro lado la síntesis de esta proteína no parecen tener diferencias significativas entre los grupos cirrótico y cirrótico + vc.

c) Comparación de la recuperación de la función hepática con los tratamientos en comparación con la reversión endógena.

Por otra parte al aplicar los tratamientos se demuestra una disminución en la concentración en suero de las enzimas transaminasas de los grupos Carvedilol y Doxazosina con respecto al grupo cirrótico + vc principalmente ALT, disminuyendo hasta en un 50%, y una mejora con respecto a grupo basal.

En el caso de la AST solo el Carvedilol presentó una disminución en su concentración en suero mientras que el grupo tratado con Doxazosina la disminución no fue tan pronunciada. Esto puede observarse en los siguientes gráficos.

Concentración de transaminasas (AST y ALT) post-inducción de etapa avanzada de cirrosis. En la gráfica A puede observarse una comparación entre la concentración de enzima en los grupos basal, Doxazosina y Carvedilol con respecto al grupo cirrótico, la concentración de enzima de los tres grupos se ven disminuidos significativamente (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$), las concentraciones de los tratamientos Doxazosina y Carvedilol con respecto al grupo basal estadísticamente no tiene diferencias significativas (+ $p < 0.05$), lo que nos indica una mejora en la estructura del parénquima hepático.

Por otro lado para las concentraciones de AST (gráfica B) nos muestra de igual manera diferencias significativas tanto en el grupo basal (** $p < 0.01$) como en el tratamiento Carvedilol con respecto al grupo cirrótico + vc con

una evidente disminución de esta enzima, sin embargo, el grupo Doxazosina parece no disminuir significativamente en comparación con las concentraciones del grupo cirrótico + vc.

El único tratamiento que estadísticamente es semejante a nuestro grupo basal es el Carvedilol para esta enzima.

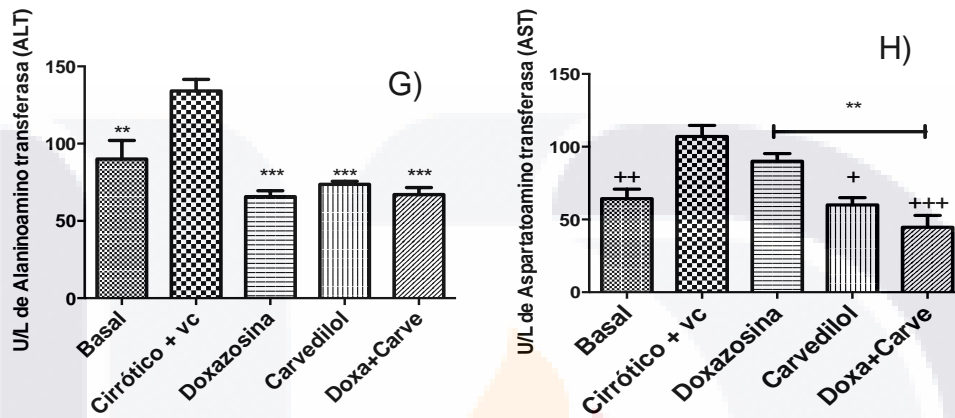


Figura 23. Proteínas en suero post inducción de cirrosis en los grupos cirrótico, cirrótico + vc y basal.

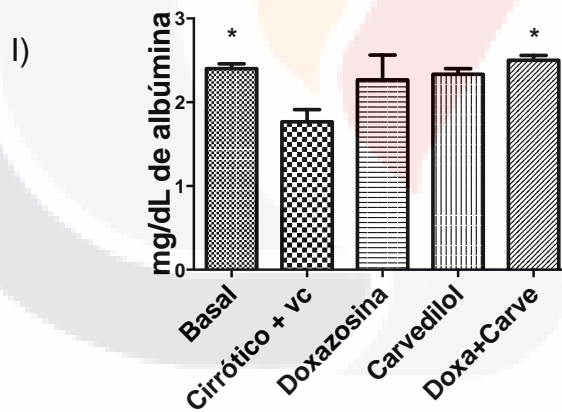
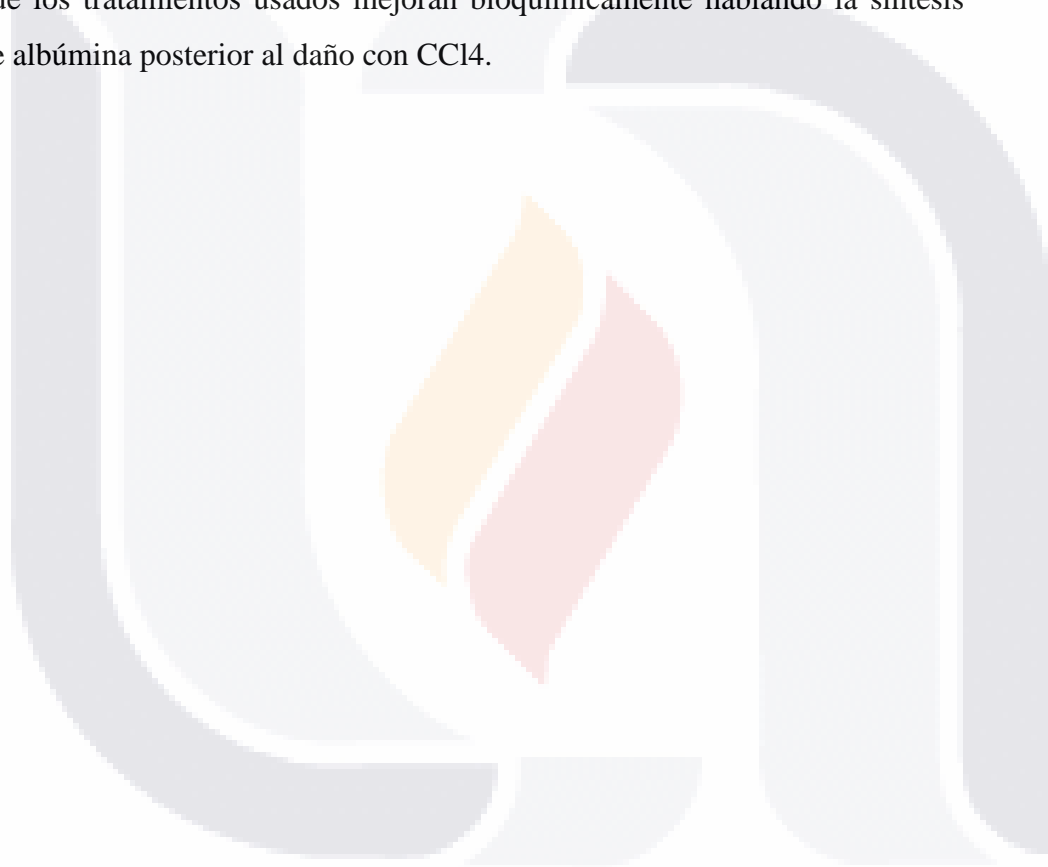


Figura 24. Proteínas en suero post inducción de cirrosis en los grupos cirrótico, cirrótico + vc y basal.

El gráfico presenta la concentración de albúmina en hámsteres con y sin inducción de cirrosis así como los tratamientos en este ANOVA se compara el cirrótico + vc con el grupo basal y los tratamientos los cuales como puede observarse presentan diferencias significativas con un ($*p<0.05$) en la concentración de proteína, disminuida en el grupo dañado con CCL4, por otro lado la comparación entre el grupo que este basal con los grupos tratados no presentan diferencias significativas entre sí, lo cual nos indica que los tratamientos usados mejoran bioquímicamente hablando la síntesis de albúmina posterior al daño con CCl4.



Evaluación histológica de los tejidos problema

Con la finalidad de identificar las células inflamatorias, la morfología general del parénquima, la síntesis y almacenamiento de glucógeno y el acúmulo de fibras de colágena en el tejido hepática se desarrollaron tinciones de H&E, PAS y Rojo Sirio.

Tinción de Hematoxilina eosina (H&E)

Análisis toxicológico de los propios tratamientos sobre el hígado sano.

La tinción de hematoxilina eosina para los grupos tratados con Carvedilol sin inducción de cirrosis presentan una estructura y coloración propia de un hígado sano desde la zona 3 hasta la zona 1, descartando daño causado por la administración del solo medicamento, por otro lado el tratamiento con Doxazosina parece ejercer un daño a nivel celular a manera de vacuolización en la zona 2 principalmente (flecha negra), probablemente causado por la recirculación enterohepática que presenta este medicamento.



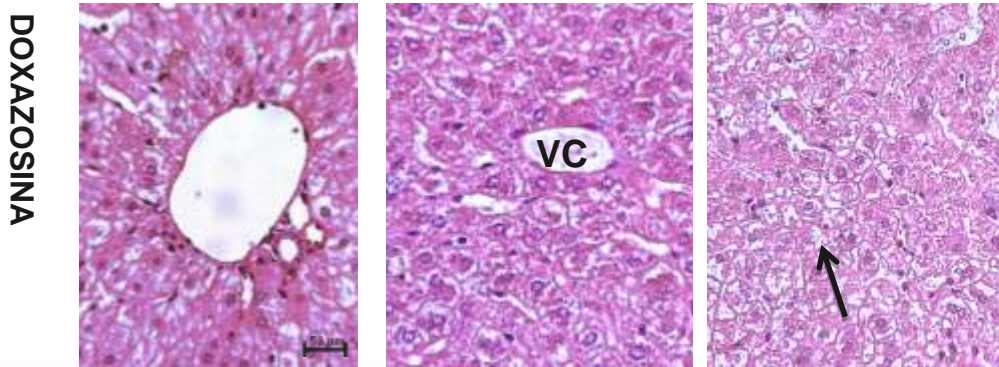


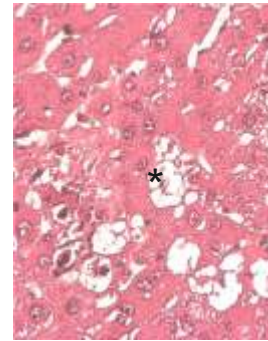
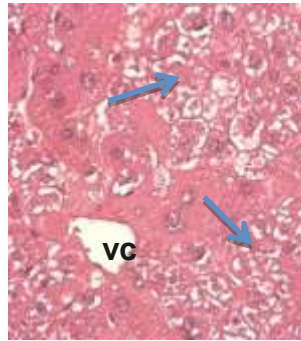
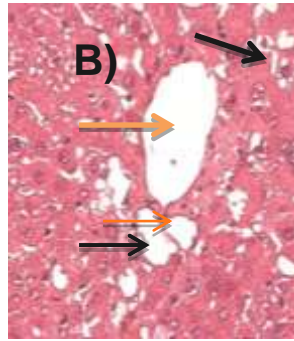
Figura 25. Cortes histológicos de hígados tratados sin inducción de cirrosis hepática con CCl4 teñidos con hematoxilina-eosina.

En cada uno de los tratamientos se tomaron las tres principales zonas hepáticas con importancia en el daño causado por el fármaco. Las imágenes Figura 26-A correspondientes a un hígado sano presentan en todas las zonas una población característica, cordones de hepatocitos bien formados y definidos. En los cortes correspondientes a un hígado cirrótico Figura 26-B, puede observarse el daño en todas las zonas, la zona 1 presenta una disgregación de la zona porta (flechas amarillas y flechas negras), algunos hepatocitos también se observan parcialmente disgregados, la zona 3 zona con mayor índice de daño con aparente aumento en el número de hepatocitos con degeneración hialina de Mallory (flechas azules), una vacualización del tipo 1 por el tipo de zona que se trata, la zona 2 presenta un aumento en los focos de hepatocitos disgregados rodeados con aparentes vacuolas esféricas blancas con contorno poco definido como vacuolas de grasa (*), los hígados cirróticos con el vehículo Figura 26-C tanto la zona 1 como la zona 3 presentan infiltración de polimorfonucleares (flechas naranja), la zona 3 en específico presenta un opacamiento en la coloración de la tinción aparentemente por la presencia de fibras de colágena (flecha negra), la zona 2 presenta una vacualización y balonización de hepatocitos del tipo 2, posiblemente debido a la degeneración hialina de Mallory en algunos de los hepatocitos disgregados (flechas azules).

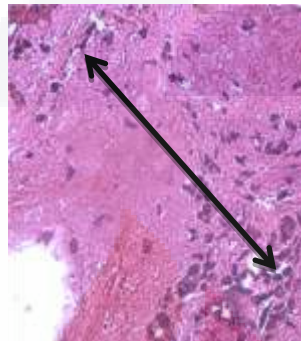
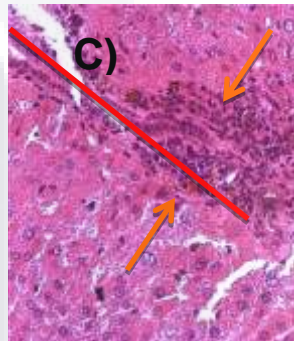
Los cortes de hígados de hámsteres tratados con Carvedilol Figura 26-D como tratamiento presentan una mejora en la estructura morfológica con el número de cordones de hepatocitos bien formados una pérdida de la vacualización además de la ausencia de infiltrados inflamatorios en las tres zonas, presenta una semejanza más cercana a los cortes de hígados de animales sanos en comparación de los cortes de hígados de hámsteres tratados con Doxazosina Figura 26-E los cuales presentan aun vacualización de tipo 2 mediozonal (flechas verdes), además de la presencia de algunos focos inflamatorios en la zona 1 o zona porta. La sinergia Figura 26-F de los tratamientos presentan una mejora aumentada en comparación con los tratamientos individuales, los cordones radiales de hepatocitos bien establecidos rodeados por sinusoides vasculares, lo que le proporciona al hígado poblado una apariencia sana, se observa la presencia de glóbulos rojos en los vasos como la zona porta (flecha roja) y la vena central (VC) lo que nos muestra una actividad portal activa.



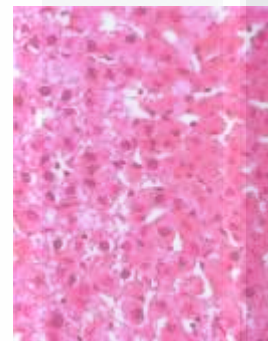
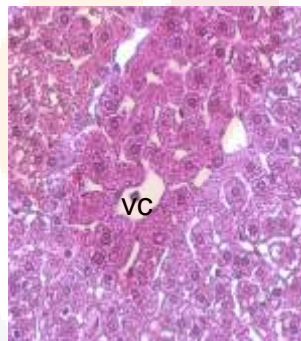
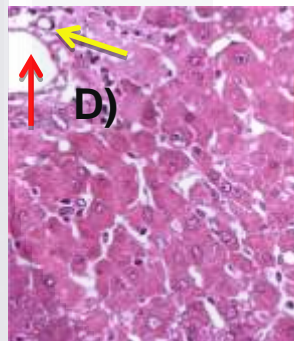
CIRRÓTICO



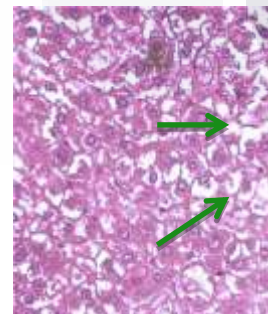
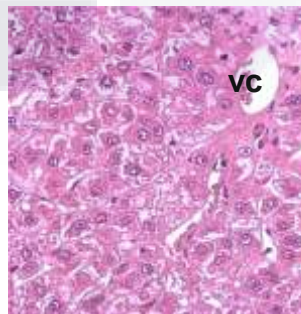
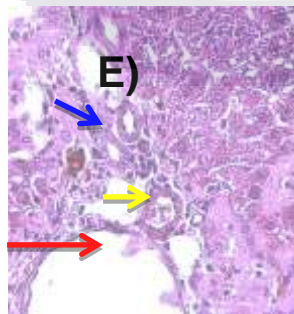
CIRRÓTICO+VC



CARVEDILOL



DOXAZOSINA



DOXA+CARVE

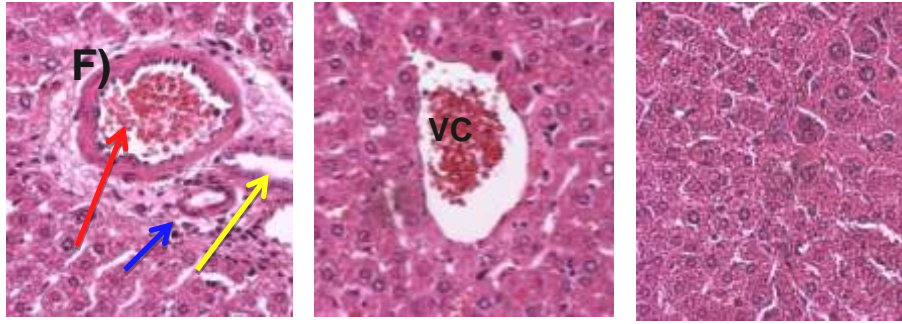


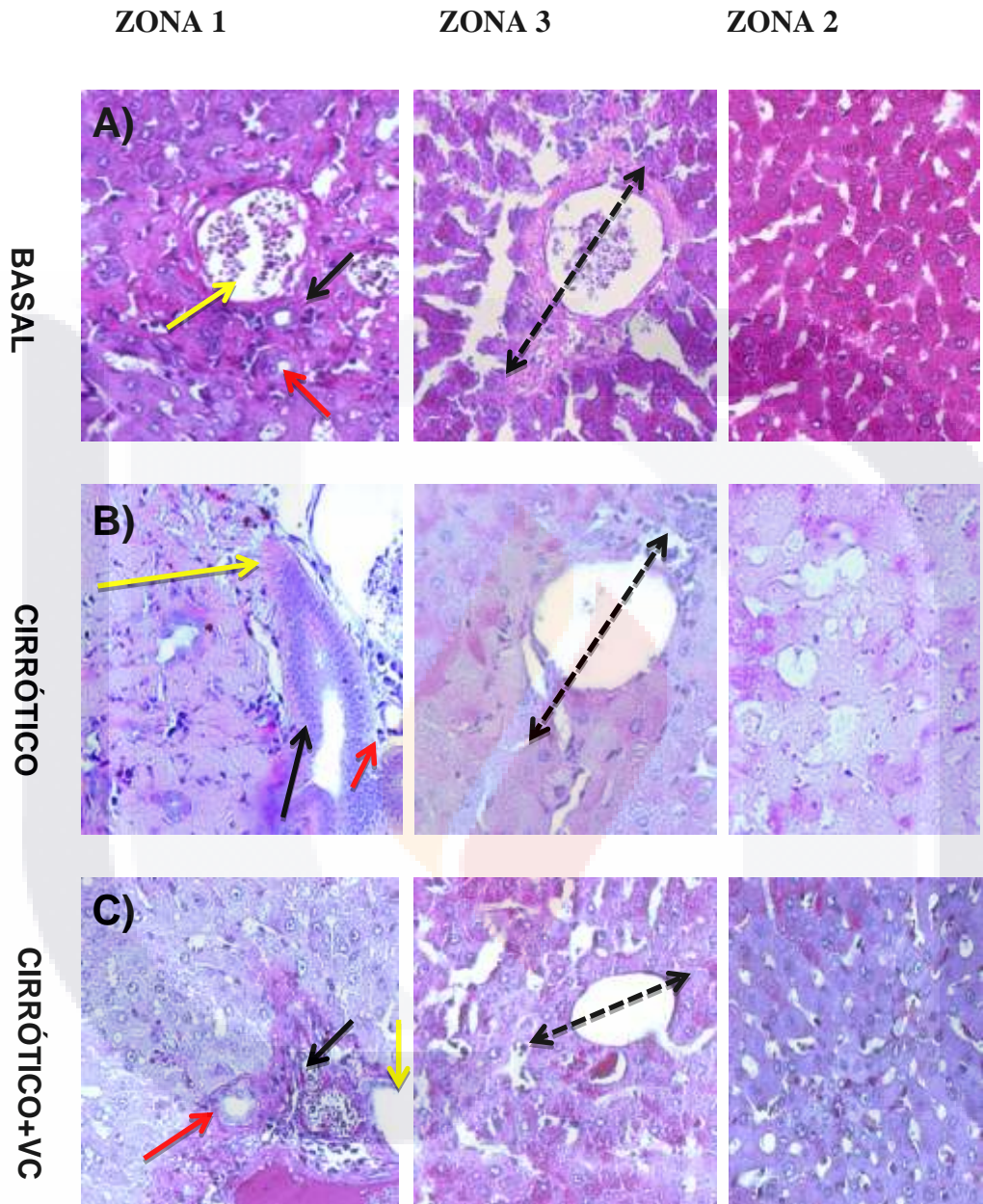
Figura 26. Cortes histológicos de los hígados teñidos con hematoxilina-Eosina.

Tinción de PAS

La tinción de PAS se emplea para determinar la presencia de moléculas como el glucógeno, molécula almacenada en el citoplasma de los hepatocitos, en la tinción puede observarse la reacción de la leucofucsina con los grupos aldehídos de los componentes celulares dejando una tinción de rojiza a violeta.

Las imágenes de la figura 27-A correspondientes a un hígado sano (basales) muestran una coloración intensa en los hepatocitos, lo que nos indica la presencia de glucógeno en el citoplasma, ya que éste se deposita inicialmente en estas células, principalmente en regiones donde llega la circulación venosa como lo es la zona 3.

Los cortes de hígado cirrótico Figura 27-B presentan una disminución en la concentración de glucógeno en el citoplasma de los hepatocitos en las 3 zonas, afectando una de las principales funciones hepáticas, el procesamiento y la redistribución de la glucosa en el organismo. Los cortes correspondientes a los hígados cirróticos con el vehículo (vc) Figura 27-C presentan una mejora en la cantidad de glucógeno en el citoplasma de los hepatocitos (manchas rosas) principalmente en las zonas 2 y 3 donde se observa una mayor cantidad de tinte, los tratamientos Carvedilol Figura 27-D y Doxazosina Figura 27-E también presentan una mayor cantidad de almacenamiento de glucógeno en comparación con nuestro grupo basal, la sinergia Figura 27-F tiene una mejora en la respuesta a la función de almacenamiento de este polisacárido en las células observando una coloración intensa en forma de gránulos dentro del citoplasma (morado).



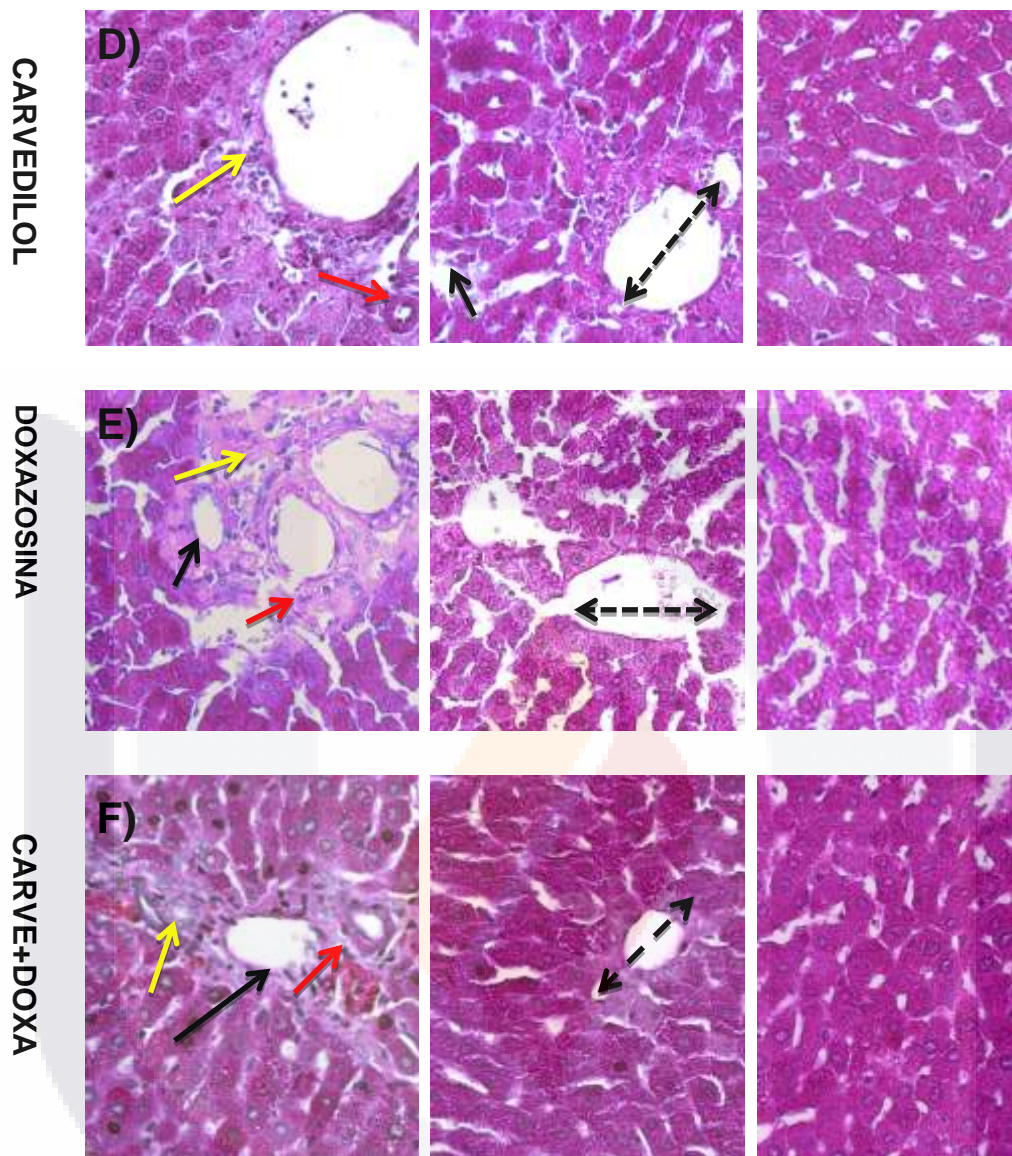
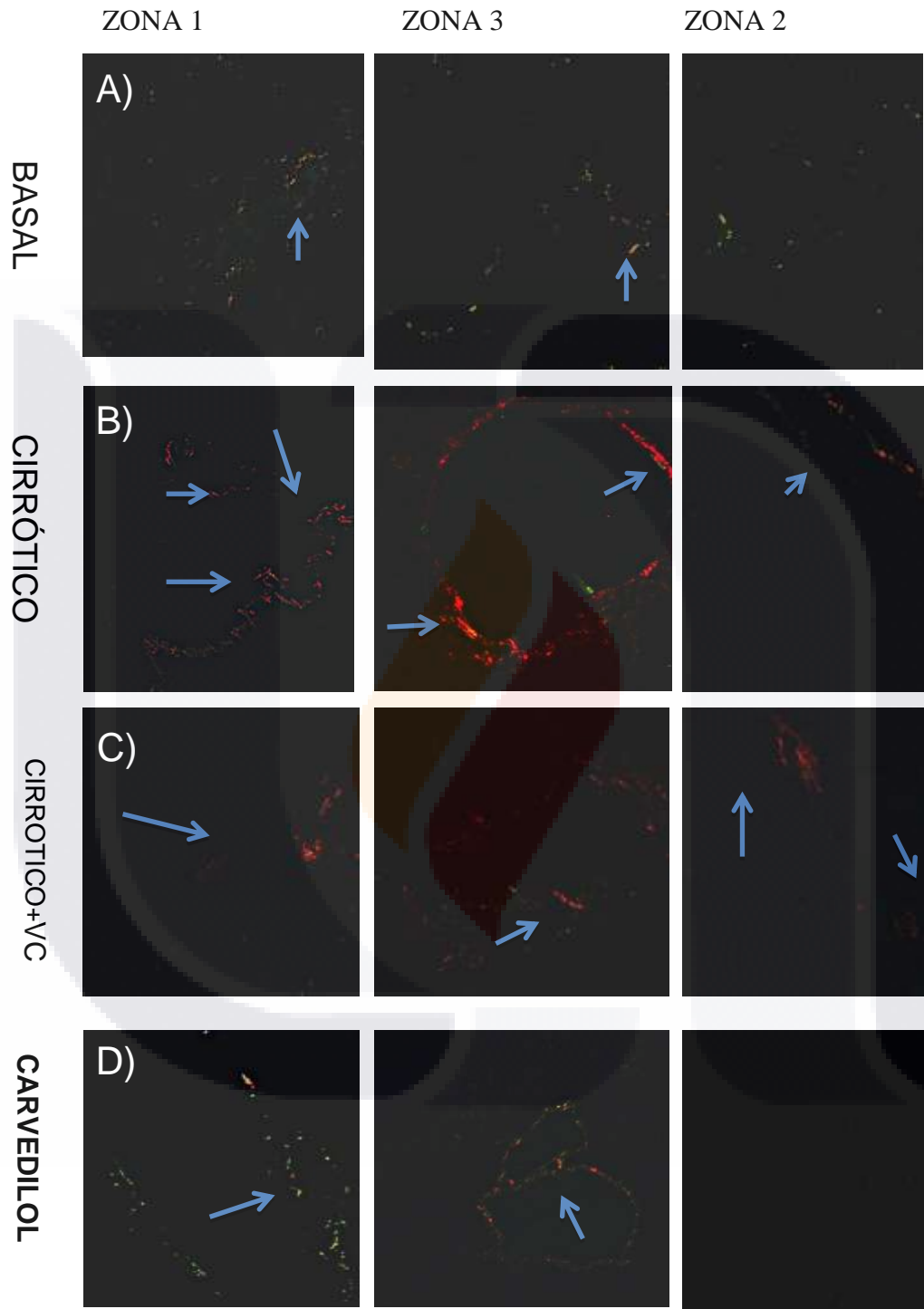


Figura. 27. Cortes histológicos de los hígados con la tinción de PAS.

Tinción rojo sirio

La tinción rojo sirio muestra la expresión de colágeno principalmente colágena del tipo 1 y tipo 3 alrededor de los principales vasos (zona 1 y zona 3) de la figura 28.

Las imágenes del Figura 28-A correspondientes a un hígado sano (basal) se muestran las 3 zonas importantes en el daño, con una cantidad de mínima colágena (flechas) del tipo 1 (color rojo) y del tipo 3 (color verde), en comparación con los cortes de hígado cirrótico Figura 28-B, donde puede apreciarse un incremento en el tejido fibroso y en el depósito de colágena (flechas) en la zona 1 (zona porta), las fibras de colágena el tipo 1 tienen un mayor predominio en la zona 3 (vena central), mientras en la zona 2 la colágena se presenta extracelularmente rompiendo la morfología de los cordones de hepatocitos, esto en comparación con los cortes de hígado cirrótico con el vehículo Figura 28-C el daño es mayor ya que este último grupo presenta una mejora en la disminución de las fibras de colágena del tipo 1 principalmente en la zona 1 (zona porta) y la vena central (zona 3), pero un aumento en la zona 2. Este grupo cirrótico con vehículo Figura 28-C en comparación con los tratamiento Carvedilol Figura 28-D y Doxazosina Figura 28-E muestran un daño más pronunciado en las 3 zonas, Carvedilol tiene un incremento de colágena de tipo 3 tanto en la zona porta como en la zona centrolobulillar y ausencia de ésta en la zona 2. Hay una mayor incidencia de colágena del tipo III en la sinergia Figura 28-F de los tratamientos en las 3 zonas principalmente la zona 1 y la zona 3, lo que indica una mejora en la estructura y en la posible función celular con la recuperación de la comunicación y contractibilidad de los hepatocitos.



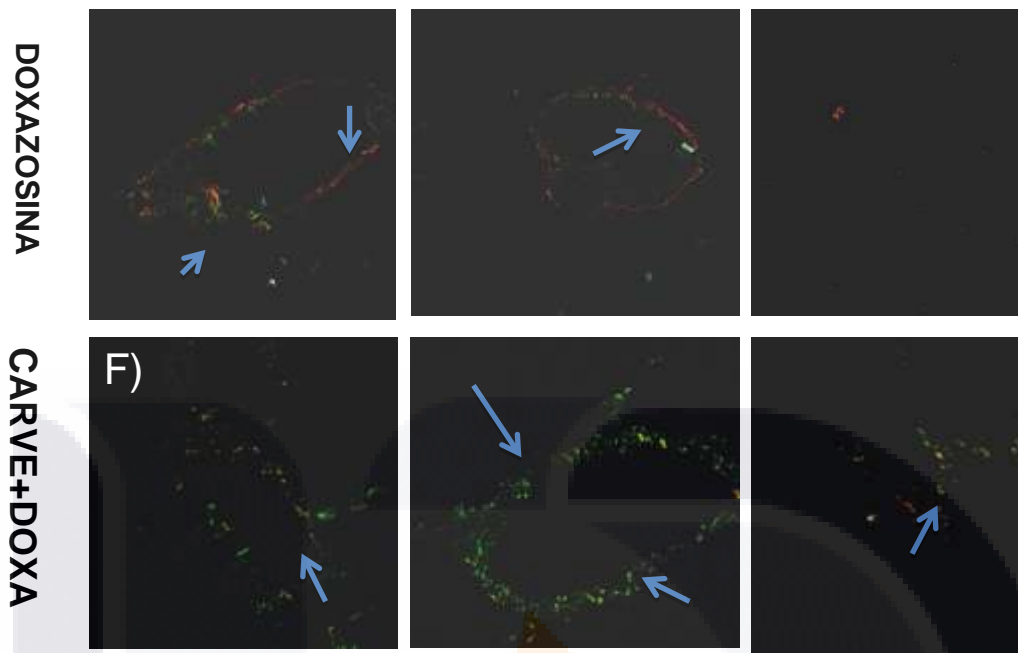


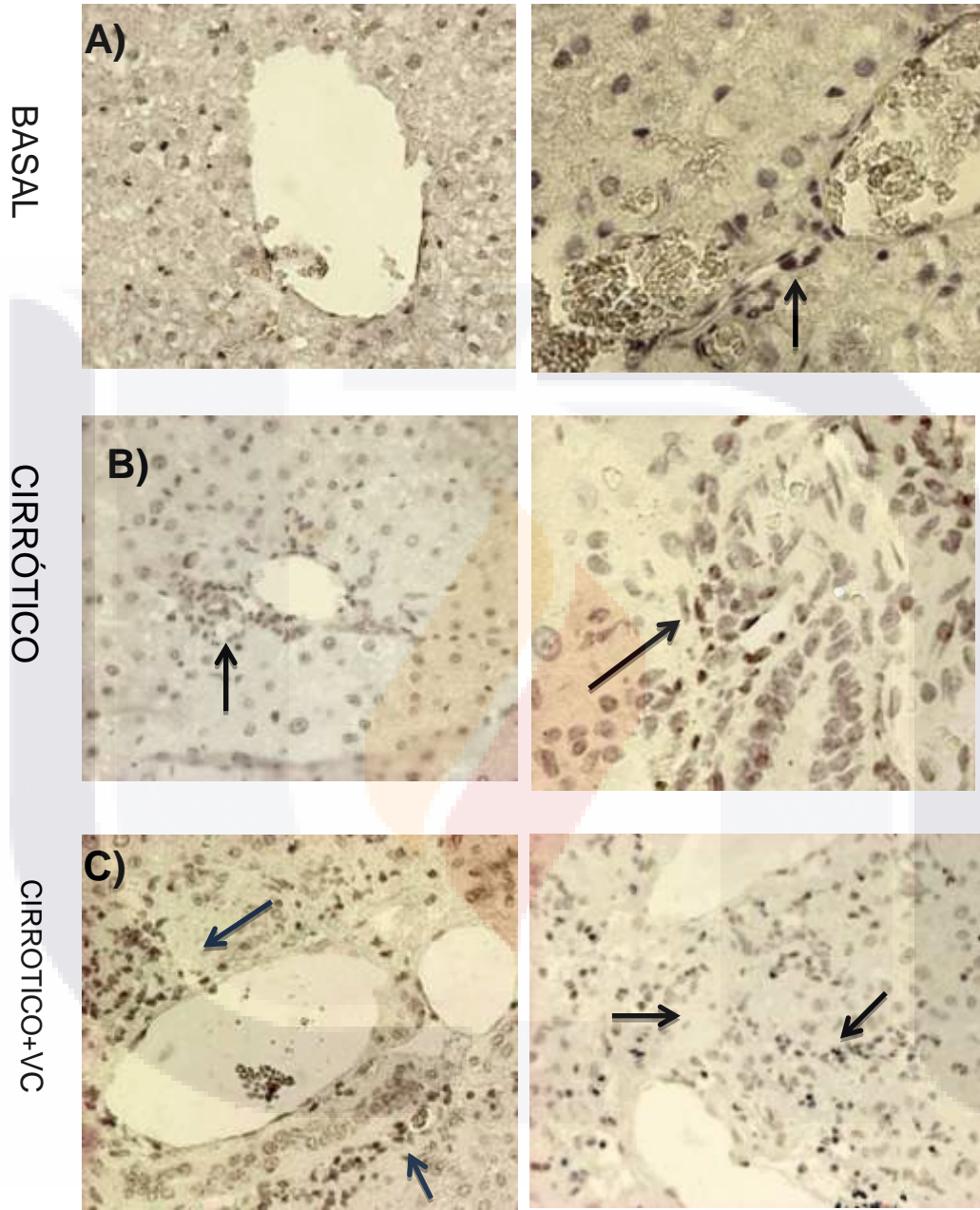
Figura 28. Evaluación del depósito de colágena (tinción rojo sirio) vista en microscopio de luz polarizada.

Determinación de la actividad proliferativa de células del parénquima hepático. Células madre CD90 (+) y Hepatocitos Ki67 (+).

Inmunohistoquímica para identificar células CD90 (+)

Las imágenes en la Figura 29-A correspondientes al grupo basal se observa poca celularidad positiva (fecha negra) a el marcador de superficie CD90 en comparación con los grupos Carvedilol Figura 29-D y Doxazosina Figura 29-E quienes presentan una positividad celular más pronunciada (células con coloración café, flechas), se observa una acumulación en la zona porta principalmente ya que esta es la zona donde se lleva a cabo la activación de las células progenitoras llevando a cabo la proliferación de las células ovas, la sinergia Figura 29-F de estos dos tratamientos también presenta una población de estas células (circulo punteado). Los grupos cirrótico Figura 29-B y cirrótico más vehículo Figura 29-C las células que presentan positividad para este marcador son pocas en comparación con los tratamientos.

CD90



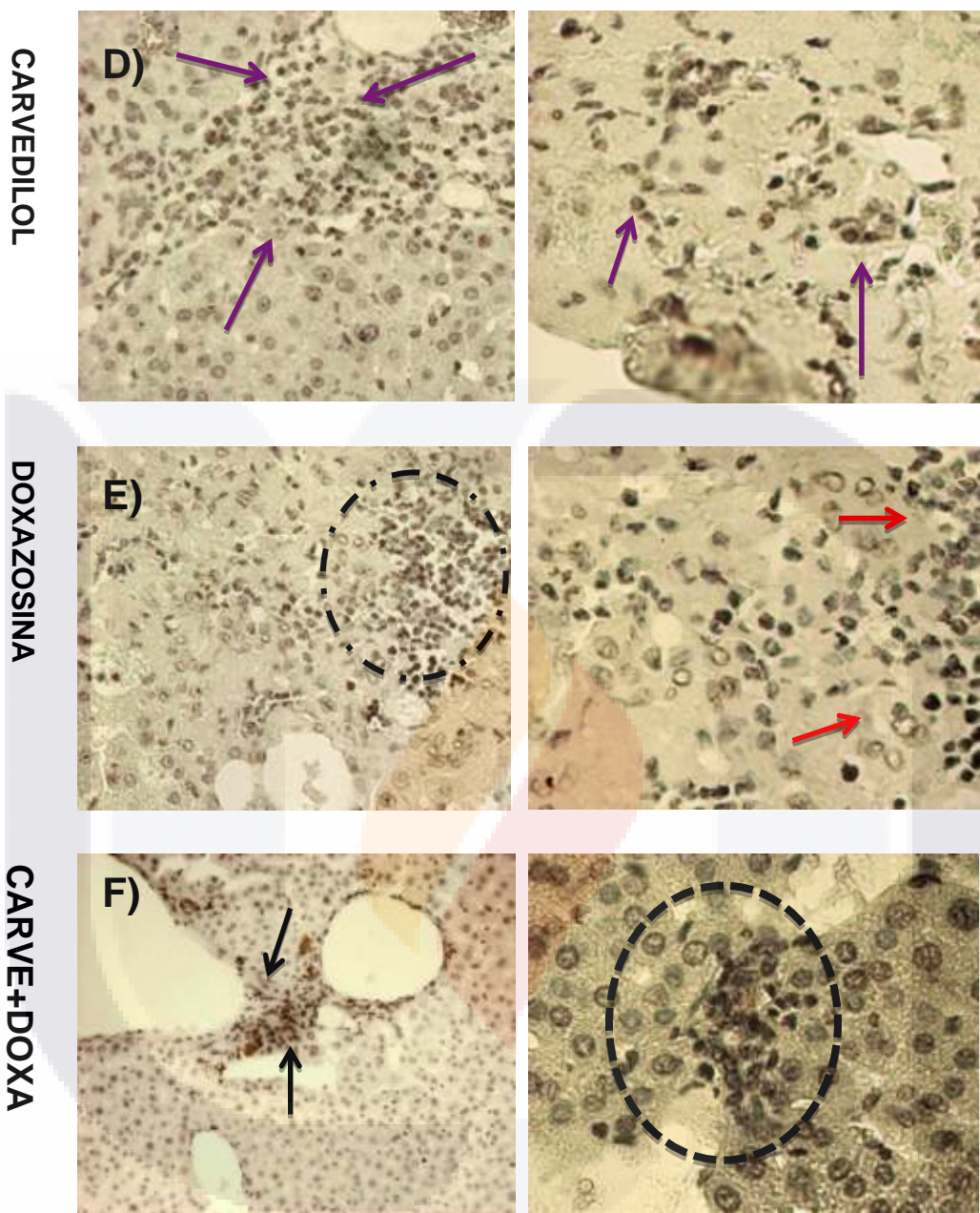
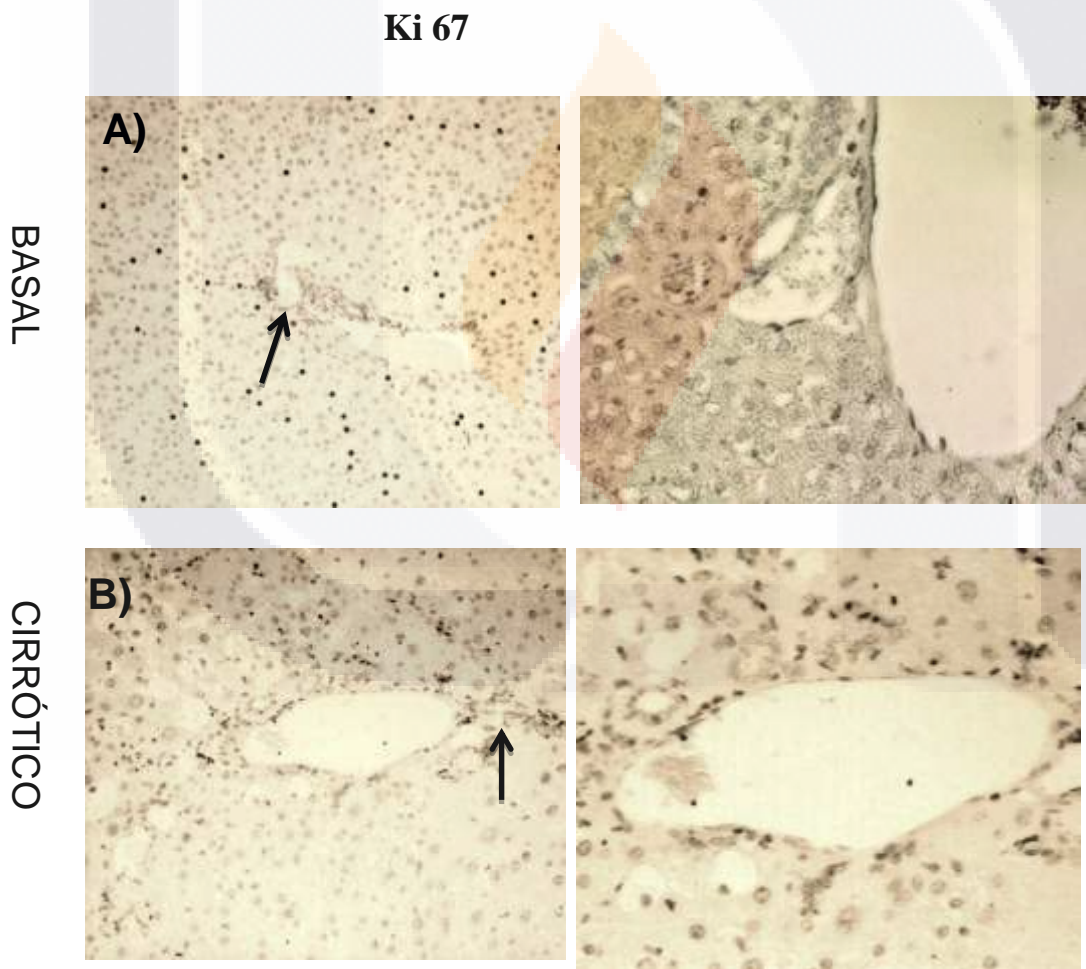


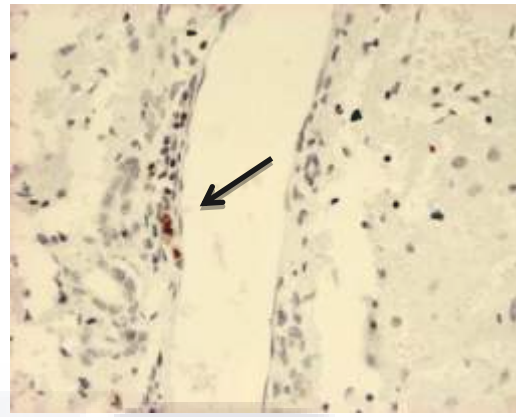
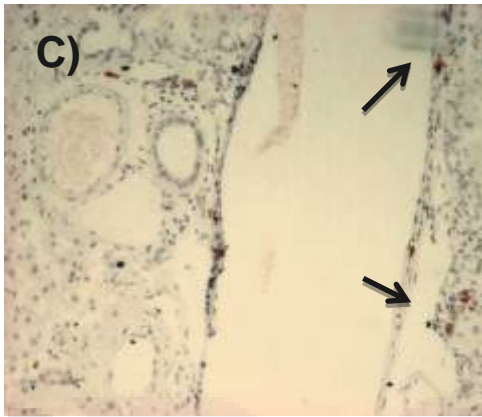
Figura 29. Inmunohistoquímica con CD 90. Las imágenes de la izquierda presentan unos aumentos 10X la derecha 20 X.

Inmunohistoquímica para identificar células Ki67 (+)

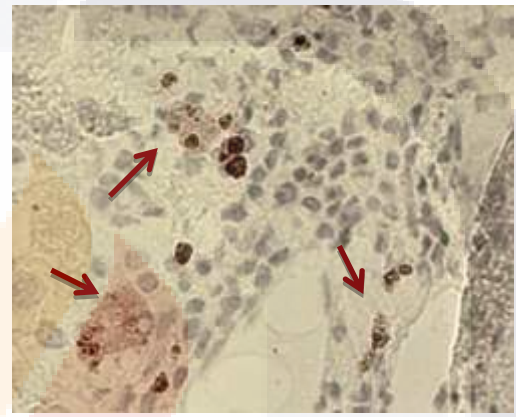
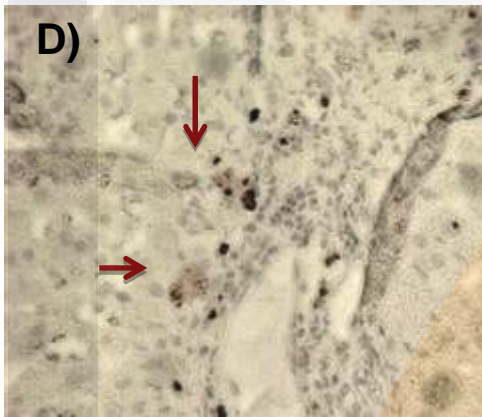
Las imágenes de la Figura 30-A correspondientes al grupo basal, no presentan positividad a la proteína, sin embargo, la proteína solamente se presentó en los tratamientos Carvedilol Figura 30-B y Doxazosina Figura 30-C así como su sinergia de los tratamientos Figura 30-D, con la presencia del anticuerpo en el citoplasma de algunas células (manchas cafés, indicados con flechas y líneas punteadas) distribuidas en la zona porta de los tejidos.



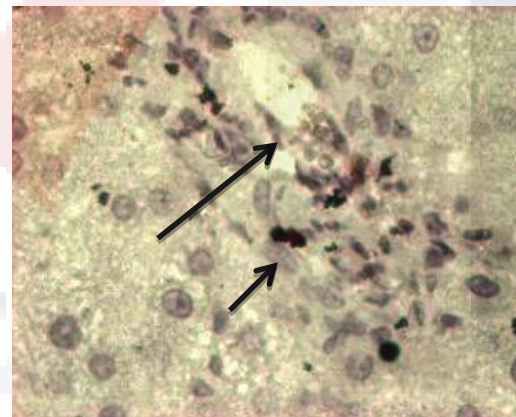
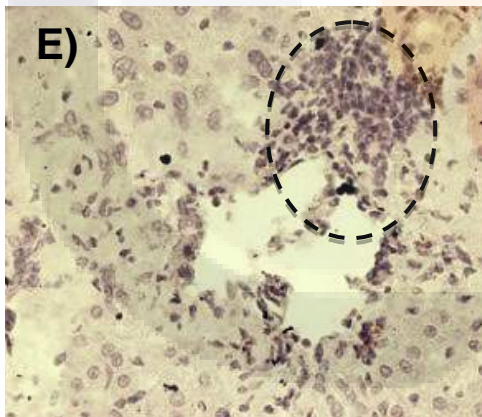
CIRROTICO+VC



CARVEDILOL



DOXAZOSINA



CARVE+DOXA

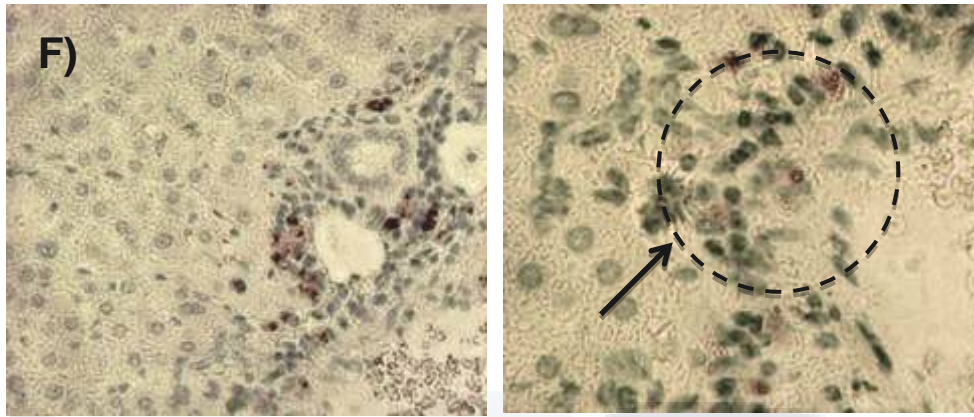


Figura 30. Inmunohistoquímica de células reactivas a Ki67.

Cuantificación de células positivas de las proteínas CD90 Y Ki67.

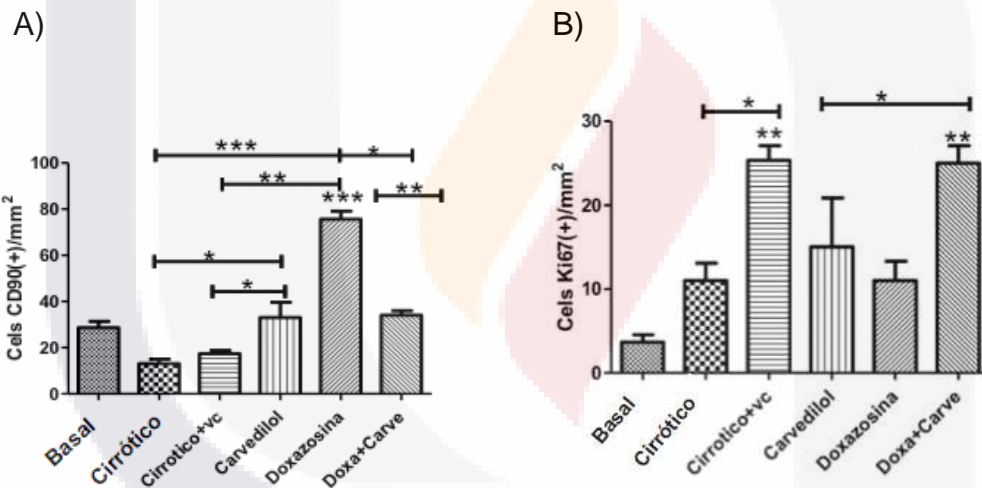


Figura 31. Análisis cuantitativo de células positivas a las proteínas CD90 y Ki67. Para la proteína CD90 (inciso A) como puede observarse el grupo que tiene una mayor presencia de células positivas es el tratamiento con Doxazosina e incluso en comparación con el grupo Doxa+carve quienes presentan diferencias significativas con una $p < 0.01$ (**), en lo que respecta a los demás grupos, el grupo cirrótico y cirrótico +vc son quienes tiene un número menor de células positivas, tanto el grupo Carvedilol como la sinergia doxa+ carve no presentan diferencias significativas con respecto al grupo basal. Para la proteína Ki67 (inciso B) tanto el grupo cirrótico + vc y el grupo Doxa+Carve presentaron un número elevado de células positivas a esta proteína, es decir, una

reacción ductular aumentada en comparación con los grupos cirrótico, Carvedilol y Doxazosina $p < 0.05$ (*), e incluso en comparación con el grupo basal quienes presentan un numero bajo de células en la zona porta positivas a Ki67 $p < 0.01$ (**).

Índice de actividad histológica.

| Hámster | Necrosis Periportal | Apoptosis | Inflamación portal | Fibrosis | Índice de Knodell | Proliferación | Vacuolización (Grado) |
|--------------|---------------------|-----------|--------------------|----------|-------------------|---------------|-----------------------|
| B1 | 0 | NO | 0 | 0 | 0 | + | - |
| B2 | 0 | NO | 0 | 0 | 0 | + | - |
| B3 | 0 | NO | 0 | 0 | 0 | + | - |
| C1 | 3 | SI | 3 | 3 | 0.409 | + | II |
| C2 | 3 | SI | 3 | 4 | 0.455 | + | II |
| C3 | 1 | SI | 2 | 3 | 0.272 | + | III |
| C+VC1 | 1 | SI | 3 | 1 | 0.227 | ++ | II |
| C+VC2 | 2 | SI | 3 | 3 | 0.363 | + | II |
| C+VC3 | 2 | SI | 3 | 2 | 0.318 | ++ | II |
| CA1 | 0 | NO | 1 | 0 | 0.045 | +++ | - |
| CA2 | 0 | NO | 0 | 0 | 0 | +++ | - |
| CA3 | 0 | NO | 1 | 0 | 0.045 | +++ | - |
| DX1 | 1 | SI | 1 | 1 | 0.136 | ++ | II |
| DX2 | 0 | NO | 1 | 0 | 0.045 | +++ | II |
| DX3 | 0 | NO | 0 | 0 | 0 | +++ | I |
| DX+CA | 0 | NO | 0 | 0 | 0 | +++ | - |
| 1 | | | | | | | |
| DX+CA | 0 | NO | 0 | 0 | 0 | +++ | - |
| 2 | | | | | | | |
| DX+CA | 0 | NO | 0 | 0 | 0 | +++ | - |
| 3 | | | | | | | |

Tabla 4. Características macroscópicas observadas durante el proceso de inducción: B: Basal; C; cirrótico; y aplicación de los tratamientos : C+CV; Cirrótico + vehículo; CA: Carvedilol; DX: Doxazosina; DX+CA: Doxazosina + Carvedilol. Necrosis periportal: 0: No

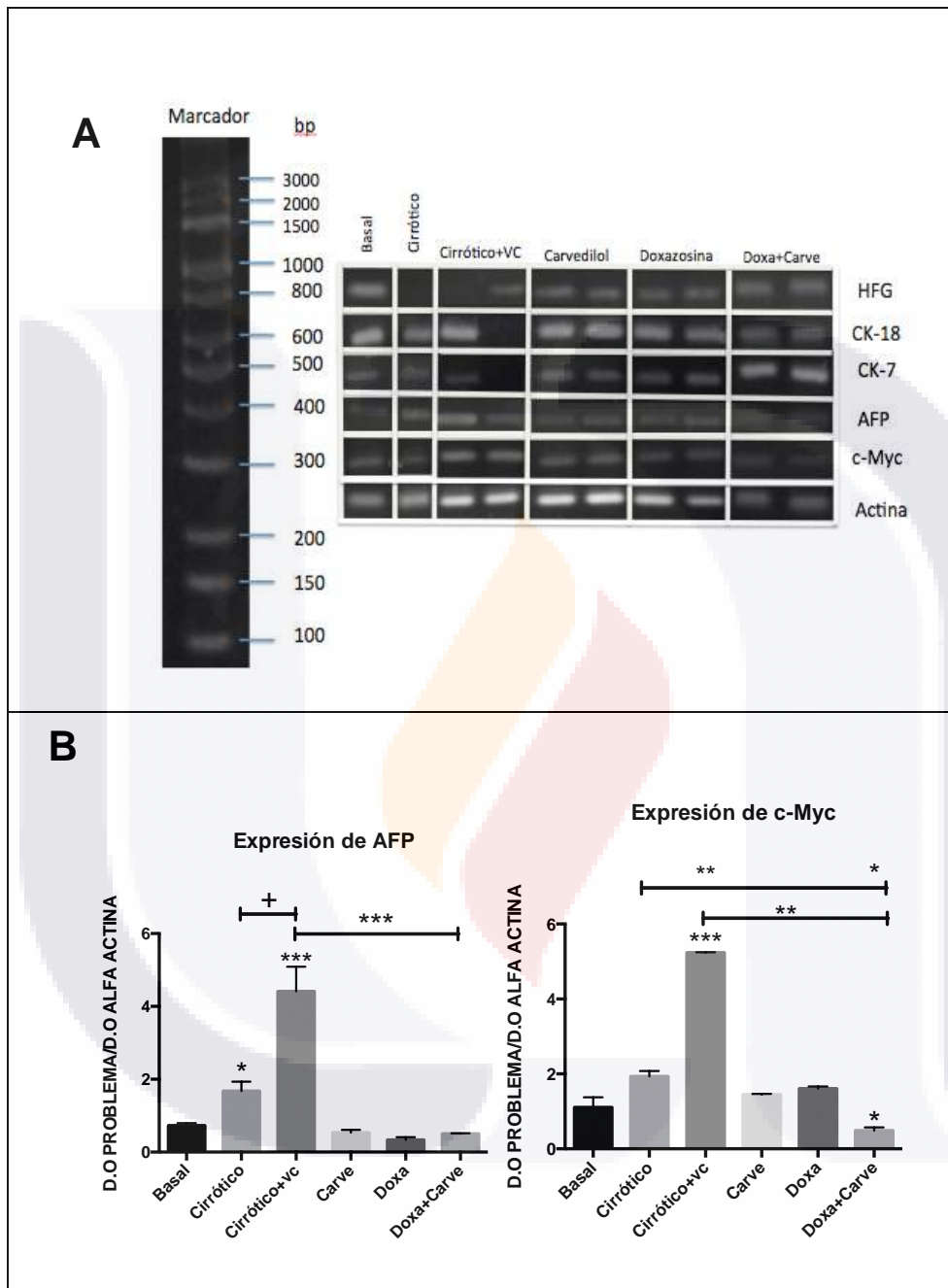
necrótico; 1: necrosis fragmentaria ligera; 3: necrosis fragmentaria moderada (<50% de la circunferencia del espacio porta). Inflamación portal: 0: No; 1: Mínima (inflamación <1/3 del espacio portal); 3: Moderada (Inflamación 1/3-2/3 del espacio porta). Proliferación: +; Presencia de células proliferativas 1/3 de 1 espacio porta visto a 200X; ++; Presencia de células en proliferación en 2/3 del espacio porta visto a 200X; +++; presencia de células en proliferación rodeando todo el espacio porta visto a 200X. Fibrosis: 0: No; 1 Expansión fibrosa del espacio porta; 3: Fibrosis porto portal o porto-centrolobulillar; 4; cirrosis. Índice de actividad histológica de Knodell (Knodell, et al., 1981)

Grado de vacuolización: 0: ausente; I: comprende el 25% aprox. Del total de los hepatocitos que conforman el acino hepático (zona pericentral). II: comprende del 25 – 50% de los hepatocitos que constituyen el acino hepático (zona periportal y medio zonal. III: vacuolización difusa, comprende la totalidad del acino hepático (Robbins & Abbas., 2008).

Expresión de marcadores en regeneración hepática

Mediante el uso de PCR y el programa imagen J se evaluó semi cuantitativamente la expresión de algunos marcadores presentes en la regeneración hepática de hámsteres cirróticos, la expresión de alfa actina fungió como el control endógeno de la expresión. La expresión de cada marcador fue determinado por densitometría mediante un documentador digital imagen J, los valores se expresaron en unidades arbitrarias obtenidos con el análisis de la densidad óptica de los productos de la PCR de los marcadores, la media y desviación estándar de 3 diferentes valores fueron divididos con respecto a la densidad óptica de nuestro control endógeno alfa actina.

Las siguientes imágenes muestran los geles de agarosa de cada marcador así como el análisis estadístico con prisma 6.



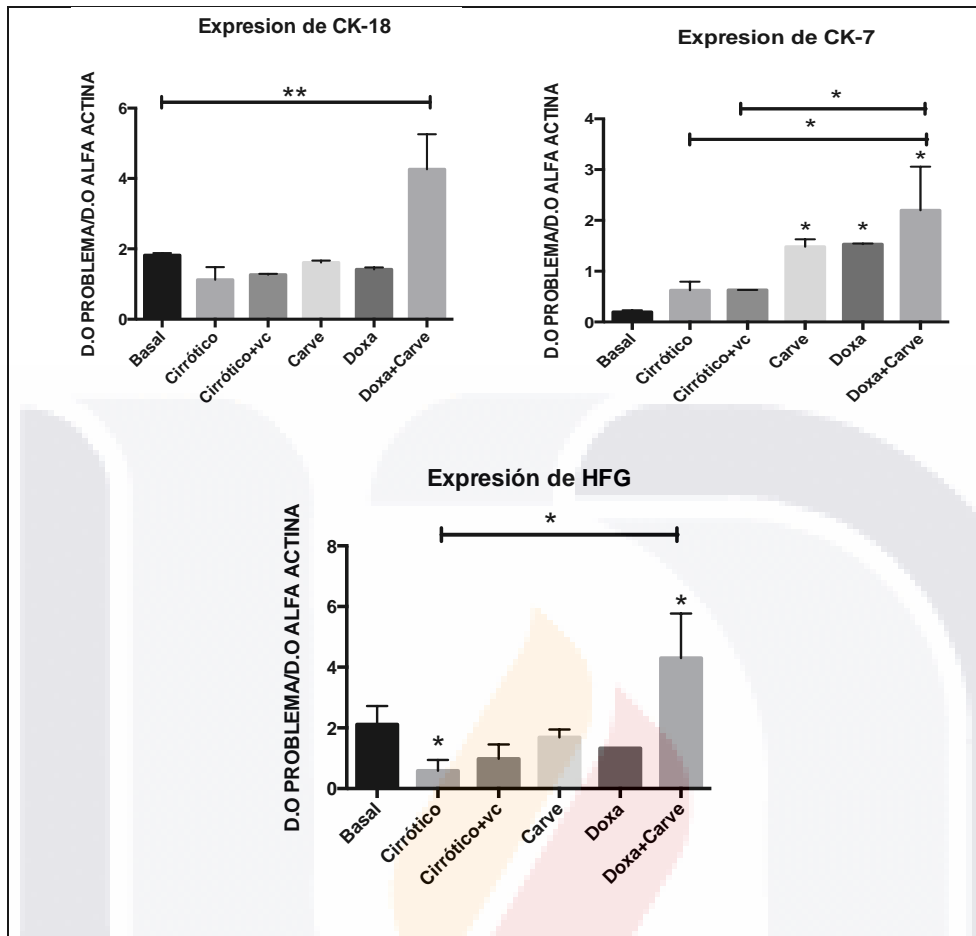



Figura 32. Evaluación semicuantitativa por PCR de la expresión de marcadores importantes de la regeneración de un hígado cirrótico. **A.** Marcador de peso molecular. **B.** Expresión de marcadores gel de agarosa 2.5%. **C.** Densidades ópticas de los marcadores por tratamiento.

En las imágenes anteriores puede observarse los resultados de la PCR en geles de agarosa revelados con bromuro de etidio junto con sus gráficas donde se muestran la relación entre nuestro control de actina y cada uno de los marcadores problema. En la Figura 32-A se muestra la expresión de los marcadores c-myc, AFP en todos los grupos mientras que las citoqueratinas y el factor de crecimiento de hepatocito de muestra ausente en el grupo cirrótico+vc, lo cual en comparación con la cuantificación de su expresión vista en la Figura 32-B los grupos cirrótico y cirrótico+vc expresan predominantemente los oncogenes c-myc y AFP lo que nos describe una

daño relacionado con el nivel de inflamación o daño a nivel de los hepatocitos con respecto al transporte de diversas sustancias como son hormonas no esteroideas, iones, bilirrubina e incluso ácidos grasos no esterificados, además de la pérdida de arreglos arquitectónicos normales; caso contrario de los tratamientos Carvedilol, Doxazosina y Doxa+Carve quienes expresan en predominancia las citoqueratinas y el factor de crecimiento hepático; datos semejantes a las pruebas función hepática y el restablecimiento de la arquitectura histológica vistas con anterioridad.





CAPITULO V
DISCUSIONES

V.I DISCUSIONES

En el presente trabajo exploramos el papel de los antagonistas alfa y beta adrenérgicos (Doxazosina y Carvedilol) en la regeneración de hígados cirróticos, donde se encontraron hallazgos importantes tales como: 1). El restablecimiento de la función hepática en los grupos tratados, principalmente en el grupo doxa+carve los cuales presentan una mejora pronunciada en comparación de los tratamientos individuales y el basal. 2). Restablecimiento histológico analizado mediante las tinciones HE, rojo sirio y PAS, para la tinción HE los tratamientos en sinergia presentaron una mejora en comparación con los grupos cirrótico y cirrótico mas vehículo con la disminución de los nódulos inflamatorios, la pérdida de la degeneración vacuolar, e infiltrados inflamatorios. En Rojo sirio los tratamiento presentaron una disminución de los septos fibrosos con colágena del tipo I y aumento de colagena tipo III, en comparación de los grupos cirrótico y cirrótico mas vehículo. La síntesis de glucógeno fue analizada con la tinción de PAS donde los grupos con mayor síntesis de este polisacárido fueron los grupos Doxazosina y Carvedilol en comparación de los grupos cirrótico y cirrótico mas vehículo. 3). La presencia de células positivas a Ki67 y CD90 mostraron una clara proliferación celular en el área periportal principalmente en los tratamientos Doxazosina y Carvedilol y en mayor incidencia los tratamientos juntos Doxa+Cave en comparación con los grupos cirrótico, cirrótico + vc e incluso el grupo basal. 4). La expresión de marcadores específicos de regeneración del tejido hepático, de acuerdo con los resultados los tratamientos Doxazosina y Carvedilol y Doxa + Carve presentan expresión de citoqueratinas 7 y 18 así como el HGF y en menor expresión el cMyc (oncogen) como AFP en comparación con los grupos cirrótico y cirrótico + vc, muy similar a grupo basal.

En el análisis de la función hepática, las transaminasas presentaron niveles elevados en los grupos enfermos, cirrótico y cirrótico mas vehículo, ambas enzimas como se sabe están involucradas en proceso de daño tisular a nivel hepático, cardiaco, y muscular en general, (Losekann, et al., 2015) demostró que la ALT puede elevarse hasta 2,5 veces mas en pacientes con enfermedad hepática no alcohólica en comparación con pacientes sanos, por otro las AST enzima estrictamente producida por los hepatocitos presenta niveles elevados en hámster cirróticos inducidos con CCl₄, a las semanas 8, 12 y 16 de inducción (Muñoz Ortega, et al., 2016), la síntesis de proteínas como la albúmina los hígados enfermos presentan una disminución significativa, estos parámetros, es decir, la disminución en la albúmina y el aumento de las transaminasas corroboran un daño hepático a nivel funcional en los hígados cirrótico y cirrótico mas vehículo en comparación con los tratamientos Carvedilol, Doxazosina y Doxa+Carve quienes muestran un restablecimiento de las transaminasas y un aumento en la síntesis de proteína, equiparable al grupo basal.

En el análisis histológico (HE) los tejidos enfermos presentan una alteración difusa de la arquitectura del hígado, en forma de degeneración vacuolar y tabiques fibrosos, naturalmente estos cambios morfológicos llevan a alteración intrahepática, provocando una reducción de la masa funcional del órgano, siendo el CCl₄ uno de los principales agentes causantes de esta patología, estudios en ratas demuestran que la inducción de cirrosis con CCl₄ en comparación la cirrosis a causa del consumo de Etanol en humanos presentar similar degeneración en el hepatocito, acompañado con una disminución en el diámetro de la vena porta (Lessa, et al., 2010), lo que desencadena la hipertensión portal, una de las afecciones más comunes en pacientes con cirrosis hepática; pacientes que generan problemas de acumulo de líquido en la cavidad peritoneal (ascitis) donde los animales presentan un

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aumento en el volumen peritoneal, ratas cirróticas inducidas con CCl₄ demostraron un aumento en volumen de la cavidad peritoneal acompañado de una pérdida de peso progresiva (Zhan, Li, Weng, Song, Yang, & An, 2012), sintomatología presentada en el modelo usado para la inducción de cirrosis con CCl₄, donde un porcentaje de los animales presentaron ascitis, y una pérdida de peso en el transcurso de la inducción.

El depósito de colágeno extracelular es el resultado neto del proceso de inflamación y es mediado por las células estelares hepáticas, depositando colágena del tipo I principalmente (Muñoz Ortega, et al., 2016); los grupos enfermos, cirrótico y cirrótico+ vehículo presentan tabiques de colágeno del tipo I predominantemente en áreas importantes como lo es la zona 1 y la zona 3 del acino de Rappaport (zona periportal y centrolobulillar respectivamente) (figura 28 inciso B y C), por lo cual altos niveles de CCl₄, etanol o alcohol desencadenan el aumento considerablemente los niveles de colágeno del tipo I y la acumulación de grasa extracelular en ratas control wistar (Lu, Ward, & Cederbaum, 2013), siendo este tipo de colágeno sintetizado por los fibroblastos, se caracteriza por ser el tipo de colágena mas gruesa en comparación con la colágena del tipo III abundante en hígados sanos, en la zona portal principalmente cuya función principal el sostén de vasos (Cuenca, Sánchez, Fraustro, Sevilla, Pérez, & Muñoz, 2008), La colágena de tipo III presentó predominancia en los grupos Carvedilol y Doxazosina, y aun en mayor concentración en los tratamientos Doxa+ Carve en relación con la colágena del tipo I (Figura 28 inciso D, F, G respectivamente), por lo tanto, posiblemente se da una degradación de estas proteínas de matriz a consecuencia de la acción de metaloproteinasas específicas (tipo 1, 9 y 13 principalmente) (Prystupa, Boguszewska, Grzybowski, & Jaroslaw, 2015). Por otro parte la tinción de PAS muestra el depósito glucógeno almacenado en el citoplasma del hepatocito; en los

resultados la tinción muestra la pérdida en los grupos cirrótico y cirrótico + vehículo en comparación con por lo tanto el almacén de glucógeno en la célula puede verse comprometido por el daño ocurrido a causa de la peroxidación lipídica sobre la membrana del hepatocito, provocando el derrame de este y otro componentes del citoplasma a torrente sanguíneo (Singh, Kapoor, & Bhatnagar, 2015), (Hu, Yu, Li, Prasad, & Tang, 2014).

Para demostrar el grado de proliferación celular y distribución de estas células se evaluaron los marcadores CD 90 y Ki67 mediante inmunohistoquímica, donde CD90 un marcador de células madre recientemente utilizado para la identificación de células regenerativas en carcinoma hepatocelular (Martinez Palacián, et al., 2013) se caracteriza por mostrar un aumento significativo de su expresión, en el estroma (mayor proporción) y en el endotelio principalmente (Thakolwiboon, Zhu, Liang, H. Welling, Zhang, & M. Lubman, 2014), como se observa en el grupo Doxazosina, quien presenta un aumento en la expresión de esta proteína en comparación con los grupos tratados con Carvedilol y Doxa+Carve donde la presencia de células positivas a CD90 es menor, lo que nos habla de una baja actividad por parte de las células progenitoras en la zona porta, sin embargo en los grupos cirrótico y cirrótico + vc la actividad progenitora en comparación incluso con el grupo basal no tiene significancia ya que estos grupos mostraron el número más bajo de células positivas, sin embargo con esto se demuestra que también estas células pueden llegar a proliferar moderadamente después de la lesión aguda con CCl4 e incluso en comparación con el grupo basal o intacto, quien a pesar de no haber sufrido daño tisular, presenta niveles similares a Doxa+Carve y Carvedilol.

Por otro lado Ki67 un marcador que muestra el potencial de las células quiescentes a entrar nuevamente al ciclo celular, es usado como marcador regenerativo de la masa hepática (Suzuki, Katagiri, Wang, Kakisaka,

Nisizuka, & Takikawa, 2016) ya que promueve el restablecimiento de la morfología natural del hígado como es el caso de la Doxazosina quien a comparación de los demás grupos la respuesta ductular fue aumentada al parecer relacionada con el daño causado por la vacuolización visto en otras tinciones para los grupos cirrótico+vc y doxa+carve presentaron el mismo patrón de expresión visto en la proteína CD90 estos resultados nos predicen un posible restablecimiento de una repoblación significativa de células regenerativas que ira desde la zona porta hasta la zona de la vena central en estos tejidos ya que es bien sabido que la proteína Ki67 juega un papel importante dentro del ciclo celular con restablecimiento de la arquitectura cromosómica en forma de barra y con la formación del cromosoma mitótico (Takagi, Natsume, Kanemaki, & N., 2016), en comparación con los grupos tratados con Doxazosina y Carvedilol quienes presentaron un número menor de células ovas positivas a ésta proteína, pero aun aumentada en comparación al grupo basal.

Los niveles de expresión tanto de Ki67 como de CD90 no tuvieron diferencia con respecto a los otros tratamientos, lo que indica que la regeneración no afecto la celularidad de la zona porta, y permitió la activación de líneas celulares como las células ovas (Li, et al., 2013), incluso en el caso donde la pérdida de hepatocitos fuese masiva por la vacuolización las células ovas o células madre pueden presentar y duplicar su capacidad proliferativa, esto ya demostrado también en hígados con hepatectomía parcial (Suzuki, Katagiri, Wang, Kakisaka, Nisizuka, & Takikawa, 2016) donde promueven el restablecimiento de la morfología natural del hígado, con esto se puede ver que la Doxazosina a pesar de no alcanzar el nivel de restablecimiento en comparación con Carvedilol y Doxa+Carve continua siendo una alternativa adecuada para la reversión de la cirrosis.

Para demostrar la expresión de marcadores específicos de regeneración, se llevó a cabo un análisis por PCR semicuantitativo de c-Myc, AFP, HFG, CKT-7 y CKT-18. Los resultados que los oncogenes c-Myc y AFP mostraron fue una marcada expresión en los grupos enfermos cirrótico y cirrótico + vehículo en comparación de los grupos tratados con Carvedilol, Doxazosina y doxa+carve, siendo incluso el grupo Doxa+ Carve, quien presentó una menor expresión, ambos marcadores como es sabido están involucrados en procesos del ciclo celular, y actualmente son utilizados como marcadores tumorales ya que se expresan en alto grado en pacientes con hepatocarcinoma (Yang, Zhou, Tone, Durkin, & Popescu, 2016) (Arreta, Cacho, Villavicencio, Estrada, & Hernandez, 2007), lo que nos habla de una proliferación celular posiblemente descontrolada independientemente del grado de fibrosis o cirrosis que presenten la AFP se sabe se expresa aumentada tanto en pacientes con fibrosis como en pacientes con cirrosis franca (Raziky, Attia, Shaker, Khatab, Abdo, & Elsharkawy, 2013). Por otro lado c-Myc marcador también implicado en eventos como la proliferación, crecimiento y diferenciación celular, se ve mayormente expresado en el grupo cirrótico + vc, se cree pudiera estar relacionado con la cantidad de polimorfonucleares que se observa en la tinción de HE, ya que estudios demuestran que la expresión de este está relacionado con las primeras etapas de la inflamación y la cantidad de colágena del tipo I extracelular (Liu, Zhou, & Yang, 2015).

Por otro lado la expresión del HFG a diferencia de los oncogenes vistos con anterioridad este factor se mostró predominante en los grupos tratados con Doxazosina, Carvedilol y Doxa+Carve, lo que demuestra que los tratamientos principalmente doxa+carve permiten una mejora del área portal encaminando a una proliferación y reconstrucción celular controlada, ya que este factor durante lesiones hepáticas aumenta sus niveles notablemente, se

crea debido a que además de la producción interna por parte de las CEH, órganos distantes como lo es el pulmón y el bazo producen este factor actuando de manera endocrina para impulsar la regeneración del hígado (Nakamura & Mizuno, 2010).

El análisis de las citoqueratinas 18 y 7 se llevó a cabo con el propósito de analizar la actividad de la zona porta en los diversos tratamientos. Por un lado la ctk-18 es usada como parámetro para el pronóstico de pacientes con insuficiencia hepática aguda, mostrando el grado de supervivencia de las células epiteliales en el órgano enfermo (Waidmann, Brunner, Herrmann, Zeuzem, Piiper, & Kronenberger, 2016); la ckt-7 es una proteína que presenta reacción ductular durante procesos regenerativos propios de la cirrosis y/o carcinogénesis hepática, ambas citoqueratinas expresadas por células progenitoras y colangiocitos en el núcleo de las estas células (Durnez, et al., 2006) se observaron en mayor cantidad en el grupo Doxa+Carve, incluso mayor en comparación con los tratamientos individuales Doxazosina y Carvedilol, lo que indica que este grupo de hígados presenta altos índices de respuesta por parte de las células ovales ubicados en la zona portal, sin embargo, los grupos enfermos cirrótico y cirrótico mas vehículo presentaron una baja expresión de estos marcadores, caso contrario a la expresión de los oncogenes AFP y c-Myc, donde como ya fue mencionado el grupo cirrótico + vehículo registro una expresión elevada, siendo este grupo el más dañado o el que presenta menor índice o potencial regenerativo.

Los resultados encontrados en el análisis por PCR de los oncogenes c-Myc y AFP así como el análisis de Ki 67 concuerdan con la restitución de la morfología histológica, la disminución de los tabiques fibrosis y lóbulos inflamatorios presentes en los grupos cirrótico y cirrótico + vehículo principalmente, la mejora en la funcionalidad hepática así como el análisis PCR de las citoqueratinas y la expresión de la proteína CD90 explica la

activación de compartimentos de células progenitoras en los grupos Carvedilol, Doxazosina y Doxa+Carve, posiblemente relacionado disminución en la actividad de las CEH, principales células encargadas de la producción de matriz extracelular y otros factores así como la disminución de la hipertensión portal y la vasoconstricción intrahepática.



CONCLUSIONES

El uso de fármacos alfa y beta bloqueador como lo es el Carvedilol y la Doxazosina respectivamente parece ejercer una mejora en la morfología histológica de estos tratamientos, siendo Doxa+carve quien presenta perdida completa de la vacuolización y fibras de colágena.

Estos mismos tratamientos demostraron la restitución de las pruebas de función hepática, siendo Doxa+carve el tratamiento parecido en comportamiento al grupo basal.

Los grupos doxa+carve además de la restitución de la morfología y la función hepática, presento un aumento en la activación de compartimentos de células regenerativas visto en la proteína Ki67 al igual que el grupo cirrótico+vc. Mientras que Doxazosina parece también tener actividad en la zona porta por parte de la proteína CD90.

El análisis molecular de los tratamientos demostró la expresión de marcadores de regeneración en los grupos Doxazosina, Carvedilol y Doxa+Carve, y la expresión de marcadores oncogénicos en los tratamientos cirrótico y cirrótico+vc.

BIBLIOGRAFÍA

Xiao-Ya, L., Rui-Xia, L., Fei, H., Li-Jian, C., Chun-Yun, L., Cheng, C., y otros. (August de 2016). Fibronectin expression is critical for liver fibrogenesis in vivo and in vitro. *Molecular Medicina Reports* , 3669-3675.

Li, Y., Lua, I., W, S., & Asahina, K. (2015). Role of TGF- β signaling in differentiation of mesothelial cells to vitamin A-poor hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Gastrointestinal and liver Physiology.* , 310 (4), 262-272.

Muñoz Ortega, M. H., Llamas Ramirez, R. W., Norma, D. R., Elías Flores, T., Tavares Rodriguez, I., Campos esparza, M. d., y otros. (2016). Doxazosin Treatment Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Hamsters through a Decrease in Transforming Growth Factor β Secretion. *PMC* , 10 (1), 101-108.

Martinez Palacián, A., Castillo, G., Causado Suarez, A., Garcia, M., orena, D., Fernandez, M., y otros. (2013). Mouse Hepatic Oval Cells Require MetDependent PI3K to Impair TGF- β -Induced Oxidative Stress and Apoptosis. *PLoS One* , 8, 1-14.

Prystupa, A., Kicinski, P., Sak, J., Boguszewska, A., & Jurkowska, A. Z. (2015). Proinflammatory Cytokines (IL-1 α , IL-6) and Hepatocyte Growth Factor in Patients with Alcoholic Liver Cirrhosis. *Gastroenterology* , 1-7.

J, J., JY, Z., B, H., MQ, X. M., Zhu, Y., Liu, G., y otros. (2015). Inhibitory effect of flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* on

expressions of TGF- β 1 and Caspase-3 in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepatology* , 40 (15), 3034-3040.

Abubakar, M., J Howat, W., Daley, F., Zabaglo, L., McDuffus, L.- A., Blows, F., y otros. (2016). High- throughput automated scoring of Ki67 in breast cancer tissue microarrays from the Breast Cancer Association Consortium. *J Pathol Clin Res* , 2 (3), 138-153.

Kocabayoglu, P., Lade, A., A, Y., & Dragomir, A. C. (2016). β -PDGF Receptor Expressed by Hepatic Stellate Cells Regulates Fibrosis in Murine Liver Injury, but Not Carcinogenesis. *J. Hepatology* , 63 (1), 141-147.

Lu, Y., Ward, S., & Cederbaum, P. (2013). Nicotine enhances ethanol-induced fat accumulation and collagen deposition but not inflammation in mouse liver. *NIH Public Access* , 47 (5), 353-357.

Cubero, F. J., & N., N. (2006). Células de Kuffer y la hepatopatía alcohólica. *Rev Esp Esferm Dig* , 98 (6), 450-472.

Cuenca, J., Sánchez, V., Fraustro, A., Sevilla, L., Pérez, L., & Muñoz, R. (2008). Partial hepatectomy-induced regeneration accelerates reversion of liver fibrosis involving participation of hepatic stellate cells. *Exp. Biol. Med.* , 223 (7), 827-839.

Czaja, A. (2014). Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease . *World J Gastroenterol* , 20 (10), 2515-2532.

Caligiuri, A., Gentilini, A., & Marra, F. (2016). Molecular Pathogenesis of NASH. *International Journal of Molecular Sciences.* (17), 1-34.

Castro. (1993). Toxicología Basica. Mecanismo de toxicidad y sus aplicaciones. *Acta Bioquimica Clinica Latinoamericana* , 25 (1), 1-10.

Caballero, G. B. (2002). Interaction of cimetidine with P450 in a mouse model of hepatocarcinogenesis initiation. *British Journal of Cancer* , 86, 630–635.

Lai, H.-C., Yeh, C.-C., Jeng, L.-B., Huang, S.-F., Liao, P.-Y., Lei, F.-J., y otros. (June de 2016). Androgen receptor mitigates postoperative disease progression of hepatocellular carcinoma by suppressing CD90+ populations and cell migration and by promoting anoikis in circulating tumor cells. *Oncotarget* , 10186-95.

Campollo, M. M.-S.-A.-A.-C.-O. (1997). Características epidemiológicas de la cirrosis hepática en el Hospital Civil de Guadalajara. *Salud Pública Méx* , 39 (3), 195-200.

Lessa, A., Paredes, B., Dias, J., Carvalho, A., Quintanilla, L., Takiya, C., y otros. (2010). Ultrasound imaging in an experimental model of fatty liver disease and cirrhosis in rats . *BioMed Central* , 6 (6), 1746-1761.

Leithead, J., Rajoriya, N., & Tehami, N. (2015). Non-selective beta-block- ers are associated with improved survival in patients with ascites listed for liver transplantation. *GUT* (64), 1111-1119.

Chen, H., Shen, Z., Xu, W., Fan, T., Lu, Y., Cheng, M., y otros. (2014). Expression of P450 and nuclear receptors in normal and end-stage Chinese livers. *Gastroenterology* , 20 (26), 8681-8690.

Li, Z., Chen, J., Li, L., Ran, J. H., Liu, J., Gao, T., y otros. (2013). In vitro proliferation and differentiation of hepatic oval cells and their potential capacity for intrahepatic transplantation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* , 46, 661-688.

Li, N., & Hua, J. (2016). Immune cells in liver regeneration. *Oncotarget* , 1-15.

Liu, T., Zhou, Y., & Yang, H. (2015). Interactions between Myc and Mediators of Inflammation in Chronic Liver Diseases. *Hindawi Publishing Corporation* , 1-12.

Liu, H., Wang, Z., & Nowicki, M. (2014). la apoptosis de los hepatocitos es un importante factor que contribuye a la lesión hepática aguda en una variedad de enfermedades hepáticas . *World J Gastroenterol* , 20 (48), 18189-18198.

Liberal, R., & Grand, C. (2016). Cirrhosis and autoimmune liver disease: Current understanding. *World J Hepatology.* , 28 (8), 1157-1168.

Losekann, A., Weston, A., Mattos, A., Tovo, C., Carli, L., Espindola, M., y otros. (2015). Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH): Risk Factors in Morbidly Obese Patients. *Int J Mol Sci.* , 25552-25559.

Chobert, M.-N., Couchie, D., Fourcot, A., Zafrani, E., Laperche, Y., Mavier, P., y otros. (2012). Liver precursor cells increase hepatic fibrosis induced by chronic carbon tetrachloride intoxication in rats. *Lab Invest* , 92 (1), 135-143.

Connolly, M., Malhotra, A., Bedrosian, A., Ibrahim, J., Cieza, N. N., Henning JR, C. M., y otros. (2011). Dendritic cell depletion exacerbates acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* , 54 (3), 959-968.

Schwarting, R. (1993). Little missed markers and Ki-67. *Lab Invest* (68), 597-599.

Schumacher, J., & Guo, G. (2016). Regulation of Hepatic Stellate Cells and Fibrogenesis by Fibroblast Growth Factors. *BioMed Research International* , 1-8.

Schuppan, D., & Pinzani, M. (2012). Anti-fibrotic therapy: lost in translation? *Hepatology* , 56 (1), S66-S74.

Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *CELL* , 140 (6), 821-832.

Suzuki, Y., Katagiri, H., Wang, T., Kakisaka, K., Nisizuka, S., & Takikawa, Y. (2016). Ductular reactions in the liver regeneration process with local inflammation after physical partial hepatectomy . *Laboratory Investigation* , 1-12.

Singh, M., Kapoor, A., & Bhatnagar, A. (2015). Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chem Biol Interact.* , 261-273.

Sipeki, N., Szalmas, P. A., Lakatos, P., & Maria., P. (2014). Immune dysfunction in cirrhosis. *Gastroenterol.* , 2564-2577.

Waxman, D., & Holloway, M. G. (2009). Sex Differences in the Expression of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes. *Molecular Pharmacology* , 76 (2), 215-228.

Waidmann, O., Brunner, F., Herrmann, E., Zeuzem, S., Piiper, A., & Kronenberger, B. (2016). Cytokeratin 18-based cell death markers indicate severity of liver disease and prognosis of cirrhotic patients . *Liver International* , 1-9.

Wang, C., Zhang, F., Cao, Y., Zhang, M., Wang, A., Mingcui, X., y otros. (2016). Etoposide Induces Apoptosis in Activated Human Hepatic Stellate Cells via ER Stress. *Scientific Reports.* , 1-11.

Wang, T., Zhang, K.-H., Hu, P.-p., Huang, Z.-Y., Zhang, P., Wan, Q.-S., y otros. (2016). Simple and robust diagnosis of early, small and AFP-negative primary hepatic carcinomas: an integrative approach of serum fluorescence and conventional blood tests . *Oncotarget* , 7 (39), 64053-64070.

Wierstra, I., & Alves, J. (2008). The c-myc promoter: still Mystery and challenge. *Advances in Cancer Research* , 113-128.

Woolbrinht, B., & Jaeschke, H. (2015). Xenobiotic and Endobiotic Mediated Interactions between the Cytochrome P450 System and the Inflammatory Response In the Liver. *Adv Pharmacology* , 74, 131-161.

Uchiyanna, A., Kim, J., & Kon, k. (2008). Translocation of iron from lysosomes into mitochondria is a key event during oxidative stress-induced hepatocellular injury. *Hepatology.* , 1644-1654.

Zavodnik, I. (2015). Mitochondrial dysfunction and compensatory mechanisms in liver cells during acute carbon tetrachloride-induced rat intoxication. *Biomed* , 61 (6), 731-736.

Zhan, Y., Li, L., Weng, J., Song, X., Yang, S., & An, W. (2012). Serum Autofluorescence, a Potential Serum Marker for the Diagnosis of Liver Fibrosis in Rats. *Int J Mol Sci.* , 13 (9), 12130-12139.

Zhou, W.-C., Zhang, Q.-B., & Qiao, L. (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* , 20 (23), 7312-7324.

T, I., & Miyajima, A. (2014). Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology* , 59 (4), 1617-1726.

T, J., X, Z., Ping, J., XU, D., & WANG, H. (2008). Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *Gastroenterology* , 43 (6), 419-428.

Takagi, M., Natsume, T., Kanemaki, M., & N., I. (2016). Perichromosomal protein Ki67 supports mitotic chromosome architecture. *Genes Cells* , 21 (10), 1113-1124.

Takeda, S., Liu, H., Sasagawa, S., Dong, Y., Trainor, P., Cheng, E., y otros. (2013). HGF-MET signals via the MLL-ETS2 complex in hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest.* , 123 (7), 3154-3165.

Tarlow, B. D., Finegold, M., & Grompe, M. (2014). Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in oval cell injury. *Hepatology* , 60 (1), 278-289.

Terai, S., & Tsuchiya, A. (Septiembre de 2016). Status of and candidates for cell therapy in liver cirrhosis: overcoming the “point of no return” in advanced liver cirrhosis. *J Gastroenterol* , 1-12.

Thakolwiboon, S., Zhu, J., Liang, Q., H. Welling, T., Zhang, M., & M. Lubman, D. (2014). Heterogeneity of The CD90+ Population in Different Stages of Hepatocarcinogenesis. *Journal of Proteomic & bioinformatics* , 10 (7), 296-302.

Timothy, H., & A Mann, D. (2016). Epigenetics in liver disease: from biology to therapeutics. *BMJ* (10), 1-11.

TR, K., Pellanda, P., Pellegrinet, L., V, B., Nicoli, P., M, D., y otros. (2016). Identification of MYC-Dependent Transcriptional Programs in

Oncogene-Addicted Liver Tumors. *Cancer Research* , 76 (12), 3463-3472.

X, F., H, L., EN, K., M, D., SP, L., K, R., y otros. (2016). Low Ki67/high ATM protein expression in malignant tumors predicts favorable prognosis in a retrospective study of early stage hormone receptor positive breast cancer. *Oncotarget* , 1-15.

Xinguang, Y., Huixing, Y., Linlin, W., Wanxin, W., Xiaojun, W., & Linghua, Y. (2016). RSPOs facilitated HSC activation and promoted hepatic fibrogenesis. *Oncotarget* , 7 (39), 637667-78.

Y, Z., Zimber, M., H, Y., GK, N., Fernan, R., & WJ, L. (2016). Effects of Human Fibroblast-Derived Extracellular Matrix on Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell* (24), 1-13.

Yu, Y., Fisher, J., Lillegard, J., Rodysill, B., Amiot, B., & Nybeg, S. (2012). Cell Therapies for Liver Diseases. *Liver Transplant* , 18 (1), 9-21.

Yang, X., Zhu, L., Weiming, Z., Shi, Y., He, C., & Xu, C. (2016). Comparative analysis of regulatory roles of P38 signaling pathway in 8 types liver cell during liver regeneration . *EISEVIER* , 66-73.

Yang, X., Zhou, X., Tone, P., Durkin, M. E., & Popescu, N. C. (2016). Cooperative antiproliferative effect of coordinated ectopic expression of DLC1 tumor suppressor protein and silencing of MYC oncogene expression in liver cancer cells: Therapeutic implications. *Oncology Letters* (12), 1591-1596.

Yang, M., Ramachandra, A., HM, Y., Woodlbright, B., Copple, B., Trauner, M., y otros. (2014). Osteopontin is an initial mediator of

inflammation and liver injury during obstructive cholestasis after bile duct ligation in mice. *Toxicol Lett* , 224 (2), 186-195.

Yin, C., Evason, K., Asahina, K., & Stainier, D. (2013). Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest.* , 123 (5), 1902-1910.

Yovchev, M. I., Xue, Y., Shafritz, D., Locker, J., & Oertel, M. (2013). Repopulation of the fibrotic/cirrhotic rat liver by transplanted hepatic stem/progenitor cells and mature hepatocytes. *J. Hepatology* , 59 (1), 284-295.

Yono, M., Yamamoto, Y., Yoshida, M., Ueda, S., & Latifpour, J. (2007). Effects of doxazosin on blood flow and mRNA expression of nitric oxide synthase in the spontaneously hypertensive rat genitourinary tract. *NIH Public Access* , 81 (3), 218-222.

AL, H., M, L., & A, J. (2009). Oxidant stress-induced liver injury in vivo: role of apoptosis, oncotic necrosis, and c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* , 296, G572-G581.

Alameda, F., Boluda, S., Ferrer, L., Baro, T., Mariñoso, L., Mancebo, C., y otros. (2004). The Ki67 Labelling Index, is not a useful predictor for the follow up of cervical intraepithelial neoplasia . *J Low Gen Tract Dis* (8), 313-316.

Alejandro, D. (2009). Uso clinico del carvedilol en la hipertension arterial. *Medicas Vis* , 22 (2), 160-165.

A, K., A, B., J, B., & BG, J. (2016). Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumour Biol.* (23), 1-12.

Auguet, T., Aragonès, G., Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Martí, A., Martínez, S., y otros. (2016). miR33a/miR33b* and miR122 as Possible Contributors to Hepatic Lipid Metabolism in Obese Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease . *International Journal of Molecular Sciences*. (17), 1-17.

Attallah, A., El-Far, M., Zahran, F., Shiha, G., Farid, K., Omran, M., y otros. (2016). Interferon-gamma is associated with hepatic dysfunction in fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *J Immunoassay Immunochem* , 37 (6), 597-610.

Atorrasagasti, E. P. (2013). Lack of the Matricellular Protein SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine) Attenuates LiverFibrogenesis in Mice. *PLOS ONE* , 8 (2), 1-17.

Arduini, A. (2009). Regulación de la Biogénesis Mitocondrial y de la Biogenesis Ribosomal en la Cirrosis Biliar en Ratas. *Servei de Publicacions* , 220-310.

Arreta, O., Cacho, B. E., Villavicencio, A., Estrada, F., & Hernandez, N. (2007). The progressive elevation of alpha fetoprotein for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *BIOMED* , 1-9.

Bakris, F. V. (2004). Metabolic effects of carvedilol vs metoprolol in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension: a randomized controlled trial. *JAMA* (292), 2227–2236.

Bettermann, K., Kuldeep, A., Hofer, E., Wohlrab, C., Golob, N., Svendova, V., y otros. (2016). Keratin 18-deficiency results in steatohepatitis and liver tumors in old mice: A model of steatohepatitis-associated liver carcinogenesis . *Oncotarjet* , 1-14.

Benitez, B. L. (2003). La cirrosis hepatica. ¿Puede ser reversible? *La Biologia Molecular de la Clinica.* , 1 (1), 37-39.

Berenguer, M. (2004). Hepatitis C and fibrosis. (U. H. Fe, Ed.) *Revista Española de Enfermadades Digestivas.* , 96 (6), 402-414.

Bogdanos, D., Bin, G., & Gershwin, M. E. (2013). Liver Immunology. *NIH Public Access* , 1-63.

Bonanni, B., Puntoni, M., Cazzaniga, M., Pruneri, G., Serrano, D., Gonzaga, A., y otros. (2012). Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial. *J. Clinic Oncology.* , 30 (21), 2593-2600.

Durnez, A., Verslype, C., Nevens, F., Aerts, R., Pirenne, J., Lesaffre, E., y otros. (2006). The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology* , 138-151.

De la Rosa, C., Schoemaker, M., & Vrenken, T. (2006). Conde de la Rosa L, Schoemaker MH, Vrenken TE et al. Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. *Hepatology* , 37, 918-929.

Ding, Q., Tian, X.-G., Li, Y., Wang, Q.-Z., & Zhan, C.-Q. (2015). Carvedilol may attenuate liver cirrhosis by inhibiting angiogenesis through the VEGF-Src-ERK signaling pathway. *World J Gastroenterol* , 21, 9566-9576.

Ding, Q., Tian, X.-G., Wang, Q.-Z., & Zhang, C.-Q. (2015). Carvedilol may attenuate liver cirrhosis by inhibiting angiogenesis through the VEGF-Src-ERK signaling pathway. *World J Gastroenterol* , 9566-9576.

Esparza, M., Manzano, M., Alcaraz, A., & Peñarrubia, p. (2015). Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. *Gastroenterology* , 21 (41), 11522-11541.

Fanelli, S. L. (1996 йил 25-Marzo). Alteraciones en los lípidos nucleares hepáticos debidas a la activación in situ del tetracloruro de carbono a radicales libres. *Tesis Doctoral* . Buenos Aires, Argentina, Argentina: CONICET.

Hu, L., Yu, W., Li, Y., Prasad, N., & Tang, Z. (2014). Antioxidant Activity of Extract and Its Major Constituents from Okra Seed on Rat Hepatocytes Injured by Carbon Tetrachloride. *Biomed Research International* . , 1-9.

Hu, M., Li, S., Menon, S., Liu, B., Hu, M., Longaker, M., y otros. (2016). Expansion and Hepatic Differentiation of Adult Blood-Derived CD34+ Progenitor Cells and Promotion of Liver Regeneration After Acute Injury. *Stem cells translational medicine* , 5 (6), 723-732.

Hashimoto, N., Shimoda, S., Kawanaka, H., K, T., H, U., Akahoshi, T., y otros. (2011). Modulation of CD4+ T cell responses following splenectomy in hepatitis C virus-related liver cirrhosis. *Clinica & Experimental Immunology* . , 243-250.

Hanafy, A. (2016). Efficacy of low dose capecitabine and sorafenib in patients with advanced alfa-fetoprotein secreting hepatocellular carcinoma: a 1 year experience. *Springerplus* , 5 (1), 2-7.

Glende, R. R. (1973). Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *Critical Reviews in Toxicology* , 2, 263-297.

Guengerich, P. (2008). Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *American Chemical Society* , 21 (1), 70-83.

Ghafoory, S., Breitkopf, K., Li, Q., Scholl, C., Dooley, S., & Wolfl, S. (2013). Zonation of Nitrogen and Glucose Metabolism Gene Expression upon Acute Liver Damage in Mouse. *PLoS One* , 8 (10), 1-15.

Giunta, M., Coonde, D., & Fraquelli, M. (2016). Role of spleen elastography in patients with chronic liver diseases. *Gastroenterology* , 22 (35), 7857-7867.

Godoy, P., Hewitt, N., Albrecht, U., Andersen, M., Ansari, N., Cameron, N., y otros. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch. Toxicology* , 87 (8), 1315-1530.

Iwakiri, Y. (2012). Endothelial dysfunction in the regulation of portal hypertension. *Liver Int.* , 32 (2), 199-213.

J, Y., YL, Y., Y, J., Y, Z., & CQ, Z. (Septiembre de 2016). Clinical characteristics of drug-induced liver injury and primary biliary cirrhosis. *J. Gastroenterol* , 7579-7586.

Jaeschke, H. (2011). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterology Hepatology* , 173-179.

Jang, K. Y., Noh, S. J., Lehwald, N., Tao, G.-Z., Bellovin, D. I., Park, H. S., y otros. (2012). SIRT1 and c-Myc Promote Liver Tumor Cell

Survival and Predict Poor Survival of Human Hepatocellular Carcinomas. *PLoS One* , 7 (9), 1-15.

Keledjian, K., Garrison, B. J., & Kyprianou, N. (2005). Doxazosin Inhibits Human Vascular Endothelial Cell Adhesion, Migration, and Invasion. *Journal of Cellular Biochemistry.* , 94, 374-388.

Khalid, M., Khan, I., Mani, P., Chattopadhyay, P., Sarkar, D., & Sinha, S. (2014). Combination of hepatocyte specific delivery and transformation dependent expression of shRNA inducing transcriptional gene silencing of c-Myc promoter in hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer* , 582 (14), 2-19.

Knodell, R., Ishak, K., Black, W., Che, T., Craig, R., Kiernan, T., y otros. (1981). Formulation and Application of a Numerical Scoring System for Assessing Histological Activity in Asymptomatic Chronic Active Hepatitis . *Hepatology* , 431-435.

Kon, J., Ichinohe, N., Ooe, C., Sasaki, K., & Mitaka, T. (2009). Thy1-Positive Cells Have Bipotential Ability to Differentiate into Hepatocytes and Biliary Epithelial Cells in Galactosamine-Induced Rat Liver Regeneration . *Epithelial and Mesenchymal Cell Biology* , 175 (9), 2362-2371.

Kronenber, B., Rudloff, I., Bachmann, M. B., Kapper, L., Filmann, N., Waidmann, M., y otros. (2012). Interleukin-22 predicts severity and death in advanced liver cirrhosis: a prospective cohort study. *BMC Medicine* , 102-112.

Mao, S., Glorioso, J., & Nyberg, S. (2014). Liver Regeneration. *HHS Public Access* , 163 (4), 352-362.

Medeiros, M. P. (2014). Clinical use of aldosterone antagonists for slowing progression of chronic kidney disease: From the physiological basis to clinical application. *ELSEVIER* , 71 (3), 137-141.

Michalopolous, G. (2015). Terminating hepatocyte proliferation during liver regeneration: the roles of two members of the same family (CCAAT-enhancer-binding protein alpha and beta) with opposing actions. . *Hepatology* , 61 (1), 32-34.

Miyajima, A., Tanaka, M., & Itoh, T. (2014). Stem/Progenitor Cells in Liver Development, Homeostasis, Regeneration, and Reprogramming. *Elsevier* , 561-574.

Moreira, A., Rodrigues, G., Bona, S., Sinigaglia Fratta, L., Weber, G., Nascimento, J., y otros. (2016). Ductular reaction, cytokeratin 7 positivity, and gamma-glutamyl transferase in multistage hepatocarcinogenesis in rats . *Protoplasma* , 1-15.

Nakamura, T., & Mizuno, S. (2010). The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *The Japan Academy* , 86, 588-610.

Pascale, M., Aversa, C., Barbazza, R., Marongiu, B., Siracusano, S., Stoffel, F., y otros. (2016). The proliferation marker Ki67, but not neuroendocrine expression, is an independent factor in the prediction of prognosis of primary prostate cancer patients. *Radiology and Oncology* , 50 (3), 313-320.

Patel, P., Schutzer, S., & Pysopoulos, N. (2016). Immunobiology of hepatocarcinogenesis: Ways to go or almost there? *Gastroenterology* , 7 (3), 242-255.

Paik, Y.-H. (January de 2016). Reappraisal of Antihypertensive Medicine Doxazosin and Carvedilol as a Potential Therapeutic for Hepatic Fibrosis. *Gut and Liver.* , 10-11.

Panebianco, C., Oben A., J., Vinciguerra, M., & Paziienza, V. (2016). Senescence in hepatic stellate cells as a mechanism of liver fibrosis reversal: a putative synergy between retinoic acid and PPAR- gamma signalings . *Clin Exp Med* , 1-8.

Porowski, D., Wirkowska, A., Hryniewiecka, E., Wyzgal, J., Pacholczyk, M., & Paczek, L. (2015). Liver Failure Impairs the Intrahepatic Elimination of Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor-Alpha, Hepatocyte Growth Factor, and Transforming Growth Factor-Beta. *BioMed Research International* , 1-7.

Prystupa, A. S., Boguszezewska, A., Grzybowski, A., & Jaroslaw, S. (2015). Activity of MMP1 and MMP13 and Amino Acid Metabolism in Patients with Alcoholic Liver Cirrhosis. *Med Sci Monit.* , 21, 1008-101.

Oben, R. (2003). Sympathetic Nervous System Inhibition Increases Hepatic Progenitors and Reduces Liver Injury. *Hepatology* , 38 (3), 665-673.

Raziky, E., Attia, D., Shaker, O., Khatab, H., Abdo, S., & Elsharkawy, A. (2013). Hepatic fibrosis and serum alpha-fetoprotein (AFP) as predictors of response to HCV treatment and factors associated with serum AFP normalisation after treatment. *Gastroenterology* , 94 (8), 94-98.

Risso, M. V. (2008). Hepatotoxicidad. *Universidad de Buenos Aires* , 60-95.

Roskams, C. (2004). Neuroregulation of the Neuroendocrine Compartment of the Liver. *The Anatomical Record Part A* , 910–923.

Rovira, S., Barnadas, A., Velasco, A., Lomas, M., Rodriguez, P., ramirez, J., y otros. (2012). Classical markers like ER and ki-67, but also survivin and pERK, could be involved in the pathological response to gemcitabine, adriamycin and paclitaxel (GAT) in locally advanced breast cancer patients: results from the GEICAM/2002-01 phase II study. *Clin Transl Oncology* , 430-436.

Roa, I., Elorza, X., Lantadilla, S., Ibacache, G., & De Aretxabala, X. (2009). Immunohistochemical expression of Ki-67 as a marker of proliferation in gallbladder mucosa samples with or without cancer. *Rev. méd. Chile* , 137 (7), 881-887.

Robbins, K., & Abbas., C. (2008). *Patología estructural y funcional*. (8ª edición ed.). Barcelona: ELSERVIER.

Ronn, R., Guibentif, C., Saxena, S., & Woods, N. (September de 2016). Reactive oxygen species impair the function of cd90+ hematopoietic progenitors generated from human pluripotent stem cells. *Stem Cells* , 1-15.

ANEXOS

ANEXO A

Procesamiento en el histoquinet para la inclusión en parafina de las muestras de hígado.

1. Los fragmentos de los grupos de hígados obtenidos fueron colocados en rejillas para inclusión en parafina. Los bloques fueron procesados en un Histoquinet automatico (Leyca) programado de la siguiente manera:

| Solución | Tiempo | Solución | Tiempo |
|-------------|---------|---------------------|---------|
| OH | 35 | OH 100% | 40 |
| 50% | Minutos | | Minutos |
| OH | 35 | Xilol:Etanol | 45 |
| 70% | Minutos | 1:1 | Minutos |
| OH | 35 | XIOL | 60 |
| 80% | Minutos | | minutos |
| OH | 35 | XIOL | 60 |
| 90% | Minutos | | minutos |
| OH | 35 | PARAFINA | 2 Horas |
| 95% | Minutos | | |
| OH | 40 | PARAFINA | 2 Horas |
| 100% | Minutos | | |

2. después de la inclusión en parafina se forman cubos, para realizar los cortes histológicos de 5µM.

3. los cortes histológicos fueron llevados a cabo en un micrótopo (Leyca) manual.

4. Las laminillas con los cortes fueron almacenadas en estufa a 37°C durante 24 horas con el propósito de eliminar en exceso de parafina.

ANEXO B

TINCION CON HEMATOXILINA EOSINA

Preparación de la hematoxilina de Harris

5 gr de Hematoxilina

50 mL de Alcohol al 100%

100g de Aluminio de potasio o amonio

2.5g de Oxido rojo de mercurio

1000mL agua destilada.

Se disolvió la hematoxilina en el alcohol al 100%

1. después de la desparafinización los cortes histológicos en la estufa a 58°C , se colocaron en las soportes de vidrio pertenecientes al tren de tinción, el cual consta del siguiente proceso:

| Solución | Tiempo | Solución | Tiempo |
|------------------|------------|-------------|-----------|
| XIOL | 5 minutos | EOSINA | 3 minutos |
| XIOL | 5 minutos | AGUA | 3 minutos |
| | | DESTILADA | |
| OH 100% | 2 minutos | OH 96% | 2 minutos |
| OH 100% | 2 minutos | OH 96% | 2 minutos |
| OH 96% | 2 minutos | OH 100% | 2 minutos |
| OH 96% | 2 minutos | OH 100% | 2 minutos |
| AGUA | 3 minutos | XIOL | 5 minutos |
| DESTILADA | | | |
| HEMATOXIL | 3 minutos | XIOL | 5 minutos |
| INA DE | | | |
| HARRIS | | | |
| AGUA | 10 minutos | | |
| CORRIENTE | | | |

2. Se monto en Entellan las laminillas y se observaron en microscopio campo claro Micro CARL ZEISS.

Anexo C

TINCION DE PAS

1. PREPARACION DE SOLUCIONES:

A) ACIDO PERYODICO

1g de acido periódico

100 mL de agua destilada

B) REACTIVO DE SCHIFF

1g de fuscina básica de 20 ml de OH 100%, se agrega 200 mL de agua destilada y se agita por 30 minutos.

Se adiciona 5g de metasulfito de sodio

4 mL de HCl y se mezcla 30 minutos

Adicionar 0.5d de diotinina de sodio (tiosulfato de sodio), se agita 30 minutos.

Se agrega 1-2g de carbón activado, mezclar y filtrar dos veces.

C) AGUA AMONIACAL

500mL de agua destilada, adicionando 25 gotas de hidróxido de amonio concentrado.

D) ALCOHOL ACIDO

100 mL de OH 70%

1 mL HCl concentrado

2. TECNICA

| Solución | Tiempo | Solución | Tiempo |
|---------------------------|------------|-------------------------------|------------|
| XIOL | 2 minutos | HEMATOXILINA DE HARRIS | 3 minutos |
| XIOL | 2 minutos | AGUA CORRIENTE | 3 minutos |
| OH 100% | 2 minutos | AGUA AMONIACAL | 1 Baño |
| OH 100% | 2 minutos | AGUA CORRIENTE | 10 minutos |
| OH 96% | 2 minutos | OH 96% | 2 minutos |
| OH 96% | 2 minutos | OH 96% | 2 minutos |
| AGUA DESTILADA | 3 minutos | OH 100% | 2 minutos |
| ACIDO PEYODICO | 10 minutos | OH 100% | 2 minutos |
| AGUA DESTILADA | 3 minutos | XIOL | 2 minutos |
| REACTIVO DE SCHIFF | 15 minutos | XIOL | 2 minutos |
| AGUA CORRIENTE | 10 minutos | | |

3
.
M
o
n

tar en Entellan, y observar al microscopio en campo claro.

ANEXO D

TINCION ROJO SIRIO

Solución de rojo sirio-picro:

| |
|------------------|
| Rojo sirio 0.5gr |
|------------------|

| |
|--|
| Solución acuosa saturada de ácido pícrico 500ml |
| Rojo sirio (sigma-aldrich 365548), ácido pícrico (sigma P6744-1GA) |

Agua acidificada

| |
|---|
| Se añadió 5 ml de ácido glacial a un litro de agua destilada. |
|---|

TECNICA

1. Se hidratan los cortes (5 µL) provenientes de los bloques de parafina bajo el procedimiento convencional.

| Solución | Tiempo | Solución | Tiempo |
|----------------|-----------|----------------|-----------|
| XIOL | 7 minutos | OH 96% | 3 minutos |
| XIOL | 7 minutos | OH 96% | 3 minutos |
| OH 100% | 5 minutos | Agua destilada | 3 minutos |
| OH 100% | 5 minutos | | |

2. Se incuban los cortes en una solución de hematoxilina de weigert para tinción de núcleos, durante 8 minutos y luego se lavaron los prtobjetos durante 5 minutos de agua corriente y después se colocaron las lamnillas en PBS 1X durante 5 minutos.

3. se incuban en a solución de rojo sirio-picro durante 1 hora.

4. Se lavan dos veces con agua acidificada (2 baños de cada lavado).

5. Se deshidratan en dos cambios de etanol al 96% (45 segundos/lavado)
6. montaje de la preparación histológica. Cubrir el tejido con Entellan (1.07961-0500; Merck) evitando dejar burbujas. Las laminillas se dejan secar durante 24 horas a temperatura ambiente.
7. Se revisaron los cortes en campo claro y luz polarizada en el microscopio Axioscop40.

ANEXO F

Extracción de RNA

Preparación previa del tejido.

De las muestras de tejido obtenido en el sacrificio después de la inducción de cirrosis y la aplicación de los tratamientos, fue diseccionada una porción del tejido, 1cm³ aproximadamente, fue colocado en tubos de la marca eppendorff con capacidad para 2 mL; posteriormente el tubo debía contener 300 µL de buffer de lisis.

Nota: es importante llevar a cabo todo el proceso a temperaturas bajas para evitar la degradación de reactivo y de la misma muestra de tejido.

Procedimiento:

1. Después de colocar el tejido en el tubo con el buffer de lisis, la muestra fue homogeneizada, se vestiron nuevamente 200 μ L de buffer de lisis para tratar de romper el mayor numero de células en el tejido.
2. Se homogeneizo la muestra nuevamente.
3. Centrifugar las muestras a 12 000 RPM durante 10 minutos a 4° C.
4. En el tiempo que la muestra se centrifuga se procede a activar la columna con 100 μ L de buffer activador, y posteriormente centrifugar la columna durante 30 segundos a 10 000RPM con el propósito que eliminar el buffer excedente.
5. Al lisado anteriormente centrifugado (paso 3) y se añaden 300 μ L de isopropano, mezclar perfectamente y posteriormente se transfiere a la columna ya activada (paso 4).
6. Centrifugar a 10 000RPM durante 30 segundos.
7. Descartar el sobrenadante. Nota: el tubo se recomienda dejarlo abierto 5 minutos para eliminar el exceso de isopropanol mediante evaporación.
8. Se añaden 700 μ L de buffer de lavado primario.
9. Centrifugar a 10 000 RPM durante 30 segundos. Nota: En este paso se podría añadir DNAsa para garantizar la eliminación del DNA .
10. Descartar el sobrenadante.
11. Anadir 700 μ L del buffer de lavado secundario.
12. Centrifugar a 10 000 RPM durante 30 segundos.
13. Descartar el sobrenadante. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
14. Colocar un nuevo tubo debajo de la columna y añadir 60 μ L del buffer de elusión en la columna.
15. Centrifugar a 10 000 RPM durante 1 minuto.
16. Se rescata el sobrenadante (RNA) y la columna puede ser desechada.

ANEXO G

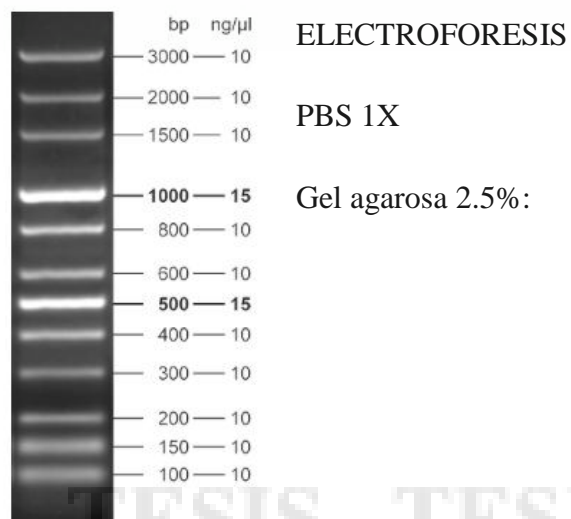
PCR (REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA)

1. Se agrega la siguiente mezcla en tubos para PCR en el siguiente orden:

| Volumen | Reactivo | Concentración final |
|----------------|-------------------------|----------------------------|
| 2 µL | REDTaq ReadyMix | 5X |
| 1 µL | Forward Primer | |
| 1 µL | Reverse Primer | |
| 1 µL | ADN temprado | |
| 5 µL | Agua libre de nucleasas | |
| 10 µL | Volumen total | |

2. Centrifugar el tubo con el propósito de recolectar todos los componentes del tubo en un botón.
3. Colocar los siguientes parámetros en termociclador (es importante tener en cuenta el tamaño del oligo, así como su temperatura de alineación descrita por el fabricante):
 - a. Desnaturalización a 94⁰C por un minuto
 - b. Alineación de primers a 55⁰C por 2 minutos
 - c. Extensión a 72⁰C por 3 minutos

Este proceso se lleva a 40 ciclos de amplificación.



2.5 gr de agarosa

100 ml de buffer PBS 1X

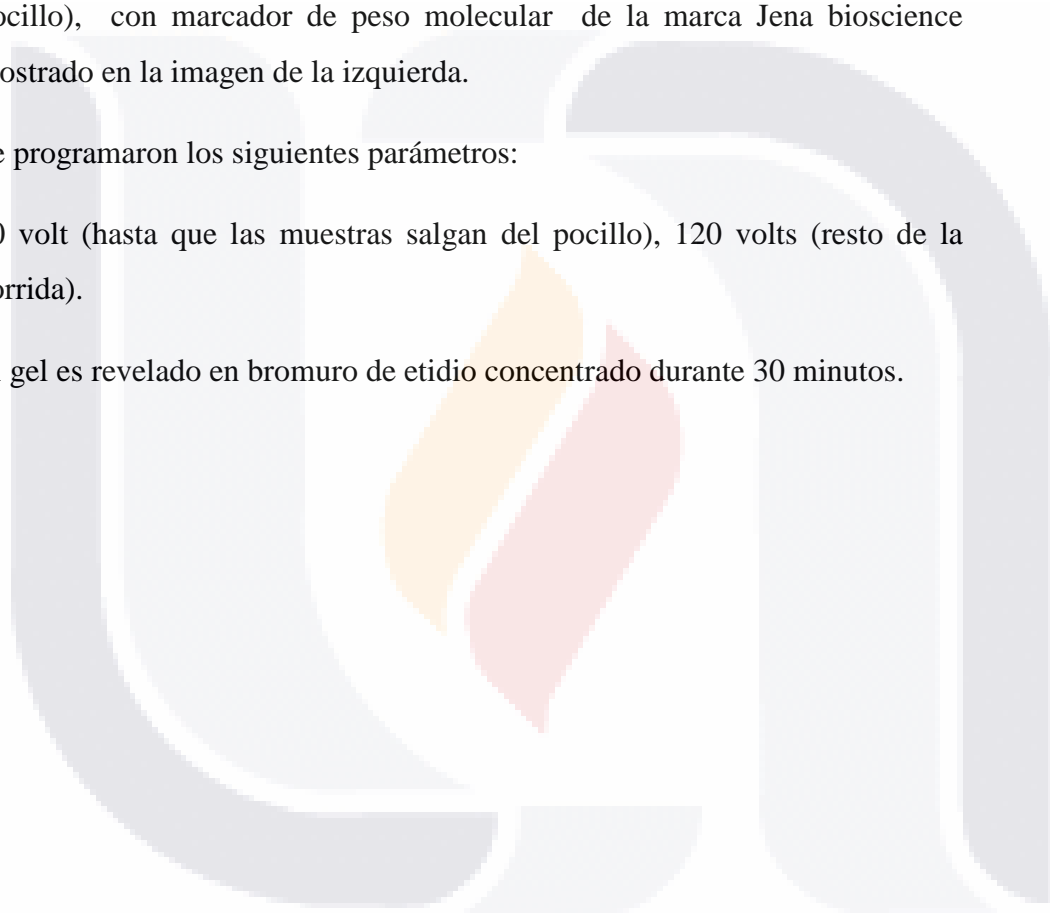
Mezclar las agarosa en el buffer PBS y calentar hasta disolver completamente sin dejar burbujas.

Las muestras se montan en gel de agarosa al 2.5% (5 μ L de muestra por pocillo), con marcador de peso molecular de la marca Jena bioscience mostrado en la imagen de la izquierda.

Se programaron los siguientes parámetros:

80 volt (hasta que las muestras salgan del pocillo), 120 volts (resto de la corrida).

El gel es revelado en bromuro de etidio concentrado durante 30 minutos.



ANEXO H

RETROTRANSCRIPCIÓN

1. En protocolo esta diseñado para el uso de 5µg de RNA total en la cadena de cDNA. Se preparó la siguiente mezcla, teniendo cuidado de mezclar y de ser necesario centrifugar cada uno de los siguientes componentes:

| Componente | |
|--------------------------------|-----------|
| RNA experimental | 1µg |
| Primer (Oligo dT) | 1µg |
| Agua Libre de nucleasas | X µg |
| Volumen final | 2.5 µL |

2. Cerrar cada tubo. Nota: es importante cerciorarse de que los tubos estén bien cerrados para evitar que la muestra se evapore.

3. Cada uno de los tubos se colocan en el termociclador (marca GENIUS), y se lleva a 70°C durante 5 minutos.

4. Colocar las muestras inmediatamente en hielo.

5. Centrifugar los tubos durante 10 segundos a 10 000 RPM para recuperar lo condensado, manteniendo el volumen inicial.

6. Preparación del MASTER MIX:

| | |
|---|----------------------------|
| H2O Libre de nucleasas | X μL |
| GoScript™ 5X Reaction Buffer | 2 μ L |
| MgCl₂ | 0.75 μ L |
| PCR Nucleotide Mix 0.5 μL | 0.5 μ L |
| Recombinant RNasin | 10 u |
| GoScript™ Reverse Transcriptase | 0.5 μ L |
| Volumen final | 7.5 μ L |

7. Añadir los 7.5 μ L de la solución anterior a los RNA-primers.
8. Colocar los tubos en el termociclador y configurar los siguientes parámetros durante 40 ciclos.
 - 5 minutos 25°C
 - 2 horas a 42°C
 - 15 minutos a 70°C
9. las muestras son resguardadas en ultracongelador a – 70°C.

ANEXO I

INMUNOHISTOQUÍMICA

Desparafinización e hidratación de los cortes:

| Solución | Tiempos | Solución | Tiempos |
|---------------|------------|----------------|------------|
| XIOL | 10 minutos | OH 80% | 10 minutos |
| XIOL | 10 minutos | OH 80% | 10 minutos |
| OH 96% | 10 minutos | Agua destilada | 10 minutos |
| OH 96% | 10 minutos | | |

Desenmascarar epítomos

Se coloca dentro de una olla 1.5l aproximadamente (hasta cubrir las laminillas) de citrato de sodio 1X, se deja que la presión de la olla suba al máximo, con cuidado introducir las laminillas en el buffer ya previamente calentado, encender nuevamente la olla dejar que salga el vapor por la valvula y dejar algunos minutos (aproximadamente 2 minutos) apagar y dejar enfriar por 15 minutos para sacar las laminillas.

Posteriormente se hacen lavados de las laminillas en cajas coplin con PBS 1X una vez durante 5 minutos.

Inactivación de peroxidadas endógenas

Se sumergen las laminillas en una solución de etanol mas H₂O₂ 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavan las laminillas con PBS 1X 3 veces durante 5 minutos.

Permeabilizar membranas

Se colocan las laminillas en una solución de PBS + Tritón X-100 0.2% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las laminillas se lavan con PBS 1X una vez durante 5 minutos.

Para colocar los anticuerpos primero se delimita cada tejido de interés con el PAP pen.

Bloqueo de uniones inespecíficas

Se incuban las laminillas con suero fetal de bovino (2 partes de suero por cada 8 partes de PBS +triton X-100 0.2%) durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Incubación del primer anticuerpo

Se utilizar el anticuerpo en este caso CD90 y KI67 hecho de conejo

Se diluye el anticuerpo 1:100 para KI67 y 1:500 para CD90 en PBS + Triton X-100 0.2% ya diluida en el la albumina sérica bovina (BSA) 3%. Para cada tejido se coloca 100 µL del anticuerpo (esto es dependiente del tamaño del tejido).

Incubar toda la noche en cámara húmeda a 4⁰C.

Posteriormente se lavan las laminillas con PBS 1X + Triton X-100 0.2% 3 veces durante 5 minutos.

Incubación del segundo anticuerpo

Se colocan 100 µL del anticuerpo secundario (dual link sYstem-HRP; Dako para KI67 y Cabra Anti-Rata IgG HRP para CD90) al tejido e incubar en oscuridad durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se lava con PBS 1X 3 veces por 5 minutos.

Revelado con 3 3´diaminobenzidina (DAB)

Se prepara en un tubo Eppendorf 0.5 mg de DAB + 1 mL del buffer Tris-HCl 0.05M + 3 µL de H₂O₂, el tubo se agita perfectamente para disolver el DAB, se centrifuga con un pulso el tubo a 10 000 rpm para precipitar el DAB que no se logro disolver.

Se colocan 100 µL del preparado en cada tejido tomando un intervalo de tiempo entre 5 y 10 minutos (se obtiene una coloración café)

Se lava cada tejido con PBS 1X 3 veces durante 5 minutos.

Tinción de núcleos

Se colocan 100 µL de hematoxilina diluida 1:10 sobre el tejido durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los tejidos teñidos se lavan 3 veces en agua corriente durante 5 minutos.

Deshidratación de los cortes

| Solución | Tiempos | Solución | Tiempos |
|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| OH 80% | 5 Minutos | OH 100% | 5 Minutos |
| OH 96% | 5 Minutos | XILOL | 10 minutos |
| OH 100% | 5 Minutos | XILOL | 10 minutos |

Montaje de la preparación histológica

Se cubren los tejidos con Entellan, se dejan secar 24 horas y se almacenan a temperatura ambiente. Se revisaron los cortes con microscopio de luz visible Micro Zeizz.

Preparación de buffer de citratos 10X

| | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| Acido cítrico monohidratado | 1.9g/90mL agua destilada |
| 0.1M | |

| | |
|---|--|
| Citrato de sodio tribásico dihidratado | 12.05g/410 mL de agua destilada |
| 0.1M | |

Disolver por separado cada solución y agregar el acido cítrico al citrato de sodio hasta ajustar el pH de 6

Preparación de buffer de citratos 1X

| | |
|-------------------------------|---------------|
| Buffer de citratos 10X | 100 mL |
|-------------------------------|---------------|

| | |
|-----------------------|---------------|
| Agua destilada | 900 mL |
|-----------------------|---------------|

Ajustar el pH a 6 con acido cítrico 1%